На правах рукописи

Калёнов Сергей Владимирович

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ И ГАЛОБАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Специальность: 03.00.23 - Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

> Научный руководитель: к.т.н., доцент Кузнецов Александр Евгеньевич

> > Москва - 2007

СОДЕРЖАНИЕ

| | Стр | |
|--|-----|--|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 | |
| 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР | | |
| 1.1 Стресс у микроорганизмов и стресс-факторы | 8 | |
| 1.2. Окислительный стресс и АФК | 9 | |
| 1.3. Механизмы защиты микроорганизмов и их адаптация к | | |
| действию стрессоров | 17 | |
| 1.4. Перекрестная адаптация к действию разных видов | | |
| стрессового воздействия | 38 | |
| 1.5. Изменение характеристик процессов биосинтеза при | | |
| действии стресс-факторов | 40 | |
| 1.6. Совместное действие стресс и антистресс-факторов. | | |
| Использование света низкой интенсивности для | | |
| стимулирования биологической активности | 42 | |
| 1.7. Галобактерии как перспективный объект исследований | | |
| 1.7.1. Среда обитания, таксономическая и биохимическая | | |
| характеристика галобактерий | 46 | |
| 1.7.2. Бактериородопсин и его функции | 52 | |
| 1.7.3. Особенности культивирования галобактерий и | | |
| синтеза бактериородопсина | 56 | |
| 1.7.4. Практическая значимость галобактерий и | | |
| бактериородопсина | 62 | |
| 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 65 | |
| 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ | | |
| ДРОЖЖЕЙ | 77 | |
| 3.1. Культивирование дрожжей Candida tropicalis | 78 | |
| 3.1.1. Культивирование дрожжей <i>C. tropicalis</i> при | | |
| одновременном воздействии света видимого | | |
| и УФ диапазонов спектра | 78 | |
| 3.1.2. Исследование роста дрожжей <i>C. tropicalis</i> при | | |
| воздействии УФ-излучения и лазерного излучения | | |
| видимого диапазона спектра | 91 | |
| 3.2. Культивирование дрожжей Saccharomyces cerevisiae | 98 | |
| 3.2.1. Исследование эффекта адаптации к пероксиду | | |
| водорода и ультрафиолету | 99 | |
| 3.2.2. Динамика роста и потребления субстрата при | | |

| внесении H_2O_2 | 110 | |
|--|-----|--|
| 3.2.3. Разработка рекомендаций по использованию | | |
| процесса культивирования с внесением пероксида | | |
| водорода в промышленных условиях | 125 | |
| 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ | | |
| ГАЛОБАКТЕРИЙ | 127 | |
| 4.1. Выбор исходных и получение мутантных штаммов | 127 | |
| 4.2. Выявление основных факторов, определяющих | | |
| активность культуры галобактерий в отношении | | |
| синтеза бактериородопсина | 133 | |
| 4.2.1. Подбор питательной среды | 133 | |
| 4.2.2. Рост и накопление БР в условиях | | |
| культивирования с подпиткой | 138 | |
| 4.2.3. Влияние интенсивности аэрации и уровня освещения | 142 | |
| 4.2.4. Состояние и доза посевного материала | 147 | |
| 4.2.5. Культивирование с добавлением отработанной | | |
| культуральной жидкости | 150 | |
| 4.2.6. Исследование эффекта старения среды | 153 | |
| 4.2.7. Влияние пероксида водорода и мягкого УФ-излучения | 156 | |
| 4.3. Разработка способов культивирования в условиях | | |
| контролируемого окислительного стресса | 161 | |
| 4.3.1. Подготовка посевного материала | 162 | |
| 4.3.2. Культивирование при дефиците кислорода | 165 | |
| 4.3.3. Культивирование в доливном режиме | 168 | |
| 4.3.4. Культивирование с внесением антиоксидантов | 169 | |
| 4.3.5. Подбор условий освещения | 170 | |
| 4.3.6. Культивирование с селективным извлечением | | |
| ингибиторов сорбентом в процессе роста | 170 | |
| 4.4. Совершенствование автоматизированного комплекса | | |
| для культивирования галобактерий и получения | | |
| бактериородопсина | 172 | |
| 4.5. Оценка технико-экономических показателей получения | | |
| бактериородопсина по разработанному способу в сравнении | 1 | |
| с другими вариантами | 180 | |
| ВЫВОДЫ | | |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 184 | |

ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование традиционных и разработка новых способов культивирования микроорганизмов является основой для получения продуктов биосинтеза и использования специфических микробных процессов в отдельных областях биотехнологии. Постоянное внимание уделяется поиску средств, позволяющих поддерживать необходимые ростовые и биосинтетические характеристики микробных продуцентов на протяжении определенной ферментационной стадии или всего жизненного цикла. Широко применяются такие методы как иммобилизация клеток, управляемое культивирование с использованием современных оперативных средств и математических моделей, направленное вмешательство в метаболические процессы и др. Отклонение сбалансированного процесса микробного синтеза от заданных оптимальных параметров ведет к ухудшению показателей биосинтеза, а нарушение этих параметров индуцирует развитие в клетках микроорганизмов состояние стресса. Состояние стресса понимается как совокупность ответных реакций, направленных на преодоление неблагоприятных изменений окружения, вызванных стрессорным воздействием.

Длительное время считали, что стресс неблагоприятно воздействует на микроорганизмы, что выражается в подавлении их физиологической активности, снижении эффективности биосинтеза. Поэтому в многочисленных исследованиях в первую очередь обращается внимание на изучение различных изменений в живых клетках в стрессовых условиях и механизмов повышения устойчивости микроорганизмов к стрессовым воздействиям.

Однако в последнее время появляется все больше данных, указывающих на ограниченность мнения о сугубо отрицательном воздействии стрессфакторов (стрессоров) на микроорганизмы [1, 2]. В определенных условиях воздействие оптимальных доз стресс-факторов может привести к улучшению ростовых характеристик [3], других показателей биосинтеза [4, 5], повышению скорости биотрансформации и разложения загрязнений [1, 6–9] и может использоваться при получении некоторых продуктов биосинтеза, например, эргостерина из клеток дрожжей при обработке ультрафиолетом [10]. Показано, что микробные клетки и популяции, предадаптированные к воздействию стрессоров, зачастую обладают лучшими ростовыми характеристиками, эффективнее потребляют субстрат и образуют меньше побочных внеклеточных продуктов жизнедеятельности [2, 3, 11, 12].

Таким образом, учитывая все возрастающее число публикаций и фактов, свидетельствующих о положительном воздействии оптимальных доз стрессоров на различные процессы роста, биосинтеза и биотрансформации, целесообразнее использовать понятие оптимального или контролируемого стресса как одного из путей совершенствования процессов управляемого культивирования микроорганизмов.

Контроль стресса и стресс-факторов, избирательное усиление или подавление действия их на клетки микроорганизмов может послужить дополнительным средством для совершенствования процессов управляемого культивирования микроорганизмов в лабораторных и промышленных биореакторах.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы было выяснить закономерности изменения биосинтетических и ростовых характеристик модельных микроорганизмов в условиях контролируемого окислительного стресса для совершенствования ферментационных процессов и разработки новых подходов управляемого культивирования промышленно важных микробных продуцентов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработать стендовую установку и программное обеспечение для исследования процессов культивирования модельных микроорганизмов в условиях контролируемого окислительного стресса;
- 2 исследовать изменения ростовых и биосинтетических характеристик модельных микроорганизмов при воздействии УФ облучением и пероксидом водорода, подобрать оптимальные дозы стрессоров;
- 3 проанализировать действие факторов окружения, обладающих антистрессовым эффектом при окислительном стрессе;
- 4 исследовать устойчивость к факторам окислительного стресса микроорганизмов различного физиологического состояния;
- 5 исследовать совместное действие стрессорных и антистрессорных факторов в процессах культивирования модельных микроорганизмов;
- 6 разработать методы, обеспечивающие поддержание состояния оптимального окислительного стресса для увеличения выхода целевого продукта;
- 7 разработать автоматизированную систему культивирования и синтеза целевых продуктов в условиях контролируемого окислительного стресса.

Научная новизна.

На примере дрожжей Candida tropicalis, Saccharomyces cerevisiae и галобактерий Halobacterium salinarium показана перспективность использования контролируемого окислительного стресса для повышения эффективности ферментации.

Обнаружено, что контролируемое совместное воздействие стрессоров (H_2O_2 , мягкий ультрафиолет) и антистрессорных факторов (видимый свет низкой интенсивности, антиоксиданты, удаление ингибиторов биосинтеза) улучшает ростовые и биосинтетические характеристики модельных микроорганизмов: повышает выход биомассы, удельную скорость роста, бродильную активность и устойчивость к закислению у дрожжей, способствует поддержанию продуктивности биореактора с высокоплотностной культурой дрожжей, повышает уровень накопления бактериородопсина при минимальном накоплении каротиноидов у галобактерий. Показано, что комбинированное действие ультрафиолета и видимого света или монохроматического излучения может выступать в качестве инструмента для управления ростом гетеротрофных микроорганизмов, не чувствительных в обычных условиях (без УФ облучения) к освещению.

Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показана целесообразность использования посевного материала, предобработанного H_2O_2 . Подобраны условия выращивания засевной культуры в условиях окислительного стресса (внесение H_2O_2 в предстационарной фазе роста разово в дозе 0,3-0,6 г/л при освещении суспензии фоновым дневным светом), обеспечивающие в основном процессе в аэробных или микроаэрофильных условиях увеличение удельной скорости роста на 15-25%, выхода биомассы на 15-25%, сокращение лаг-фазы более чем в 2 раза; в анаэробных условиях – увеличение удельной скорости роста на 30-50% и сокращение времени сбраживания субстрата на 30%.

Впервые установлено, что в процессе глубинного культивирования галобактерий (ГБ) *Н. salinarium* рост культуры и синтез бактериородопсина (БР) в сильной степени зависят от наличия ингибиторов, предположительно продуктов химического и/или фотохимического окисления компонентов среды, образующихся при ее хранении или использовании. С учетом этих факторов получен биосинтетически активный штамм галобактерий, подобраны оптимальные условия (среда, режим аэрации, подготовка посевного материала, освещение) и разработаны режимы культивирования (доливная культура, внесение антиоксидантов, обработка адсорбентами), позволившие увеличить содержание бактериородопсина в клетках и его выход за цикл ферментации с 70–75 мг/л за 6–7 сут. до 1700–1750 мг/л за 8 сут. при одновременном повышении стабильности

процесса и снижении содержания каротиноидов, что существенно упрощает процедуры выделения бактериородопсина и его очистки.

Практическая значимость.

На основе проведенных исследований, выявленных воздействий и закономерностей разработаны новые методы культивирования микроорганизмов с контролированием факторов окислительного стресса. Предложена система культивирования, названная «солнечным» биореактором, в которой среда освещается одновременно светом видимого и мягкого ультрафиолетового УФА, УФБ диапазонов (имитируется действие излучения солнца на поверхности земли) или подвергается воздействию относительно малых доз пероксида водорода и видимого света.

Для управления ферментационными процессами разработаны программное обеспечение «ВіоDrome 1.0», автоматизированный комплекс, и метод непрерывного контроля уровня накопления биомассы и бактериородопсина в клетках галобактерий (по цветовым оттенкам ферментационной среды). Возможности комплекса позволяют регистрировать и регулировать параметры ферментации, работать в различных режимах культивирования с обратной связью по показаниям датчиков, а также следить за процессом в режиме удаленного доступа. Отдельные элементы комплекса и разработанное программное обеспечение используются в учебном процессе в РХТУ им. Д.И. Менделеева (каф. биотехнологии, каф. процессов и аппаратов), а также в научных исследованиях на стендах ГУП НПО «Астрофизика», ВНИИ Молочной промышленности.

Вариант метода культивирования с использованием одновременного воздействия пероксида водорода и видимого света, предложен для улучшения показателей (жизнеспособности, бродильной активности) дрожжевой засевной культуры при получении спирта из зерносырья. Предложенное решение вошло в план перспективных мероприятий Серебряно-Прудского биохимического завода (Московская обл.).

Согласно предварительной технико-экономической оценке реализация предложенных решений на базе разработанного автоматизированного комплекса и предложенных методов культивирования галобактерий при промышленном получении бактериородопсина (в составе пурпурных мембран) позволит снизить стоимость его с 500–5000 руб. за 1 мг (в зависимости от чистоты продукта) до 20–100 руб. за 1 мг.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Стресс у микроорганизмов и стресс-факторы

Развитие любых микроорганизмов происходит в непосредственном контакте с внешней средой, поэтому они являются постоянными объектами стрессовых факторов физической и химической природы. Согласно Webster dictionary P., стресс – это силовая внешняя система, нарушающая состояние равновесия. В литературе применительно к стрессовым факторам, воздействующим на живые объекты, принято использовать термин "стрессоры".Воздействие стрессоров запускает разнообразные адаптивные механизмы ответа у микроорганизмов, которые во многом аналогичны ответам в клетках и организмах высших животных [13, 14, 14а]. Их размножение замедляется и прекращается. Метаболизм перестраивается на синтез белков, необходимых для выживания. В процессах регуляции принимают участие клеточные гормоны, получившие название аллормонов.

В природе микроорганизмы находится под множественным воздействием внешних стрессорных агентов и можно обнаружить совместное и раздельное действие этих агентов в ходе процесса развития клетки. Выживание под действием стресса, определяемого многими факторами, скорее является правилом, чем исключением, поэтому способность выдерживать неблагоприятные условия, а также возможность усиления синтеза определенных метаболитов в этих условиях привлекает пристальное внимание, в том числе и в целях совершенствования процессов микробиологического синтеза и деструкции [1, 2, 7].

Среди разнообразия стрессовых ситуаций, в которых могут оказаться микроорганизмы в природных и искусственных средах, выделяют голодание, вызванное недостатком или отсутствием какого-либо источника питания, изменение газового состава среды, условий освещения и температуры, механическое повреждение, осмотический и рН-шок, УФ-излучение, ионизирующая радиация, действие различных окислителей (окислительный или оксидативный стресс), токсичных веществ [14а,15,16].

Тепловой шок возникает при воздействии на живые клетки повышенных температур, при которых физиологическая активность клетки репрессируется, но клетка при этом остается жизнеспособной (т.е. при воздействии сублетальных температур). Главная опасность, связанная с воздействием на организм нагревания – денатурация белков.

Холодовой шок. В отличие от теплового шока, понижения или увеличения значений рН или солености или других стрессов, холодовой шок не вызывает денатурацию белков, но вызывает изменение молекул и биохимических реакций по сравнению с теми, что имеют мезофильные или гипертермофильные организмы. При холодовом стрессе происходит стабилизация вторичной структуры нуклеиновых кислот и как следствие – ингибирование ДНК-репликации, транскрипции и трансляции. Снижается активность многих ферментов и общего метаболизма, а также текучесть мембран, что затрудняет транспорт веществ в клетку. Кроме этого, в клетке образуются кристаллы льда, повреждающие многие клеточные структуры и вызывающие гибель организма [17]. В ответ на низкие температуры микроорганизмы синтезируют белки холодового шока (БХШ), которые вовлекаются в синтез белков и укладку мРНК [18].

Из других видов стрессов один из наиболее физиологически значимых – окислительный стресс, индуцируемый у одноклеточных и многоклеточных организмов действием активных форм кислорода.

1.2. Окислительный стресс и АФК

В природных условиях в результате различных абиотических и биотических процессов образуются свободные радикалы и другие реакционноспособные частицы, оказывающие определенное воздействие на живые организмы. Активные частицы, возникающие в процессах с участием кислорода (как побочные продукты аэробного дыхания, окислительных абиотических химических, фотохимических, механохимических процессов трансформации веществ) называют активными формами кислорода (АФК). К ним относят пероксид водорода H_2O_2 , озон O_3 , атомарный кислород O_2 , монооксид азота O_3 , синглетный кислород O_2 , супероксидный анион-радикал O_2 , гидроксильный радикал O_3 , атакже некоторые органические свободные радикалы: алкильные радикалы O_3 , алкилпероксидные радикалы O_3 , алкоксильные радикалы O_3 , анионрадикалы восстановительной природы O_3 , и некоторые другие.

Действие повышенных доз АФК на биологическую клетку вызывает в клетках стресс, характеризуемый как окислительный (оксидативный), а сами стресс-факторы называют агентами окислительного стресса. К агентам окислительного стресса принято относить и мягкое ультрафиолетовое излучение УФА и УФБ диапазонов спектра, воздействие которого на водные среды и химиче-

ские соединения приводит к накоплению в среде кислородсодержащих активных частиц (H_2O_2 , O_3 , O, ${}^{\bullet}OH$).

Окислительный стресс рассматривается как одно из наиболее распространенных физиологических состояний клетки при повреждении клеточных структур. При окислительном стрессе возможны разрывы нуклеиновых кислот, разрывы и сшивки белковых молекул, блокада реакционных центров ферментов и общее энергетическое истощение организма [14a,19].

Воздействие АФК на клеточные структуры инициирует реакции перекисного или радикального окисления. В норме эти реакции тормозятся антиоксидантными системами клетки, благодаря наличию которых скорость реакции образования агрессивных частиц находится в пределах физиологической нормы. Окислительный стресс развивается при резком усилении окислительных процессов при недостаточности системы антиоксидантной защиты, при этом размножение микроорганизмов замедляется и прекращается. Метаболизм перестраивается на синтез белков, необходимых для выживания. АФК опосредованно участвуют и в ответе клеток на другие виды стресса: при голодании, температурном, механическом, осмотическом и рН-шоке.

В природных водах свободные радикалы и АФК образуются несколькими путями в результате: 1) каталитического инициирования; 2) растворения активных газов из атмосферы; 3) радиационно-химического инициирования; 4) кавитационных эффектов; 5) фотохимического инициирования, 6) биологической эмиссии [20,21, 22].

Каталитическое инициирование свободных радикалов связано с одноэлектронным восстановлением кислорода, пероксида водорода, катализируемым ионами меди и железа (II). Ионы железа (II) катализируют распад пероксида водорода и от концентрации этих ионов зависит механизм его распада.

При $[Fe^{2+}]<10^{-2}$ моль/л взаимодействие протекает в соответствии с уравнением:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$$
,

а сама пара Fe^{2+} и H_2O_2 выступает, как реактив, генерирующий радикалы OH^{\bullet} (в лабораторной практике этот реактив известен как реактив Фентона [23]). В случае $[Fe^{2+}]>10^{-2}$ М процесс протекает по уравнениям, исключающим образование радикалов.

Образование радикалов в водной среде за счет растворения активных газов из атмосферы может быть связано с растворением таких радикалов, как ${}^{\bullet}$ OH, $HO_2{}^{\bullet}$, а также NO_2 , CH_3O_2 . Однако гораздо существеннее растворение озона, яв-

ляющегося источником образования свободных радикалов ${}^{\bullet}$ OH, $O_2^{\bullet-}$ при его переходе в O_2 . Средний поток O_3 из атмосферы в водную среду на 3-5 порядков больше, чем поток HO_2^{\bullet} . Стационарная концентрация O_3 в приповерхностных слоях воды достигает 10^{-8} M.

В обычных условиях (без принудительного увеличения потока O_3 , NO_2 в водную среду) скорость инициирования радикалов за счет растворения активных газов относительно мала.

Радиационное инициирование в отсутствие радиационного загрязнения водной среды осуществляется под действием естественного радиоактивного фона и происходит прежде всего в результате радиолиза воды. В обычных условиях вклад этой составляющей в суммарную скорость образования радикалов незначителен, однако он резко возрастает при радиационном загрязнении.

Образование радикалов в результате кавитационных эффектов происходит в результате схлопывания микропузырьков газа и наблюдается в океанических и морских волнах, а также на глубине пресных водоемов (оз. Байкал). В целом роль кавитации в генерировании радикальных частиц, как и роль радиации, незначительна.

Реакции фотохимического инициирования свободных радикалов под действием солнечного УФ-излучения наиболее активно протекают на поверхности воды и почвы. Они могут происходить по механизмам гомогенного расщепления связи (расщепление галогенированных углеводородов, нитроксильных соединений, пероксидов, азосоединений, фотолиз нитрата и нитрита), переноса заряда (в комплексах железа, меди, при взаимодействии O_2 с некоторыми красителями), фотоэлектронного переноса (в реакциях с красителями, с некоторыми микрогетерогенными оксидами, например, TiO_2), через промежуточное образование электронно-возбужденных частиц (с участием гумусовых веществ).

Пероксид водорода среди всех реакционно-активных кислородсодержащих частиц естественного биотического и абиотического происхождения играет особенно важную роль во многих абиотических и биотических процессах. С одной стороны, H_2O_2 наряду с супероксидным радикалом, синглетным O_2 и гидроксильным радикалом является агрессивным агентом и повреждает молекулы клеточных структур. С другой стороны, H_2O_2 участвует в абиотической трансформации органических соединений в водных средах, в процессах природного самоочищения. Окислительные абиотические процессы с участием пероксида водорода могут выполнять важную роль в трансформации органических веществ, в процессах полимеризации остатков этих соединений. В искус-

ственных системах очистки они могут быть использованы для разложения некоторых органических ксенобиотиков [22, 24].

В круговороте кислорода H_2O_2 занимает промежуточное положение между молекулярным кислородом и водой и является неотъемлемым компонентом природной водной среды [22, 25, 26]. Стационарное содержание H_2O_2 в природных средах определяется многими факторами и обычно колеблется в пределах 10^{-6} — 10^{-5} моль/л и достигает 10^{-4} моль/л. Атмосферная влага также содержит значительные концентрации пероксида водорода. Так, в дожде содержание H_2O_2 в среднем около 10^{-5} моль/л, в грозовом дожде концентрация H_2O_2 может достичь 10^{-4} моль/л, в снеге содержание H_2O_2 несколько меньше — 10^{-5} моль/л [21].

К образованию H_2O_2 приводят каталитические процессы окисления с участием O_2 и фотохимические процессы, протекающие в гомогенной среде с участием растворенных органических и неорганических веществ. Основную роль в абиогенном образовании H_2O_2 в природных водах играют фотокаталитические процессы под действием солнечного света (УФ-излучения).

Биотическое происхождение H_2O_2 в водных средах связывают прежде всего с жизнедеятельностью микроводорослей. Известны многие виды водорослей, выделяющие H_2O_2 во внешнюю среду в процессе фотосинтеза. Практически все микроводоросли продуцируют H_2O_2 при действии УФ-составляющей солнечного излучения. Происходит это вследствие протекания внутриклеточных фотохимических реакций с участием светочувствительных водорастворимых компонентов клетки. Образующиеся под действием УФ-света радикалы $O_2^{\bullet -}$ рекомбинируют в клетке (с участием супероксиддисмутазы) и избыточный пероксид водорода выводится во внешнюю среду.

Помимо микроводорослей известны некоторые бактерии, выделяющие H_2O_2 во внешнюю среду в процессе жизнедеятельности. Некоторые почвенные бактерии (*Nitrosomonas*) выделяют радикал NO в ходе окисления NH_3 .

К уменьшению содержания H_2O_2 смещению окислительновосстановительного баланса среды водоема в сторону восстановительного состояния ведет интенсивное выделение микроводорослями веществ с ярко выраженными восстановительными свойствами. Особенно активными продуцентами таких веществ являются цианобактерии, развитие которых угнетается в $10^{-6} - 10^{-5}$ M H_2O_2 . Выделение присутствии ИМИ восстановителей, эффективно взаимодействующих с пероксидом водорода, нейтрализует токсичное для них действие Н₂О₂.

Образование радикалов в результате биогенной эмиссии происходит главным образом опосредованно – в результате выделения H_2O_2 , образующейся в

некоторых биохимических процессах окисления (табл. 1A). Например, фермент полифенолоксидаза катализирует восстановление O_2 до H_2O_2 при окислении катехина в соответствующий хинон. Природными катализаторами процессов с участием H_2O_2 служат также каталазы.

Таблица 1A. Биохимические реакции окисления, протекающие с образованием H_2O_2 и органических гидроперекисей [21]

| п/п | | Реакция | A |
|-----|--|---------------------------------------|---|
| 1 | Ксантин, гипок- сантин | \leftarrow Ксантиндегидратаза O_2 | H_2O_2 + мочевая кислота |
| 2 | Крезол, оксибен- зойная кислота, фенол | O_2 | H_2O_2 + цис-муконовая кислота |
| 3 | Катехин | 0_2 | H_2O_2 + о-хинон |
| 4 | D-глюкоза | O_2 | H_2O_2 + глюконовая кислота |
| 5 | Мочевая кислота | уриказа О ₂ → | H_2O_2 + аллонтоин |
| 6 | Аскорбиновая кислота | аскорбиноксидаза O_2 | H_2O_2 + дегидроаскорбиновая кислота |
| 7 | Цистеин | <u>цистеиноксидаза</u> О ₂ | H_2O_2 + цистеиновая кислота |
| 8 | Аминокислоты | оксидазы аминокис- лот, O_2 | $H_2O_2 + NH_2 + $ кето- или альдегидокислоты |
| 9 | Сложные амины | аминооксидазы О ₂ | $H_2O_2 + NH_2 + $ кетоны или альдегиды |
| 10 | Триптофан $+H_2O_2$ Триптофан $+H_2O_2$ | - | триптофан $*H_2O_2$ триптофан $*O_2 + H_2O_2$ |
| 11 | Гликолевая ки- слота | O_2 | H_2O_2 + глиоксалевая кислота |
| 12 | Ретинол (витамин A) | 0_2 | органические перекиси + H ₂ O |
| 13 | Ненасыщенные жирные кислоты | O_2 | гидроперекиси жирных кислот |

Глюкозооксидаза (глюкозо-2-оксидаза) превращает глюкозу в глюконолактон, в результате чего генерируется H_2O_2 , который запускает реакции окислительной деструкции внутри клеток.

В случае пероксидазы субстратами служат доноры электрона и водорода. Окисление наиболее низкомолекулярных доноров (например, формиата, формальдегида) осуществляется двухэлектронно. Присутствие экзогенного H_2O_2 приводит к индукции гена, кодирующего пероксидазу [27]. Пероксидаза способна окислять различные органические соединения, используя кислород пероксида водорода или органических пероксидов. Пероксидаза окисляет полифенолы, ароматические амины и играет важную роль в окислительных процессах, протекающих в организме. Была показана способность биологического галогенирования ферментами хлоропероксидазой и бромопероксидазой [28]. Процесс протекает через образование связанных с ферментным Fe(III) перекисных соединений и гипохлорита и гипобромида.

Важную роль пероксидазы выполняют в так называемом пероксидном окислении липидов (жирных кислот, входящих в состав мембран) и имеющем большое значение для жизнедеятельности клетки. Физиологическая значимость пероксидного окисления липидов связана с тем, что пероксиды липидов могут выступать в качестве регуляторов проницаемости клеточных мембран и активности монооксигеназных реакций.

Пероксид водорода участвует в деструкции многих природных биополимеров, осуществляемой, главным образом, грибами. Наибольшей активностью в разложении таких устойчивых полимеров, как лигноцеллюлозы и лигнин, обладают грибы – возбудители белой гнили. В процессе деструкции лигноцеллюлозы грибами белой гнили участвуют более десяти ферментов. Среди промежуточных продуктов распада целлюлозы и лигнина обнаружены H_2O , H_2O_2 , O_2 , O^{\bullet} , целлобиоза, глюкоза, целлобионовая кислота, феноксильные радикалы. Тесное взаимодействие циклов деструкции и утилизации целлюлозы и лигнина грибами белой гнили обеспечивает эффективную минерализацию лигноцеллюлозных субстратов [29-32].

Лигнолитические микроорганизмы и их внеклеточные ферменты относят к числу одних из наиболее перспективных в отношении деструкции ксенобиотиков. Процесс биодеструкции, катализируемый этими ферментами, назван "энзиматическим сжиганием" [30, 32].

В клетках млекопитающих содержание внутриклеточного H_2O_2 составляет $10^{-7}-10^{-6}$ M [21]. При этом наибольшее содержание пероксида водорода и ак-

тивность пероксидаз и каталаз наблюдается в пероксисомах, которые, как полагают, выполняют главную роль в защите клетки от кислорода. Скорость восстановления кислорода в пероксисомах возрастает пропорционально увеличению его концентрации, так что излишек кислорода в клетке ускоряет его восстановление пероксисомами. В повышенных концентрациях пероксид водорода продуцируется также клетками-фагоцитами.

Полагают, что концентрация H_2O_2 наряду с потоком восстановительных эквивалентов в виде НАДН и ФАДН определяет редокс-состояние внутриклеточной среды [21, 33]. Разбалансировка внутриклеточных редокс-процессов может приводить и к разбалансировке других функциональных систем клетки.

Еще одна функция пероксида водорода, наряду с функциями окислителя, кофактора и регулятора внутриклеточных процессов, заключается в активировании системы ответа на окислительный стресс в различных организмах.

В работе [34], была показана роль АФК в возникновении апоптоза. Кислородные радикалы — важные составляющие апоптоза клеток многоклеточного организма. Обнаружено, что апоптоз может быть вызван в дрожжах Saccharomyces cerevisiae истощением глутатиона или внесением малых доз H_2O_2 . Циклогексимид предотвращает смерть от апоптоза, возобновляя активное функционирование клетки. Дрожжи также могут быть переключены на апоптоз мутацией в CDC48. В разных случаях накопление кислородных радикалов в клетке вызывает апоптоз, тогда как устранение радикальных частиц или гипоксия предотвращает апоптоз. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что генерирование кислородных радикалов является ключевым событием в семействе путей ответственных за апоптоз.

Стрессовые воздействия, вызываемые H_2O_2 , во многих отношениях подобны действию УФ-облучения ближнего диапазона (т.е. ультрафиолета с длиной волны 300–400 нм) или ионизирующего излучения, которые вызывают радиолиз молекул воды в клетках, в результате чего образуются активные формы кислорода, свободные радикалы и перекисные соединения. Все эти воздействия индуцируют в клетках системы репарации ДНК, которые в определенной степени схожи. Поэтому бактерии, устойчивые к ионизирующему излучению, резистентны и к УФ и к пероксиду водорода [35].

УФ-радиация как одна из составляющих солнечного спектра, может оказывать повреждающее воздействие на биологические системы. Особенно сильное повреждающее, прямое мутагенное действие оказывает жесткий ультрафиолет УФС-диапазона 250–270 нм, в котором ДНК наиболее интенсивно поглощает кванты УФ-излучения. Воздействие жесткого ультрафиолета вызывает образование в ДНК циклобутильных пиримидиновых димеров, (6-4) фотопро-

дуктов и т.д. Белки наиболее интенсивно поглощают УФ–излучение в диапазоне 270–290 нм. Поглощение обусловлено ароматическими группами триптофана, тирозина, фенилаланина и гистидина. Некоторые пигменты и липиды также интенсивно поглощают УФ-излучение. Денатурация различных макромолекул, особенно белков, инициированная воздействием ультрафиолета, приводит к соответствующей потере структуры и функций их, что ведет к гибели клетки.

До поверхности Земли доходит лишь крайне малая доля УФС-излучения Солнца, а основная составляющая ультрафиолета, достигающего земной поверхности, приходится на УФА и УФБ диапазоны. УФБ (280-320 нм) и УФА (320-400 нм) излучение также действуют на многие метаболические процессы, пигментирование, состав биологических сообществ. В частности, у цианобактерий наиболее чувствительными к УФБ-излучению являются ферменты, ответственные за азотфиксацию [36].

УФА-излучение может индуцировать повреждения в ДНК, некоторые из которых возникают только в присутствии кислорода. Однако вероятность мутагенного действия невелика. В основном проявляется его фотокаталитическое и фотохимическое действие, при котором образуются активные формы кислорода, особенно при совместном действии УФА-излучения, видимого света, эндогенных и экзогенных сенсибилизаторов, и индуцируется окислительный стресс. В этом случае из различных соединений клетки первоочередные объекты для атаки АФК – ненасыщенные липиды и белки клеточных мембран, что вызывает изменения структуры мембран и их функций [37]. Из белков к УФА в наибольшей степени чувствительны ферменты, которые содержат УФА-поглощающие структуры. Например, УФА-радиация инактивирует каталазу в Salmonella typhimurium и in vitro. Это объясняют фотосенсибилизированием геминовой части каталазы, поскольку ферменты, не поглощающие УФ, такие как щелочная фосфатаза, не инактивируются УФА. Аналогично, за инактивирование глутатионредуктазы ответственна флавиновая часть фермента, поглощающая УФА-излучение [38]. Роль эндогенного сенсибилизатора могут выполнять внутриклеточный НАДН, рибофлавин и другие метаболиты. Показано, что в дрожжевых клетках НАДН способен к фотогенерированию супероксидного радикала в изолированных ядрах, который уже непосредственно повреждает клеточные структуры. Фотосенсибилизация под действием видимого света (400-650 нм) в присутствии порфиринов, сопровождаемая образованием синглетного кислорода, также может приводить к повреждению клеточных структур. Связанный с плазматической мембраной порфирин может индуцировать фотоперекисное окисление липидов. При одновременном облучении УФА и видимым светом наблюдался фотосинергический летальный эффект [39].

1.3. Механизмы защиты микроорганизмов и их адаптация к действию стрессоров

На фенотипическом уровне видоизменение особей и популяций в направлении, увеличивающем шансы на сохранение жизненной активности и способности к размножению в данных условиях окружающей среды, характеризуется как адаптация [40]. У микроорганизмов наиболее характерным проявлением адаптации к действию стресс-факторов является клеточная дифференцировка и спорообразование, накопление резервных веществ, образование ультрамикроклеток.

Спорообразование.

В настоящее время не вызывает сомнений, что причиной образования покоящихся клеток как прокариотных, так и эукариотных, является действие стресса, причем это положение было сформулировано еще в 1983 г. [41]. Возникновение в процессе эволюционного морфогенеза толстостенной, пигментированной, устойчивой к неблагоприятным внешним воздействиям биологической системы – споры – явилось результатом защиты от стресса. Исходя из этих представлений процесс спорообразования можно охарактеризовать как определенную стратегию многих организмов (растений, животных, микроорганизмов), позволяющую сохранить геномный материал (genomic safe house) [42]. Этот процесс вызывает целый ряд неблагоприятных факторов: голодание, охлаждение, нагревание, химические реагенты, в том числе токсичные вещества, свет, радиация и др. Среди этих факторов наиболее распространенным является голодание.

У грибов (*Fungi*) под термином «спора» понимается специализированная клетка, образующаяся в результате бесполого или полового процесса.

Споры в жизненном цикле грибов кроме основной функции (завершения процесса бесполой и половой репродукции) выполняют еще две: обеспечение виду способности выживать при наступлении неблагоприятных условий и содействие распространению вида во внешнем ареале.

Споруляция клеток включает три варианта:

- 1. Эндоспоруляция (весь процесс протекает внутри вегетативной клетки, которая погружена в водный раствор).
- 2. Воздушная споруляция (происходит временная и пространственная дифференцировка в популяции клеток с образованием спор и мицелиальных структур, несущих эти клетки.).

3. Образование плодовых тел (образование спор с защитной оболочкой, что делает возможным их более длительное сохранение и распространение).

Перечисленные варианты споруляции найдены у прокариот – представителей *Bacillus*, *Streptomyces* и *Myxococcus*. У грибов из указанных выше вариантов, наиболее широко распространена воздушная споруляция.

В качестве примера эндоспоруляции у грибов можно привести аскоспоры дрожжей, которые подобно эндоспорам *Bacillus* и *Clostridium* образуются внутри материнской клетки. Однако эндоспоруляция у прокариот и у дрожжей имеет существенное различие. У последних это половой процесс – редукционное деление от диплоида к гаплоиду, в то время как бактерии всегда гаплоидны.

Споры грибов, относящихся к различным систематическим группам, значительно различаются по своему химическому составу. Особый интерес в этом отношении представляют углеводы цитозоля спор.

Наиболее существенные различия в углеводном составе цитозоля спор обнаружены у грибов, относящихся к отделам *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* [43]. Различия в углеводном составе покоящих клеток состоят в том, что низшие грибы содержат как основные и единственные сахара дисахарид трегалозу и глюкозу. В то же время высшие грибы (*Neomycota*)содержат кроме этих сахаров ряд сахароспиртов (маннит, арабит, рибит, мезо-эритрит, глицерин и др.}. Интерес представляет обнаружение в базидиоспорах ксилотрофных грибов сахарозы, причем у *Pleurotus ostreatus* содержание этого дисахарида достигает 10% от суммы сахаров. Отмеченный факт интересен в связи с тем, что сахароза характерна для растений и является у этих организмов "сахаром покоя", как и трегалоза, свойственная грибам, прокариотам и некоторым животным. В связи с этим интересно, что некоторые споры *Basidiomycota* содержат два углевода "покоя" – трегалозу и сахарозу.

Новым фактом является также обнаружение инозита у представителей мукоровых грибов. Среди исследованных представителей *Mucorales* споры *Cunnighamella japonica* и *Absidia coerulea* не содержат полиолов, а в спорах *Blakeslea trispora* в определенных условиях культивирования обнаружен сахароспирт инозит. В то же время этот полиол идентифицирован и спорах ряда *Ascomycota*, в частности в конидиях аскомицетов.

Указанные выше углеводы выполняют жизненно важные функции в экстремальных условиях существования организмов. Установлено, что полиолы оказывают стабилизирующее действие и препятствуют инактивации ряда ферментов при действии холода. Так, сорбит защищает от холодовой инактивации фермент аргининсукциназу, еще более эффективное действие оказывает 10%-

ный раствор глицерина [44]. Такой эффект полиолов можно объяснить тем, что они усиливают межмолекулярные гидрофобные взаимодействия, что приводит к стабилизации мономерных белков.

Как отмечалось выше, в покоящихся клетках грибов содержится значительное количество трегалозы, которая выполняет следующие функции: является источником энергии на первых этапах прорастания спор и служит термопротектором при стрессовых воздействиях [45, 46]. При этом в спорах накапливается очень много трегалозы, например в аскоспорах и конидиоспорах N.. crassa до 14 и 16% соответственно.

У базидиальных грибов в зависимости от температуры происходит смена углеводов термопротекторов. Так, у *F. velutipes* при 10–15°C в базидиомах преобладает арабит и трегалоза, а глицерин не образуется. При снижении температуры до 0–5°C происходит резкое увеличение содержания глицерина и заметное уменьшение уровня трегалозы. Интересно, что трегалоза накапливается у грибов в большом количестве только при повышении температуры культивирования [45].

К числу наиболее широко распространенных полиолов в природе относится ациклический полиол – маннит. Он встречается у грибов, бактерий, водорослей, лишайников, его обнаружили почти в 70 видах васкулярных растений [47]. Маннит выполняет роль осморегулятора, тургорегулятора, участвует в синтезе запасных соединений и в защите от разрушающего действия свободных радикалов, а также в стабилизации структуры и функции клеточных макромолекул [48]. Предполагают, что этот полиол служит шунтовым соединением в катаболизме глюкозы и выполняет, таким образом, функцию регулятора роста [49].

В последние годы маннит обнаружили и у прокариот, например при осмотическом стрессе у *Pseudomonas putita S*12 наряду с Nаацетилглутаминилглутаминамидом (НАГГН) [72]. Интересно, что добавление такого общераспространенного у бактерий осмопротектора, как бетаин приводит к его накоплению и снижению содержания маннита и НАГГН. В то же время оба эти осмопротектора накапливаются в клетке бактерий, если осмофильность среды изменяется в опыте не с помощью NaCl, а сахарозы.

Еще одним углеводом спор является гликоген, синтез которого тесно связан с образованием трегалозы особым температурозависимым механизмом. Этот механизм контролирует активность двух ферментов – гликогенсинтетазы (ГС) и фосфорилазы, а также трегалозо-6-фосфат синтетазы (ТФС). ГС при высокой температуре инактивируется, а ТФС, напротив, активируется, происходит накопление трегалозы и деградация гликогена. Поэтому при высокотемпературном стрессе как у дрожжей, так и у $N.\ crassa$ наблюдается резкое увеличение содер-

жания трегалозы [50]. Циклическое обновление молекул трегалозы происходит только при нагревании, что может быть связано с тем, что именно трегалоза принимает участие в регенерации белков теплового шока при гиперстрессе.

Полиолы обеспечивают устойчивость организмов к обезвоживанию. Так, для дрожжей показано, что устойчивость *Saccharomyces cerevisiae* значительно возрастает, если предварительно дрожжи инкубировали и растворе сахарозы или лактозы [51]. При этом обнаружена интересная зависимость: при инкубации *Saccharomyces cerevisiae* на сахарозе клетки синтезируют маннит, а на глюкозе основным полиолом является инозит.

У грибов также обнаружены белки-криопротекторы. У *Flammullina velutipes*, *P. ostreatus*, как и у растений, эти белки оказались иммунохимически родственны антифризным белкам. В их присутствии изменяется морфология кристаллов льда и проявляется температурный гистерезис [52].

На биохимическом уровне внутриклеточного метаболизма функционируют различные системы ответа на стресс. Многие из них тесно пересекаются и вовлекают общие определенные гены и, таким образом, не полностью независимы друг от друга.

Устойчивость к тепловому шоку.

В ответ на увеличение температуры все живые организмы: бактерии, грибы, растения, животные и человек синтезируют особые белки, называемые белками теплового шока (БТШ), причем отдельные участки БТШ у человека и бактерий сохраняют 90% гомологии [53], что говорит о том, что стрессовые белки как особо важные, имеют консервативный характер. Главная функция БТШ состоит в правильной укладке вновь синтезированных полипептидов и в реукладке неверно уложенных и поврежденных полипептидных цепей. Только правильно уложенные полипептидные цепи, т.е. цепи, имеющие нативную конформацию, могут выполнять свою функцию. При аккумуляции частично денатурированных белков оголяются их гидрофобные области, с которыми связываются белки-шапероны.

Шапероны предотвращают нежелательные взаимодействия между потенциально комплементарными поверхностями белков и присутствуют у всех бактерий, архей и у эукариотных клеток. При восстановлении нативной конформации денатурированных белков происходит совместное действие шаперонов и протеаз, субстратами которых служат неправильно или частично уложенные белки вследствие низкой скорости укладки, химических и термальных стрессов, внутриструктурной нестабильности и ошибок в процессе биосинтеза [54]. Таким образом, действие БТШ состоит в том, что неактивные, неприродные или нестабильные белки узнаются протеазами или шапероновым комплексом, что

приводит к расщеплению белков до низкомолекулярных пептидов или образованию активных природных и/или стабильных белков.

В структурном и функциональном отношении БТШ архей сходны с бактериальными шаперонами, но в отношении последовательности аминокислот сильно от них отличаются и проявляют большое сходство с эукариотным белком под названием TCP1s [55, 56], повсеместно распространенным у эукариот. Большая часть БТШ синтезируется в низких количествах в нестрессовых ситуациях, но их синтез быстро индуцируется при нагревании и других стрессовых воздействиях. Например, при экспозиции молочнокислых бактерий Lactococcus lactis при 42 °C дополнительно появляются от 12 до 17 белков [56].

В случае гипертермофильной археи *Pyrodictium occultum* повышение температуры на 3 °C выше оптимальной температуры (108 °C) приводит к тому, что 80% всех цитоплазматических белков оказываются представленными шаперонами, которые называют термосомой. В присутствии термосомы клетки могут выживать при автоклавировании при 121°C [18, 56]. Представители нескольких видов галобактерий (мезофильных архей) при нагревании до 60 °C образуют дополнительно 4-6 белков с молекулярной массой от 75 до 104, 44-45 и 21-28 кДа [17]. Но в силу активного синтеза БТШ многие другие белки, необходимые для нормальной жизни, образуются в меньших количествах, а потому и соответствующие метаболические реакции протекают с низкой скоростью. Но включение стрессовой программы сохраняет жизнь организма. У *E.coli* и *Васіllus subtilis* индукция БТШ происходит при посредстве альтернативных сигма факторов, которые изменяют специфическое узнавание РНК полимеразой своих промоторов, что приводит к селективной экспрессии генов БТШ [56].

Синтез ряда БТШ у $E.\ coli$ находится под контролем регуляторного гена $htp\ R$ (high temperature protein). Продукт этого гена активирует ряд генов htp, которые расположены в разных частях хромосомы и составляют БТШ -регулон. У $E.\ coli$ выявлено 14 основных БТШ.

В создании или ресоздании функционирующей конформации белков участвуют и другие семейства БТШ, некоторые из которых также относятся к шаперонам. Это небольшие белки 34 кДа или меньше. Одним из членов этого семейства является фермент пептидил-пролил-цис-транс-изомераза (ППизомераза). Эта многочисленная группа белков присутствует у эукариот, бактерий и архей, и роль их очень существенна. Дело в том, что укладка полипептидных цепей, кроме прочего, требует вращения пептидил-пролиловых связей, которое спонтанно происходит с очень низкой скоростью, но ускоряется под действием ПП-изомеразы. [17].

Существует еще одно очень важное условие для создания правильной нативной укладки белка. Показано, что аномальные белки, возникающие в результате стрессов, могут агрегировать, образовывать осадки, становиться токсичными для клетки, вызывать серьезные негативные физиологические изменения. Чтобы избежать негативных последствий, аномальные белки должны быть превращены либо в нативные белки, либо быть элиминированы. Превращение белков в нормально функционирующее состояние осуществляют именно молекулярные шапероны, а элиминированием занимаются белки с протеолитической активностью (их называют шаронины) [54, 57]. У эукариот ключевая протеолитическая система включает убиквитин и протеосому. Белок или его фрагменты, которые должны быть расщеплены, узнаются и метятся убиквитинами, а затем перевариваются протеосомой.

Следует отметить также, что БТШ участвуют в сигнальных путях регуляции метаболизма. Например, показано, что присутствие Hsp70 необходимо для активации фосфатазы, которая путем дефосфорилирования ингибирует протеин киназу JNK, компонент сигнала стресс-индуцированного апоптоза, вызванного высокой температурой, т.е. Hsp70 является частью антиапоптозного сигнального пути [58].

Устойчивость к холоду.

В ответ на холодовой шок у B.subtilis дополнительно синтезируется 3, а у E.coli-9 холодовых шоковых белков [17], однако молекулярный механизм их функционирования неизвестен. При холодовом шоке многие бактерии синтезируют увеличенные количества небольших белков (7κ Да), имеющих высокое сходство (более 45%) в отношении аминокислотной последовательности у ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [59, 60]. Но известно, что психрофилы – бактерии, живущие при температурных пределах от -5 до +20 С, имеют мембраны, текучесть которых увеличена за счет увеличенного количества короткоцепочечных и ненасыщенных жирных кислот (так называемая гомеовязкостная адаптация), их ферменты отличает структурная и функциональная пластичность (адаптивность), и они синтезируют антифризные белки, которые предотвращают рост кристаллов льда.

Определенную роль при холодовом шоке играет модификация суперспирализации ДНК. Показано [61], что негативная суперспирализация плазмидной ДНК *E. coli* увеличивается при холодовом шоке. Холодовой шок так изменяет физиологию бактерий, что они приобретают высокую степень выживаемости в замороженных пищевых продуктах [54]. Более того, бактерии, адаптированные к низким температурам, имеют более короткую лаг-фазу и более высокую скорость роста в зависимости от качества продукта и степени его защищенности.

Ответ на осмотический шок.

Общий механизм, направленный на противостояние микроорганизмов экстремальной солености, связан с выбросом клеткой стрессового солевого агента и аккумуляцией соединений – осмолитов (осмопротекторов), совместимых с клеточным содержимым и структурами и противостоящих внешнему осмотическому давлению. Осмолиты – это небольшие органические молекулы с высокой растворимостью в воде и накапливающиеся в очень высоких концентрациях в цитоплазме клеток, подвергаемых осмотическому стрессу. К осмолитам относят карнитин, трегалозу, глицерин, сахарозу, пролин, маннит, глицерин-бетаин, эктоин, глуцитин, небольшие пептиды. За синтез этих соединений ответственны оѕм-гены, которые включаются в клетках при повышении осмолярности среды.

Бетаин (N,N,N-триметилглицерин) наиболее часто аккумулируется в клетках бактерий в качестве осморегулятора. *E. coli, B. subtilis, Staphylococcus аигеиs* способны к синтезу бетаина из холина под действием холиндегидрогеназы, а также к его транспорту из окружающей среды. Бетаин в больших количествах содержится в сахарной свекле и других продуктах растительного происхождения, и его транспорт охарактеризован для *E. coli* и *S.typhimurium* [62]. Показано, что у *E. coli* транспорт реализуется через конститутивный Na⁺зависимый вторичный транспортер ProP. В условиях осмотического стресса или при низком содержании бетаина индуцируется АТФ- и белокзависимая транспортная система, активность которой сильно увеличивается при изменении осмотического давления.

Растения табака (Nicotiana tabacum L.), в которых экспрессировался ген betA E. coli, оказались на 80% более устойчивыми к высокой концентрации солей, чем нетрансформированные растения [63]. Стрессовые белки могут участвовать в осмотическом стрессе и способствовать правильной укладке частично развернутых полипептидов. Некоторые археи тоже обладают способностью аккумулировать бетаин. Галофильные археи аккумулируют в клетках ионы калия. Показано [64], что дрожжи Saccharomyces cerevisiae в условиях высокой солености также аккумулируют безвредный для клетки осмолит – глицерин и включают механизм экскреции стрессора (избытка NaCl) в окружающую среду. Трегалозу дрожжи также аккумулируют в количествах, которые не оказывают заметного действия на осмотические свойства клеток, но защищают их против высыхания и термоинактивации путем стабилизации белков и поддержания целостности мембраны.

В работе [65] было показано, что при осмотическом шоке начинается инициирование транскрипции генов, вовлеченных в защиту от окислительного стресса, причем осмотический шок не вызывал появления обнаружимого коли-

чества активных форм кислорода. Полные профили экспрессии генов сравнивали, применяя новый двумерный групповой анализ. Транскрипционные профили, следующие за осмотическим шоком в анаэробных и аэробных условиях были количественно очень похожи. В частности показано, что экспрессия генов окислительного стресса при осмотическом шоке стимулировалась, даже если не было очевидной необходимости в их функционировании. Интересно, что клетки адаптировались намного быстрее в анаэробиозе, что было показано уменьшением транскрипционного ответа в этих условиях. Такая быстрая адаптация проходит благодаря усилению синтеза глицерина в анаэробной культуре, который необходим для поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки. Искусственно повышенный синтез глицерина ведет к уменьшению ответа (на стресс) даже в аэробных условиях. Эти наблюдения демонстрируют критическую роль накопления глицерина и восстановления диффузионного равновесия в определении времени реакции клетки, вызванной осмотическим шоком и адаптации клетки к осмотическому шоку.

Другие механизмы повышения устойчивости к осмотическому давлению: избирательное накопление ионов К⁺ при повышении осмолярности среды и синтез внутри клетки полисахаридов с анионными группами. Они удерживают в периплазматическом пространстве катионы. В результате осмотический градиент создается на уровне внешней, а не цитоплазматической мембраны.

Устойчивость к токсичным веществам.

Проникая в клетку, токсиканты вступают во взаимодействие с клеточными компонентами, изменяют проницаемость и дезорганизуют клеточные мембраны (при действии низкомолекулярных углеводородов, фенола), инактивируют ферменты, нарушают синтез белков, АТР, воспроизводство нуклеиновых кислот, образование клеточной стенки. В ответ на эти воздействия и изменения микроорганизмы могут ограничить скорость поступления субстрата-яда в клетку вследствие изменения проницаемости и состава клеточных мембран; увеличения скорости синтеза фосфолипидов; использования активной системы транспорта для удаления соединений из клетки. Токсиканты могут обезвреживаться связыванием активными биологическими соединениями клетки в нетоксичные производные, изменением или утратой чувствительного звена обмена, потерей ферментов, катализирующих превращение исходного соединения или промежуточных продуктов подготовительного метаболизма в стойкие токсические соединения, индукцией ферментов, нечувствительных или менее чувствительных к данному соединению и ферментов, инактивирующих токсичное вещество, амплификацией генов, определяющих устойчивость. Гены, определяющие механизмы устойчивости, находятся иногда в хромосоме, но чаще в плазмидах, в 70% случаев они сцеплены с генами устойчивости к антибиотикам.

Тяжелые металлы, например, могут быть нейтрализованы путем [22]:

- 1) Выброса ионов тяжелых металлов из клетки системами транспорта (неспецифическими, например, системой транспорта $\mathrm{Mg^{2+}}$ и специфическими). Устойчивые к $\mathrm{Cd^{2+}}$ штаммы $\mathrm{Staphylococcus}$ аureus содержат гены устойчивости в плазмиде. Устойчивые клетки обладают системой вывода $\mathrm{Cd^{2+}}$ путем антипорта с протонами $\mathrm{Cd^{2+}/2H^{+}}$. Поступление в клетку $\mathrm{As^{3+}}$ и $\mathrm{As^{5+}}$ регулируется генами, находящимися как в хромосоме, так и плазмидах. Хромосомно обусловленный и плазмидо-обусловленный механизмы устойчивости различны. Так, при плазмидо-обусловленной устойчивости наблюдается синтез высокоспецифичных арсенат выводящих систем транспорта, которые выводят арсенаты из клетки по мере их аккумуляции. Специфичные системы транспорта токсичных катионов или анионов из клетки позволяют избежать выноса жизненно важных для клетки веществ.
- 2) Формирования клеточного барьера, препятствующего поступлению металлов. Капсулированные штаммы *Klebsiella aerogenes* синтезируют внеклеточные полисахариды, плохо проницаемые для ионов металлов и удерживающие их на поверхности клеток. Их внеклеточные полисахариды удерживают на поверхности клеток до 54 и 90% соответственно Си и Сd при их концентрации 10 мг/л среды. Водоросли р. *Mesothaenium* синтезируют водорастворимый полимер, состоящий на 40% из остатков уроновой кислоты и способный связывать медь.
- 3) Связывания индуцируемыми белками, богатыми сульфгидрильными группами металлотионеинами, низкомолекулярными у цианобактерий и высокомолекулярными у кишечной палочки. Синтез этих белков регулируется на уровне транскрипции и индуцируется ионами тяжелых металлов, например Cd^{2+} и Zn^{2+} . У цианобактерий *Synechococcus sp.* гены синтеза металлотионеинов находятся в плазмиде.
- 4) Восстановления ионов металлов редуктазами с последующей диффузией металлов из клетки в окружающую среду (для Hg), восстановлением Se селенредуктазой. Синтез ртутьредуктазы индуцируется сублетальными концентрациями ртути. Гены, определяющие синтез редуктаз ртути и устойчивость микроорганизмов к ртути, как правило локализованы в плазмидах или транспозонах и составляют *mer*-оперон. Селенредуктаза адаптивный индуцибельный фермент. У микроорганизмов, обитающих в средах, богатых селеном, фермент селенредуктаза конститутивный.
- 5) Перевода токсичных соединений металлов в менее токсичные. Детоксификация соединений мышьяка происходит в результате окисления в клетках

микроорганизмов арсенитов в арсенаты. Поскольку As^{3+} значительно токсичнее, чем As^{5+} , то окисление бактериями $\mathrm{As}^{3+} \to \mathrm{As}^{5+}$ приводит к детоксификации мышьяка. При окислении $\mathrm{As}^{3+} \to \mathrm{As}^{5+}$ кислород участвует как акцептор электронов.

6) Взаимодействием с H_2S и фосфатами. Так, у бактерий *Klebsiella aerogenes* обнаружено обезвреживание Cd^{2+} при его взаимодействии с образуемым клеткой H_2S . CdS аккумулируется на поверхности клетки, не проникая в цитоплазму. Устойчивость у бактерии к Cd^{2+} исчезает при отсутствии металла, т.е. имеет место индуцибельный физиологический процесс.

Изменения в результате воздействия стрессовых сублетальных количеств этанола у дрожжей Saccharomyces cerevisiae сходны с теми, что происходят при сублетальном тепловом шоке. Они включают ингибирование брожения, возрастающее уменьшение уровня и интенсивности АТФ-азной активности плазматической мембраны. Этанол в концентрациях (4–10% об.), которые подавляют рост и бродильную активность, является также действенным стимулятором белков теплового шока, включающих группу белков Hsp70, синтезируемых при тепловом шоке. Такое стимулирование происходит выше порогового уровня приблизительно в 4% этанола, хотя различные белки теплового шока и промоторы генов теплового шока оптимально индуцируются при более высоких концентрациях этанола. В дополнение к этому, этанол при концентрациях 6–8% вызывает те же два основных изменения в соотношении белков, включенных в плазматическую мембрану, вызванные сублетальным тепловым шоком — снижение уровней АТФ-азы и накопление в плазматической мембране белка теплового шока Hsp30 [66].

Устойчивость к ультрафиолету.

Многие микроорганизмы синтезируют вещества, способные поглощать УФ-излучение, защищаясь тем самым от повреждающего действия ультрафиолета. Например, в цианобактериях такое свойство обеспечивается пигментом сцитонемином, адсорбирующим в диапазоне длин волн от 280 до 450 нм, а также фикоэритином и фикоцианином [36]. Аналогично, некоторые плесневые грибы и водоросли содержат производные микоспорина, которые имеют узкие адсорбционные полосы в УФ-диапазоне спектра 310-334 нм.

Бактерии *Klebsiella aerogenes* и *Clostridium thermoaceticum* противостоят токсичному действию ультрафиолета и одновременно ионов кадмия через образование CdS на клеточной поверхности. Внеклеточные кристаллы сульфида кадмия с размером 5-200 нм имеют дискретными электронные состояния возбуждения в диапазоне 320-400 нм, при этом при поглощении УФ-квантов фото-

защитный слой из CdS распадается до металлического Cd и элементарной S. Период индукции фотозащиты по такому механизму составляет 4-6 ч [67].

Ответ на окислительный стресс.

Существует несколько механизмов, обеспечивающих защиту жизненно важных биологических структур от действия образующихся перекисей и радикалов.

Первый механизм реализуется благодаря действию ферментов: супероксиддисмутазы (СОД):

$$O_2^{\bullet} + 2H^+ + \bar{e} \rightleftharpoons H_2O_2$$

пероксидазы:

$$R-H + H-OOH \rightarrow R-OH + H_2O$$

и каталазы:

$$2H_2O_2 \rightleftharpoons 2H_2O + O_2$$

У микроорганизмов функционируют две каталазы: katA и katB. KatA является конститутивной, katB – индуцибельной [68-72].

Второй механизм связан с функционированием химических веществпротекторов (антиоксидантов), не являющихся компонентами ферментных систем. При этом реализуются два способа защиты: нейтрализация активных форм кислорода и свободных радикалов; связывание ионов железа, которые способствуют образованию гидроксильного радикала в реакции с H_2O_2 при содержании Fe^{2+} в клеточном матриксе $<10^{-2}$ М. Некоторые микроорганизмы используют ионы Fe^{2+} , Mn^{2+} , а также H_2S и другие восстановители для нейтрализации $O_2^{\bullet-}$. В результате реакции

$$2Fe^{2+} + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow 2Fe^{3+} + 2H_2O$$

происходит детоксикация H_2O_2 и тем самым удаляется один из факторов, ингибирующих рост микроорганизмов.

Также доказана защитная роль дисахарида трегалозы в условиях окислительного стресса. Трегалоза значительно накапливается во время теплового шока и стационарной фазы во многих организмах, улучшает термотолерантность и уменьшает агрегацию денатурированных белков. В работе [73] подвергали Saccharomyces cerevisiae воздействию мягкого теплового шока (38 °C) или протеасомного ингибитора (MG132), что стимулировало накопление трегалозы и заметно увеличивало устойчивость клеток к реактиву Фентона (H₂O₂/Fe²⁺), генерирующему свободные радикалы. После возвращения клеток в нормальные температурные условия (28 °C) или при удалении MG132 из среды содержание трегалозы и устойчивость к кислородным радикалам быстро падала. Кроме того, мутант, не способный синтезировать трегалозу, был более чувствителен в

плане выживаемости к кислородным радикалам, чем клетки дикого типа. Внесение трегалозы извне улучшает устойчивость мутантных клеток к H_2O_2 . Воздействие H_2O_2 на клетки вызывает окислительные повреждения аминокислот в клеточных протеинах, а накопление трегалозы, как было найдено, уменьшает такие повреждения. Даже после кратковременного воздействия H_2O_2 мутант, дефицитный по трегалозе, показал более высокое содержание окислительно поврежденных белков, чем клетки дикого типа.

В работе [74] использовались два набора штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, обладающих различными профилями синтеза трегалозы. Клетки обрабатывали 10%-ным раствором трегалозы (или с помощью тепловой обработки) и затем подвергали воздействию либо менадиона (витамин K₃, источник супероксида) либо трет-бутилгидропероксида (ТВООН). Согласно результатам, трегалоза заметно увеличивает жизнеспособность после воздействия менадионового стресса, причем защитный эффект трегалозы против окислительного повреждения был особенно эффективен при дефиците SOD1 (супероксиддисмутазы). С другой стороны, этот сахар, возможно, не участвует в механизме приобретения устойчивости к ТВООН, поскольку обработка трегалозой (внесение трегалозы из внешнего источника) не усиливала выживаемость клеток. Поэтому был сделан вывод, что трегалоза защищает в первую очередь мембраны клетки от окислительных повреждений.

В институте биохимии им. А.Н. Баха были обнаружены новые антистрессовые молекулы: циклопирофосфат метилэритрита, природные нитроксилы, например трисахарид лизодектоза, являющаяся производным трегалозы [75, 76].

К числу природных антиоксидантов, способных уничтожать избыточную концентрацию перекисных радикалов, относятся каротиноиды, значительные количества которых могут синтезировать отдельные микроорганизмы, в том числе и некоторые виды дрожжей. К другим антиоксидантам относятся тиобарбитуровая кислота и другие серосодержащие соединения. В опытах [77] на Saccharomyces cerevisiae, клетки которой культивировали как в аэробных, так и анаэробных условиях, было показано что в ответ на окислительный стресс значительно повышался уровень активной формы тиобарбитуровой кислоты (ТВАRS), о чем свидетельствовало образование малондиальдегида и повреждение мембранных липидов, причем степень клеточного повреждения связана с составом липидов мембран и положительно коррелирует с увеличением ненасыщенности фосфолипидного жирнокислотного компонента.

К важнейшим факторам антиоксидантной активности клетки следует отнести также NADPH [14a,78]. Результаты работы [79] дают основание полагать, что клеточные механизмы, зависящие от NADPH, являются важными антиок-

сидантными механизмами метаболизма у дрожжей. Используя коллекцию мутантов дрожжей, обладающих дефектами в одном или нескольких генах, кодирующих два главных фермента, ответственных за образование NADPH [глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу (ZWF1) и цитоплазматическую NADP+-зависимую изоцитрат дегидрогеназу (IDP2)], и в генах, кодирующих две основные клеточные пероксидазы [митохондриальную цитохром c пероксидазу (CCP1) и цитоплазматическую каталазу (СТТ1)], были исследованы возможные антиоксидантные функции тиол-зависимых механизмов и прямого каталитического инактивирования Н₂О₂. Было обнаружено, что оба типа механизмов важны для роста в присутствии вносимой H_2O_2 . Однако выяснилось, что в отсутствии внесения оксидантов утрата ZWF1 и IDP2, но не утрата CTT1 и CPP1, вредна не только для роста, но и для жизнеспособности клеток, помещенных в богатую среду, содержащую олеат (олеиновая кислота) или ацетат (уксусная кислота). Потеря жизнеспособности коррелирует с увеличением уровней внутриклеточных оксидантов, несомненно образовывавшихся в течение обычного метаболизма этих источников углерода. Выраженные эффекты в ZWF1 и IDP2 мутантах, следующие за внесением их в эти неподходящие среды, включают увеличение числа клеток, растущих с меньшей скоростью, и клеток, содержащих явные разрывы ядерной ДНК, уменьшение числа почкующихся клеток. Различия становились более выраженными с увеличением времени, прошедшем после выключения ZWF1 и IDP2 генов.

На **генетическом уровне контроля** в ответе на стрессовое воздействие пероксида водорода участвуют система *адаптивного ответа на окислительный стресс* и *SOS-система*. В процессах регуляции принимают участие клеточные гормоны (аллормоны).

Транскрипционными факторами окислительного состояния и ответа на окислительный стресс у E.coli являются OxyR и SoxR. Первый активирует антиокислительные гены в ответ на вторжение в клетку пероксида водорода, а второй — O_2 , в результате чего происходит индукция синтеза антиоксидантных ферментов. Регуляторный белок OxyR взаимодействует с алармоном, в роли которого выступает аденилированный нуклеотид AppppA и контролирует экспрессию по крайней мере 9 H_2O_2 -индуцируемых протеинов [80]. Эти белки важны для регуляции клеточной защиты против окислительной угрозы и включают каталазу, глутатионредуктазу, алкилгидропероксидредуктазу, неспецифичный ДНК-связывающий белок, а также некоторые белки теплового шока. ОхуR связывается с промоторами охуR-регуляторных генов, однако места связывания показывают очень мало сходства в нуклеотидных последовательностях.

ОхуR служит и рецептором сигнала и активатором транскрипции, но только находясь в окисленном состоянии. Дело в том, что окисленный и восстановленный фактор ОхуR может приобретать различную конформацию, а изменение конформации белка при окислении служит сигналом опасности для клетки [81]. Фактор ОхуR содержит шесть остатков аминокислоты цистеина, два из которых Суs_{199} и Суs_{208} выполняют решающую роль в развитии стрессового ответа.

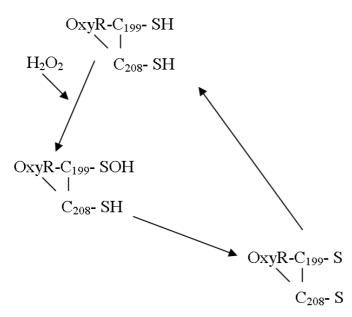


Рис 1. Схема активации и дезактивации транскрипционного фактора ОхуR. В присутствии H_2O_2 Су s_{199} вначале окисляется до сульфоновой кислоты. Этот реакционноспособный интремедиант реагирует с Су s_{208} с образованием дисульфидной связи, переводя ОхуR в активную форму. Окисленный ОхуR ревосстанавливается при восстановлении дисульфидных связей глутаредоксиновой системой.

В клетке ОхуК находится пре-

имущественно в восстановленном состоянии, т.е. он дезактивирован. Полагают, что при окислении OxyR индуцируются ферменты восстановления образованных дисульфидных мостиков, связывающих две выше указанные цистеиновые молекулы, в результате чего вновь восстановленный фактор OxyR готов принять на себя новый удар окислителя в виде H_2O_2 (рис 1).

Обработка пероксидом водорода также вызывает индукцию 107 нуклеотидов некодирующей РНК. Эта небольшая РНК действует как глобальный регулятор, репрессирующий *fhlA* (кодирующий транскрипционный регулятор) и индуцирующий *uhpT* (кодирующий гексозо-6-фосфатный переносчик). Таким образом, бактериальный ответ на пероксид водорода включает по меньшей мере два различных регуляторных механизма: с белковым активатором ОхуR, который переключается с помощью окисления, и 107-нуклеотидную РНК, которая действует и как активатор, и как репрессор генной экспрессии [80].

Обработка бактериальных клеток низкими дозами пероксида водорода повышает их устойчивость к большим дозам H_2O_2 .

При избытке O_2 сигнал воспринимает белковый транскрипционный фактор SoxR и передает его на соответствующие гены, в результате чего происхо-

дит индукция регуляторного белка SoxR. SoxR содержит 4 цистеиновых остатка и молекулу металла в активном центре. По-видимому, изменение редокссостояния металла и служит сигналом для перехода SoxR в активное состояние, в котором сигнал опасности передается в клетку.

В работе [3] изучались адаптивные ответы на окислительный стресс, вызванный воздействием H₂O₂ на Saccharomyces cerevisciae штамм RZ53. В результате было показано, что рост обычных клеток легко тормозится внесением Н₂О₂, а клетки, предварительно экспонированные относительно небольшой подготовительной обработкой H_2O_2 (т.е. клетки, предобработанные сначала низкими концентрациями H_2O_2), способны пережить внесение последующей дозы и продолжать делиться с нормальной скоростью. Наиболее эффективная адаптация наблюдалась при следующих условиях: 5×10⁶ клеток/мл, предобработка или начальное добавление 0,4 mM H₂O₂, интервал между предобработкой и внесением 45 мин., внесение концентрации пероксида 0,8 мМ Н₂О₂ за 2 часа. При этих условиях клетки, обработанные пероксидом без предварительной подготовки, показывают 90% вымирание на чашках Петри. Напротив, клетки, предобработанные пероксидом, выросли и делились со скоростью фактически на 15-30% быстрее, чем такие же непредобработанные клетки, а приблизительно 90-100% таких предобработанных клеток продолжали делиться с нормальной скоростью даже при последующей обработке критической концентрацией H_2O_2 . Усиление устойчивости предобработанных клеток к H_2O_2 было временным, полностью прекращаясь в течение 60–90 минут роста в отсутствии H_2O_2 . Более того, клетки, подвергшиеся деадаптации более чем на 4 часа, снова показывали временный адаптивный ответ при предобработке перекисью. Эти результаты наряду с высокими показателями выживаемости (90–100%) предобработанных клеток показывают, что при действии H_2O_2 происходит истинная временная адаптация к этому стрессору, но не селекция любых до этого присутствующих резистентных к H_2O_2 субпопуляций. Адаптация к H_2O_2 требует индукции определенных белков, что доказано исследованиями с трансляционным ингибитором, циклогексимидом. По крайней мере, 21 протеин показал усиление экспрессии после адаптации к H_2O_2 , в то время как экспрессия 8 других белков была снижена. Предполагается, что причина таких адаптивных ответов лежит в усилении экспрессии генов, которые определяют защитные и восстановительные ферменты.

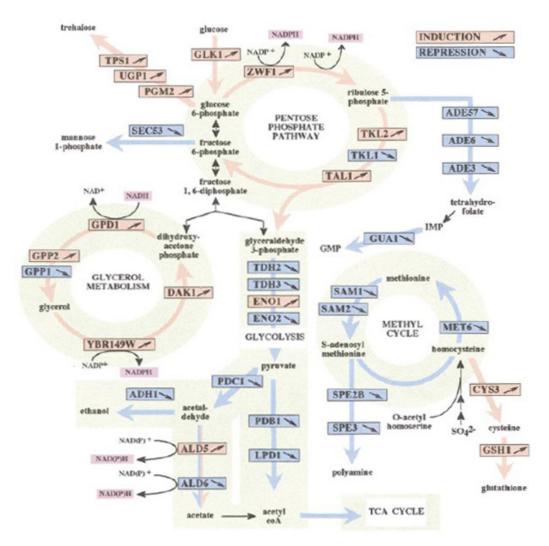
Показано также, что обработка клеток *S. cerevisiae* малыми концентрациями либо пероксида водорода, либо менадиона (супероксид-генерирующий агент) индуцирует адаптивные ответы, которые защищают клетки от летальных эффектов при последующей обработке более высокими концентрациями этих

оксидантов. Предобработка менадионом защищает клетки от вымирания под действием пероксида водорода; однако предобработка с помощью пероксида неспособна защитить клетки от последующего воздействия менадиона. Это позволяет полагать, что адаптивные ответы к этим двум разным оксидантам могут отличаться [11].

Стрессовое воздействие может иметь различные проявления в зависимости от стадии роста и развития, природы стрессора, а также систематического положения организма. В работе [82] было изучено влияние пероксида водорода на дрожжи S. cerevisiae в различные фазы роста. Так, было показано, что более высокая устойчивость к H_2O_2 наблюдается в стационарной фазе по сравнению с экспоненциальной фазой, однако молекулярные механизмы, определяющие такую устойчивость остаются, в основном, неизвестными. Применяя стационарную модель доставки H_2O_2 , было показано, что: 1) клеточная проницаемость к H_2O_2 в пять раз ниже в стационарной, чем в экспоненциальной фазе; 2) выживание клетки коррелирует с клеточным градиентом H_2O_2 в наборе штаммов; 3) клетки в стационарной фазе более восприимчивы к внутриклеточной H_2O_2 , чем в экспоненциальной фазе. И наконец, ограничение диффузии H_2O_2 в клетки является ключевым защитным механизмом против внеклеточной H_2O_2 .

В работе [83] приведены результаты исследований, предоставляющие первую широкомасштабную характеристику геномных процессов, происходящих в эукариотической клетке при воздействии H_2O_2 на примере дрожжей-сахаромицетов и позволяющие узнать направление изменения основных метаболических путей клетки в ответ на окислительный стресс. Изменения в экспрессии генов, определяющих адаптивный стрессовый ответ дрожжей к H_2O_2 , анализировались с помощью двумерного гель-электрофореза совокупных клеточных белков. Синтез по меньшей мере 115 протеинов стимулировался H_2O_2 , в то время как 52 других протеина репрессировались такой обработкой. Было идентифицировано 71 из простимулированных и 44 репрессированных белка. Анализировались кинетические и доза-эффект параметры геномного отклика на обработку H_2O_2 .

Идентификация этих протеинов и их местоположение в определенных клеточных процессах дают отчетливую картину путей, за счет которых дрожжевые клетки адаптируются к окислительному стрессу. Как и ожидалось, H_2O_2 -индуцируемые белки включают некоторое количество важных белков теплового шока и белков, вовлеченных в процесс удаления интермедиатов при воздействии $A\Phi K$. Метаболизм углеводов начинает меняться уже через минуты после воздействия H_2O_2 .



Puc 2. Метаболические пути при ответе на окислительный стресс у S. cerevisiae.

Подавление биохимический путей показано синим цветом, усиление – красным.

При этом активизируются гены метаболизма глицерина и пентозофосфатного пути (рис. 2), обеспечивающего клетки строительным материалом, необходимым для синтеза углеводов, нуклеотидов и белков, пути ассимиляции углеводов перенаправляются на регенерацию NADPH вместо гликолиза, который является основным донором восстановительных эквивалентов в ответе клетки на окислительный и другие виды стресса, при котором активизируется синтез белков антистрессорных систем [78].

Способность микроорганизмов адаптироваться к повышенным концентрациям перекисей и окислительному стрессу находится в согласии с наблюдением о способности микробных клеток к реактивации с течением времени в воде, обработанной озоном [84].

Система SOS-ответа включается при грубых повреждениях в структуре ДНК или в системах ее репликации в результате действия жесткого ультрафиолета или химических мутагенов.

У $E.\ coli$ весь процесс SOS-ответа занимает ~1 час. В состав SOS-системы входит ген $lex\ A$, продуктом которого является белок Lex A — репрессор ряда генов, и ген $rec\ A$, кодирующий белок Rec A. Белок Rec A, активированный сигналом — индуктором SOS-системы, приобретает свойства протеазы и инактивирует репрессорный белок Lex A. В результате разрушения белка Lex A снимается репрессия с генов, участвующих в репарации, в ингибировании деления клеток, наблюдаемом при SOS-ответе, в изменении состава белков внешней мембраны, а также в повышении частоты мутаций (индуцированный мутагенез). Индуцированный мутагенез имеет приспособительное значение — могут появиться мутанты, более приспособленные к условиям, которые вызывают SOS -ответ. Может ли УФА-радиация индуцировать у $E.\ coli$ похожий SOS-ответ остается предметом дискуссии.

В работе [85] изучалась УФА индуцируемая экспрессия гена *ити* на примере *S. typhimurium*. Индукция экспрессии гена увеличивалась с увеличением периода инкубации после облучения и зависела от синтеза сопутствующих белков, свидетельствуя об индукции SOS-ответа в использованных клетках *S. typhimurium*. Экспонирование к низкой плотности потока УФА-излучения также вело к индукции системы адаптивного ответа к окислительному стрессу в тех же самых бактериальных клетках, что делало их устойчивыми к последующим более интенсивным воздействиям той же УФА-радиации.

Адаптивный ответ, как это было прослежено по измерению жизнеспособности и активности β-галактозидазы, увеличивался с увеличением времени экспонирования к сублетальным плотностям УФА, достигая максимума при экспозиции 4,5 кДж/м² (15 мин), и затем постепенно уменьшался с дальнейшим увеличением времени УФА-облучения. Дальнейшие исследования показали вовлеченность и гидроксильных радикалов и синглетного кислорода в УФА-индуцируемую экспрессию гена *ити*.

Таким образом, у S. typhimurium по-крайней мере 2 системы: SOS-ответ и система адаптивного ответа на окислительный стресс могут быть индуцированы воздействием УФА.

Для устранения возникших в ДНК повреждений, индуцированных УФСизлучением и другими мутагенными факторами, организмы используют разнообразные системы репарации, такие как система строгого контроля, система адаптивного ответа клетки, эксцизионная репарация, пострепликационная репарация, фотореактивация (фоторепарация). Система строгого контроля включается в ответ на исключение из среды необходимых клетке аминокислот, источника углерода, солевой шок, падение температуры, при дефиците энергии (в виде ATP). В регуляции ответа участвуют гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат (ррСрр) и гуанозин-5'-трифосфат-3'-дифосфат (рррСрр), координирующие процессы транскрипции и трансляции [85а]. При этом наблюдается снижение общего уровня метаболизма, но активируются некоторые аминокислотные регулоны (триптофановый, гистидиновый), регулоны азотного метаболизма, протеолитические системы клетки, ускоряющие внутриклеточный протеолиз, регулируется активность ряда ключевых ферментов метаболизма, участвующих в образовании нуклеотидов, фосфолипидов, пептидогликана, в транспорте азотистых оснований и т.д. Все это способствует выживанию клетки в стрессовых условиях. Гуанозинполифосфаты аналогичного или иного строения обнаружены в клетках многих про- и эукариот, где они выполняют различные регуляторные функции (по-видимому, наряду с аденозинполифосфатами).

Система адаптивного ответа клетки — индуцибельная антимутагенная система репарации. Ее функционирование приводит к резкому снижению (до 100 раз) частоты мутаций при повторном действии мутагена, хотя на количество первичных нарушений ДНК система не влияет. Более интенсивно начинают работать системы репарации. Время функционирования этой системы ~ 4 час после первого воздействия мутагена. Индукция системы происходит при концентрациях мутагенов в 10–100 раз меньших, чем необходимо для проявления их мутагенного действия. УФ-облучение не индуцирует работу этой системы.

Эксцизионная репарация состоит в удалении поврежденного участка ДНК одной цепи и восстановлении нормальной последовательности оснований по матрице оснований на комплементарной цепи. Вырезание повреждений осуществляется либо непосредственно эндонуклеазой, которая узнает нарушения, либо последовательным действием гликозилазы и апурин/апиримидиновой эндонуклеазы (АР-эндонуклеазы). На следующих стадиях репарации функционируют ферменты хеликаза, ДНК-полимераза, лигаза.

Рекомбинационная репарация, т.е. репарация, включающая рекомбинацию, у *E. coli* представлена двумя типами. Во-первых, это репарация, при которой заполняется пробел в последовательности оснований во вновь синтезированной цепи на месте поврежденного участка. Этот процесс определяется по крайней мере четырьмя генами. Во-вторых, существует процесс связанного с репликацией восстановления двунитевых разрывов в ДНК, возникающих под действием УФ, ионизирующей радиации, митомицина, тоже определяемый активностью нескольких генов.

Фотореактивация наблюдается при освещении клеток видимым или ближним УФ-светом и состоит в разрезании пиримидиновых димеров в ДНК. Процесс фотореактивации связан с действием одиночного фермента фотолиазы (фотореактивирующего фермента, PRE), являющейся флавопротеином. Фотолиаза способна узнавать специфичные димерные повреждения циклобутанового типа, обращая эти димеры в их составляющие пиримидины с помощью видимого или ближнего УФ-света. Действуя как типичный фермент с кинетикой Михаэлиса-Ментен, она связывается с пиримидиновыми димерами (Руг<>Руг) в ДНК, а также в РНК:

hv PRE + Pyr
$$\Leftrightarrow$$
 PRE \bullet Pyr \Leftrightarrow PRE + 2 Pyr ,

при этом специфическое связывание фермента с субстратом светонезависимо, а второй шаг зависит от света. Активация фермент-субстратного комплекса светом длиной волны 300–600 нм приводит к мономеризации димеров. В $E.\ coli$ и дрожжевых клетках фотолиаза циклобутанпиримидиновых димеров может непосредственно выщеплять УФ-индуцируемые пиримидиновые димеры, используя энергию видимого света.

Фотолиазы из различных организмов содержат два нековалентно связанных кофактора; один из них полностью восстановленный флавинадениндинуклеотид (FADH⁻), а другой, известный как второй хромофор, или метенилтетрагидрофолат (МТНF) или 8-гидроксидеазафлавин (8-HDF, 7,8-дидеметил-8-гидрокси-5-деазарибофлавин) [86, 87]. Второй хромофор в фотолиазе – молекула, улавливающая свет, которая поглощает, главным образом, в ближнем УФ и видимом свете (300–500 нм) с высоким коэффициентом экстинции. Второй хромофор затем переносит свою энергию возбуждения на FADH⁻. Затем фотовозбужденный FADH⁻ переносит электрон на Руг<>Руг, генерируя димерный радикал-анион (Руг<>Руг[•]) и нейтральный флавиновый радикал (FADH[•]). Руг<>Руг[•] очень нестабилен и претерпевает спонтанное расщепление, сопровождаемое обратным переносом электрона на FADH[•]. В дополнение к главному каталитическому кофактору FADH⁻, Trp (Trp277 в *E. coli*) в апофотолиазе, независимом от других хромофоров, также функционирует как сенсибилизатор для репарации Руг<>Руг путем прямого переноса электрона.

Спектр действия фотореактивации, подобно спектру адсорбции, по большей части определяется МТНF или 8-HDF хромофорами, в зависимости от типа фотолиазы. Фотолиаза типа 8-HDF, содержащая 8-гидрокси-5-деазафлавиновый хромофор, наиболее активна в видимой области спектра 435—445 нм, в то время

как МТНГ-тип фотолиазы, с 5,10-метенилтетрагидрофолатовым хромофором, имеет максимум активности в ближнем УФ-диапазоне спектра около 380 нм.

Функционируя в фотолиазах как светоулавливающие молекулы, кофакторы МТНF и 8-HDF дополняют светоулавливающую способность FADH $^-$ путем поглощения в регионах ближнего УФ и видимого света, где FADH $^-$ поглощает очень слабо.

Фотолиаза типа 8-HDF найдены у цианобактерий Anacystis nidulans, Agmenellum quadruplicatum, бактерий Streptomyces griseus, Halobacterium halobium, H. cutirubrum и Methanobacterium thermoautotrophicum, зеленых водорослей Scenedesmus acutus, Platymonas subcordiformis, мхов Вгуит pseudotriquetrum, мошек Smittia [86, 86a, 87a].

Фотолиазы МТНГ-типа функционируют у бактерий *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, дрожжей *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, нитчатой плесени *Neurospora crassa* [86, 87].

Для фотолиазы *Neurospora*, также принадлежащей к MTHF-группе, спектр действия (макс. 395 нм) находится между классическим MTHF-типом (380) нм и 8-HDF-типом (440 нм) фотолиаз. Это указывает, что диапазон максимума для спектра поглощения/действия фотолиазы MTHF должен быть расширен от 380 до, по крайней мере, 395 нм. Для этой области был опубликован ряд неклассифицированных спектров действия, например, для фотореактивации в яйцах *Drosophila* и для фотолиазы из растения *Arabidopsis thaliana* [86].

Индукция фотолиазы наблюдается при предоблучении клеток ультрафиолетом или их одновременном облучении ультрафиолетом и видимым светом. Однако она возможна и при освещении флуоресцирующим светом. Такое предоблучение флуоресцирующим светом повышает устойчивость к УФ экспоненциально растущих клеток рыб в темноте или при освещении флуоресцирующим светом [88].

Фотолиаза, связанная с Руг<>Руг в ДНК, не ингибирует, но фактически стимулирует эксцизионную репарацию [89]. Это возможно из-за того, что фотолиаза близко контактирует с 5'-нуклеотидами только в поврежденной цепи ДНК и, по меньшей мере в *E. coli*, по отношению к местам связывания эксцизионной нуклеазы фотолиаза связывается на другой стороне ДНК. Таким образом, возможно, что фотолиаза, связанная с Руг<>Руг просто выглядит подобно одному из аддуктов для эксцизионной нуклеазы применительно к Руг<>Руг, и этим она облегчает репарацию. Таким образом, связывание PRE с поврежденным участком ДНК не обязательно должно ингибировать связывание других репарирующих белков.

Наряду с описанной прямой имеет место непрямая фотореактивация, наиболее выраженная при облучении УФА в области 340 нм. Этот эффект не связан с расщеплением димеров. Нивелирование эффекта УФ-облучения в этом случае объясняется задержкой роста клеток микроорганизмов, в результате чего удлиняется период протекания репарационных процессов. Непрямая фотореактивация, таким образом, не связана с работой каких-либо специальных репарационных систем.

1.4. Перекрестная адаптация к действию разных видов стрессового воздействия

Явление перекрестной адаптации заключается в том, что преадаптация к одному стрессу делает клетки устойчивыми к действию других стрессов. Выше уже упоминалось о некоторых из возможных вариантов перекрестной адаптации.

В стрессовых ситуациях в клетках возникают различные повреждения, поэтому множество систем ответа на стресс и систем репарации функционируют кооперативно. Имеется множество доказательств, указывающих на взаимодействие между системами репарации, например, активацию системы репарации с фотолиазой, особенно на этапе узнавания опасности, индукцию систем ответа на окислительный стресс и SOS-ответа, ответа на окислительный стресс и синтез БТШ и т.д.

Известно, что синтез БТШ может быть вызван воздействием этанола, УФоблучением, H_2O_2 , вирусной инфекцией. Клетки, которые приобрели устойчивость к H_2O_2 , становятся устойчивыми и к тепловому шоку (но не наоборот). После предобработки сублетальной дозой либо окислительного, либо гиперосмотического стресса клетки S. cerevisiae могут противостоять последующей более высокой дозе того же самого стрессового воздействия [90]. К этим двум стрессам также возможна перекрестная адаптация. Клетки дикого типа, предобработанные (адаптированные) к 1% КСІ (агент гиперосмотического стресса) и гиперосмотически устойчивые мутантные клетки могут в большей степени противостоять летальным концентрациям H_2O_2 (10 мм), что объясняется участием антиоксидантов и ферментов репарации (GSH, CAT, SOD) в адаптации дрожжей к осмотическому стрессу, а также синтезом других общих ферментов ответа и на окислительный, и на осмотический стрессы.

В работе [12] была испытана устойчивость 14 штаммов *S. cerevisiae*, клетки которых выращивались до стационарного состояния, к H_2O_2 (0,3 M, 60 мин) и другим стресс-факторам (к температуре (52°C, 4,5 мин), этанолу (20% об., 30 мин), быстрому замораживанию (-196°C, 20 мин, скорость охлаждения 200°C в

мин), медленному замораживанию (-20° C, 24 ч, скорость охлаждения 3° C в мин), соли (рост на 1,5 M NaCl агаре) или уксусной кислоте (рост на агаре с в 0,4% уксусной кислоты). Все штаммы были устойчивы к H_2O_2 стрессору. Корреляционный анализ показал наличие корреляции между устойчивостью к H_2O_2 и к другим стрессовым факторам за исключением этанола. Был сделан вывод, что окислительный стресс в большой степени связан с другими стрессовыми реакциями на воздействие различных факторов, а устойчивость к H_2O_2 может быть маркером для общей оценки устойчивости штаммов к стрессовым воздействиям.

Слабое УФ-облучение делает клетки *L.lactis* устойчивыми к нагреванию, кислотам, спиртам и H_2O_2 [91], а клетки кишечной палочки, адаптированные к химическому стрессу под действием 4-нитрохинолин-1-оксида, приобретают устойчивость к УФ-облучению и к антибиотику — налидиксовой кислоте [92].

Особого внимания заслуживают данные об индукции фотолиазы активными формами кислорода и химическими агентами, повреждающими ДНК в дополнение к УФ-радиации.

Показано, что наряду с флуоресцирующим светом сильным индуктором фотолиазы репарации циклобутанпиримидиновых димеров также является H_2O_2 . Предположено, что регуляция с помощью H_2O_2 происходит на транскрипционном уровне и временной ход индукции фотолиазы под действием H_2O_2 подобен таковому флуоресцирующего света. Обработка флуоресцирующим светом в присутствии рибофлавина, являющегося известным эндогенным фотосенсибилизатором, также усиливала индукцию фотолиазы. Эти результаты предполагают вовлеченность окислительного стресса в индукцию фотолиазы, как и при облучении флуоресцирующим светом [93].

В работе [94] были изучены эффекты температуры и света на концентрацию фотолиазы в гаплоидных клетках *S. cerevisiae*. Число молекул PRE на клетку (N_{PRE}) в клетках, выросших при 37°C было примерно 13% от числа в клетках, выросших при 23°C, хотя количество белка на клетку оставалось тем же самым. N_{PRE} в клетках, выросших на свету было примерно в 2,8 раз больше, чем для выросших в темноте. Значение N_{PRE} в клетках, выросших на свету, уменьшалось более быстро во время выдерживания в буфере в темноте, чем на свету. Падение N_{PRE} в результате выдерживания в буфере в темноте было более быстрым в клетках, выросших на свету, чем выросших в темноте. В клетках, несущих плазмиду, содержащую ген PHR1, N_{PRE} было больше в клетках, выросших при 23 °C, чем при 30 °C. N_{PRE} для клеток в логарифмической фазе роста меньше, чем для клеток в стационарной фазе роста. С учетом более ранних данных о том, что предоблучение PRE молекул *in vitro* вызывало увеличение

фотореактивирующей активности, а также увеличение устойчивости PRE к термоинактивации при 65°C, полученные результаты были объяснены прямыми фотохимическими изменениями в пределах молекулы PRE под действием фотореактивирующего света. Аналогичная модификация наблюдается при действии температуры. В пользу этого объяснения свидетельствуют данные об увеличении термостабильности и числа активных PRE молекул, присутствующих в экстракте из дрожжевых клеток, при иллюминировании ближним УФ или видимым светом коротковолновой области [95].

1.5. Изменение характеристик процессов биосинтеза при действии стресс-факторов

Общепринята точка зрения, что стрессовые условия неблагоприятно сказываются на биосинтетической активности продуцентов, используемых в биотехнологии.

Однако в последнее время появляется все больше данных и об определенном положительном воздействии стрессоров на микроорганизмы, что может использоваться в промышленности [1-3].

Известно, например, что у дрожжей-сахаромицетов особую роль в поддержании функций клеточных мембран, высокой бродильной активности, жизнеспособности клеток дрожжей и устойчивости их к этанолу играет эргостерин (провитамин D_2). Эргостерин не синтезируется в строго анаэробных условиях, но уже микроаэрофильного окружения достаточно для синтеза его в микроколичествах, необходимых для клетки [96]. В то же время воздействие стрессовых факторов на дрожжевые клетки может вести к адаптационным изменениям, сопровождающимся накоплением эргостерина. Стимулирующее действие на образование стеринов дрожжами оказывают ингибиторы гликолиза, в качестве которых могут выступать различные химические окислители, УФ- и рентгеновское излучение. При действии на дрожжи рентгеновского излучения содержание эргостерина увеличивается в 2-3 раза, что объясняется угнетением процесса аминирования, сопровождающегося повышением синтеза липидов. Подобно ионизирующим облучениям действуют радиометрические вещества, нарушающие метаболизм клетки и стимулирующие липидный обмен. Например, при комбинированном воздействии на клетки дрожжей радиометрического вещества (эмбихина) и рентгеновского излучения выход стеринов S. cerevisiae увеличивается на 109% по сравнению с контролем [10]. Также было показано, что при термической обработке (при температуре 40°C в течении двух суток) содержание эргостерина увеличилось с 55 мг/г до 87 мг/г. При обработке холодом

дрожжевые клетки также накапливали эргостерин [97]. Таким образом, воздействие стресс-факторов может использоваться в промышленных условиях для повышения выхода эргостерина, синтезируемого дрожжами *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, которые содержат его до 3–4 % по сухому весу, а некоторые штаммы при продолжительной инкубации до 8–10% [96]. Имеются предварительные данные и о возможности стимулирования бродильной активности сахаромицетов при воздействии пероксида водорода в условиях, в которых повышение бродильной активности нельзя объяснить только стимулированием синтеза эргостерина [2].

Биосинтез вторичных метаболитов, таких как пенициллины, гиббереллины, каротиноиды, меланины, и ряда других соединений зависит от присутствия агентов окислительного стресса. Молекулярные механизмы, лежащие в этих зависимостей еще далеко не расшифрованы, но очевидно, что появление вторичных метаболитов является результатом функционирования ферментов, чей синтез и/или активация индуцированы действием стрессорных факторов. Так биосинтез каротиноидов в ответ на освещение и кислород – защитная реакция на окислительный стресс [5]. Показано, что голодание, радиация, высокий уровень активных форм кислорода способны стимулировать каротиногенез и регулировать состав каротиноидов у *Phaffia rhodozyma* [98, 99], *Neurospora crassa* [14], *Blakeslea. trispora* [100], *Halobacterium salinarium* [101] и многих других микроорганизмов.

Ввод дополнительной энергии сильных окислителей (таких, например, как O_3 , реактив Фентона H_2O_2/Fe^{2+} , перманганат калия и др.), УФ-облучения, ионизирующей радиации в биологические системы в наибольшей степени зарекомендовал себя в области биодеструкции различных органических отходов и загрязнений и биологической очистки загрязненных потоков. Зачастую ввод дополнительной энергии в загрязненную экосистему перед биологической очисткой может приводить к увеличению в несколько раз количества разрушенного органического вещества по сравнению с обычным процессом [25, 24, 102]. С другой стороны, показано, что непосредственное воздействие окислительных стрессоров, в частности H_2O_2 , на микроорганизмы-деструкторы может благоприятно влиять на скорость биодеструкции и качество очистки сточных вод [1,6,7], играть положительную роль в отношении поддержания физиологической активности микроорганизмов [1], что позволяет говорить о важности оптимальных воздействий факторов окислительного стресса (перекисей, радикалов, УФизлучения) на популяции микроорганизмов в системах биодеструкции [8, 1, 9].

Эти примеры указывают на принципиальную возможность реализации микробиологических систем культивирования, в которых управляющими факторами будут выступать стрессорные агенты (УФ-излучение, пероксид водоро-

да и др.). Воздействия стрессоров-окислителей в оптимальных дозах могут повысить биодоступность, выход целевого продукта и полноту утилизации субстратов, скорость суммарного процесса. В то же время стрессорные агенты, одними из которых являются агенты окислительного стресса, агрессивны по отношению к живым организмам, поэтому воздействие стресс-факторов на клетки микроорганизмов может оказаться труднореализуемым подходом для повышения их физиологической и биосинтетической активности.

1.6. Совместное действие стресс и антистресс-факторов. Использование света низкой интенсивности для стимулирования биологической активности.

Рассмотренные особенности стресса, физиологических, биохимических, генетических изменений у микроорганизмов в стресс-индуцированном состоянии указывают, что с точки зрения совершенствования процессов биосинтеза и управляемого культивирования в качестве управляющих факторов целесообразно исследовать не раздельное, а совместное действие стресс- и антистрессфакторов.

В самом деле, в природных средах такие одновременные воздействия наблюдаются повсеместно. Например, на освещенных солнечным светом поверхностях воды, почвы, растений, где процветает жизнь, в результате фотохимического воздействия ультрафиолета образуются H_2O_2 и другие активные формы кислорода, частицы радикалов [103, 20, 21], локальные зоны с повышенной температурой, индуцирующие у различных организмов реакции ответа на окислительный стресс и тепловой шок. Одновременно видимый свет участвует в нейтрализации негативных изменений через механизмы фоторепарации и перекрестные реакции. Химические вещества, находящиеся в среде, могут одновременно оказывать прооксидантное и антиоксидантное действие. Удивительно, но до настоящего времени в литературе по культивирования микроорганизмов такому комбинированному действию как методу управления биосинтезом, не уделялось внимания, не учитывались экологические особенности таких поверхностных ниш.

С методической, технологической и экологической точек зрения наибольшего внимания заслуживает видимый свет как наиболее универсальный антистресс-фактор.

Имеются многочисленные литературные данные о воздействии видимого света не только на фототрофов, но и на гетеротрофов, в результате чего стимулируется их активность и происходят метаболические изменения. Свет может

непосредственно стимулировать и активность не только фотолиазы, но и других ферментов. Так, при облучении видимым светом и УФ стимулируется активность гидрогеназы из *Proteus vulgaris*, оксидазы индолилуксусной кислоты из гороха, ксантиноксидазы из свежего молока и уроканат гидратазы из *Pseudomonas putida* [98]. У *Rhodococcus* sp. активность нитрилгидратазы восстанавливается при освещении светом в аэробных условиях при инкубировании промытых клеток при 5°С, в то время как в темноте в аэробных условиях нитрилгидратаза инактивируется после нескольких дней. Ферментативная активность бесклеточных экстрактов инактивированных клеток также восстанавливалась при фотооблучении. Этот процесс не требовал кислорода и не предотвращался диализом [104].

Эффекты могут обнаруживаться при весьма низкой интенсивности воздействия света. В этой связи заслуживают внимания данные о воздействии низкоинтенсивного лазерного облучения (НИЛИ) и других когерентных волн малой интенсивности КВЧ, ИК оптического и УФ диапазонов на живые организмы [105–112].

Фотобиологические эффекты низкоинтенсивного лазерного излучения (с плотностью мощности светового потока от 0,1 до 100 мВт/см², что сопоставимо с интенсивностью излучения Солнца на поверхности Земли), наблюдаются в ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном диапазоне спектров при действии на различные биологические объекты [113].

Показано, что НИЛИ, в частности излучение в красной области видимого света (гелий-неоновый лазер и др.) стимулирует метаболическую активность биологической клетки, активизирует работу ядерного аппарата, синтез ДНК и РНК, выработку АТФ в митохондриях, повышает эффективность работы дыхательной цепи митохондрий, усиливает основные биоэнергетические процессы, в частности, окислительное фосфорилирование. В то же время количество потребляемого кислорода уменьшается. Повышение энергетической активности биологических мембран, приводит к увеличению активности транспорта веществ через мембрану.

Стимуляция биосинтетических процессов может быть одним из важных моментов, определяющих действие НИЛИ на жизнедеятельность и важнейшие функции клеток.

Эффекты НИЛИ объясняют избирательным поглощением лазерного излучения различными компонентами и веществами клеток. Так, пигмент меланин поглощает свет наиболее активно в фиолетовой области, порфирин и его производные – в красной. Пептидные группы белков наиболее эффективно поглощают излучение электромагнитных волн с длиной волны 190 нм, карбонильные

группы – 225 нм, триптофан – 220 и 280 нм, тирозин – 275 и 222 нм, фенилаланин – 258 нм, каталаза -628 нм, максимальная спектральная чувствительность молекул ДНК соответствует длинам волн 620 нм и 820 нм. В качестве специфических фотоакцепторов могут выступать в красной области спектра каталаза, супероксиддисмутаза, цитохромоксидный комплекс аа₃, порфирины, молекулярный кислород с образованием синглетного кислорода. Поглощение лазерной энергии происходит и различными молекулярными образованиями, не имеющими специфических пигментов и фотобиологических мишеней. Вода поглощает видимый свет и красной части спектра. Это меняет у мембран структурную организацию водного слоя и изменяет функцию термолабильных каналов мембран. НИЛИ также может нарушить слабые взаимодействия атомов и молекул облученного вещества (ионные, ион-дипольные, водородные и гидрофобные связи, а также ван-дер-ваальсовые взаимодействия), при этом появляются свободные ионы, т.е. происходит электролитическая диссоциация.

Однако, учитывая отмеченные особенности воздействия НИЛИ, самым разумным представляется объяснение об одновременном прооксидантном и антиоксидантном действием лазеров.

Прооксидантное воздействие объясняется образованием электронных возбужденных состояний и продуктов фотолиза (первичных фотопродуктов и первичных стабильных химических продуктов) при действии лазерного излучения. Миграция и трансформация энергии электронного возбуждения веществ биообъекта при лазерном воздействии может запускать ряд сопутствующих физико-химических процессов в организме, при этом часть энергии превращается в тепло, часть испускается в виде квантов флуоресценции, реализуется в триплетных состояниях атомов или молекул, фотохимических реакциях, передается другим молекулам, что приводит к генерации синглетного и других активных форм кислорода, инициирующих в дальнейшем, физиолого-биохимические процессы и запуск различных биологических реакций.

Антиоксидантный эффект НИЛИ обусловлен влиянием на структуру клеточных мембран, активность ферментов антиперекисной, антиоксидантной защиты и на интенсивность свободнорадикального окисления в липидной фазе мембран клеток. Наблюдается эффект фотореактивации, приводящий к уменьшению частоты мутаций, вызванных химическими мутагенами, ускорению процессов репарации в клетках, подвергнутых потоку нейтронов или гаммарадиации.

Избирательное действие лазерного излучения на биологический объект может быть дополнительным инструментом для управления процессами мета-

болизма и селекции в популяциях одноклеточных организмов (бактерий, дрожжей, низших грибов, водорослей).

Обобщая рассмотренные особенности стресс-факторов, их воздействие на микроорганизмы, регуляции внутриклеточного метаболизма можно отметить следующее:

- из различных стрессоров в качестве инструмента управления микробным метаболизмов наиболее целесообразно апробировать активные формы кислорода, в частности, пероксид водорода и мягкий ультрафиолет, действие которых наблюдается во многих природных экотопах, в том числе и таких, где живые организмы наиболее активно развиваются (приповерхностная пленка воды, поверхность почвы, листьев и т.п.);
- при действии стрессоров необходимо учитывать совместное действие стресс- и антистресс-факторов;
- в качестве антистресс-фактора целесообразно рассмотреть полихроматический или монохроматический видимый свет;
- гетеротрофные микроорганизмы в стресс-индуцированном состоянии могут стать чувствительными к низкоинтенсивному воздействию света, что, однако, требует целенаправленных исследований;
- возможна перекрестная адаптация к действию стрессоров различного типа, а также перекрестный ответ клеток микроорганизмов на совместное действие стресс- и антистресс-факторов, в частности, при одновременном воздействии факторов окислительного света и видимого света;
- целесообразно исследовать комбинированное воздействие стрессоров и антистрессоров с целью улучшения показателей процессов культивирования.

В этой связи из гетеротрофных микроорганизмов одним из наиболее интересных, практически значимых и в то же время хорошо изученных объектов исследований могут быть дрожжи рр. Candida и Saccharomyces. Эти дрожжи являются привлекательной моделью, так как в природе обитают в приповерхностной зоне и на поверхности различных сред, где подвергаются различным воздействиям экологических факторов, включая излучение Солнца. Сахаромицеты как факультативные анаэробы легко переключают свой метаболизм с аэробного на анаэробный. Будучи эукариотами они имеют много сходств с клетками млекопитающих. Их использование имеет такие преимущества, как легкость культивирования и возможность получения большого числа клеток, короткое время генерации. Другие преимущества дрожжей – обширные знания о генетике дрожжей и доступность их генома. Дрожжевые клетки относительно устойчивы к экстремальным значениям внешних факторов, таких как высокие и

низкие значения рН и температуры, присутствие и отсутствие кислорода, изменения в осмотическом давлении, ионной силе и полярности среды.

Дрожжи демонстрируют широкий спектр ответов на стресс, когда попадают в условия, отличающиеся от оптимальных в худшую сторону. Эти ответы включают аспекты чувствительности клеток (к стрессовым факторам), передачу сигнала, транскрипционный и посттрансляционный контроль, накопление защитных веществ и активизацию репарирующих функций. Эффективность этих процессов в определенном дрожжевом штамме определяет его устойчивость и, в широком смысле, способность штамма удовлетворять необходимым коммерческим стандартам в производственных процессах [114].

Использование дрожжей р. *Candida* для получения кормовых продуктов и дрожжей-сахаромицетов в традиционных биотехнологических производствах, таких как хлебопечение, пивоварение, производство спирта и виноделие протекает в условиях воздействия различных стрессовых факторов окружающей среды.

Другим объектом исследований, заслуживающим повышенного внимания с точки зрения природной среды обитания, возможностей регулирования метаболизма, практической значимости, сопоставления закономерностей отклика на стресс у эукариот и прокариот могут быть галобактерии.

1.7. Галобактерии как перспективный объект исследований

1.7.1. Среда обитания, таксономическая и биохимическая характеристика галобактерий

Галобактерии (ГБ) – уникальная группа микроорганизмов, заселяющая самые соленые водоемы на Земле, которые обычно встречаются в жарких местах. Они лучше всего растут в средах, которые содержат 20-30% NaCl, т.е. в насыщенных растворах поваренной соли. Галобактерии живут в Великом Соленом озере, в Мертвом море, в морских солеварнях [115].

Галобактерии принадлежат к группе Archebacteria, куда кроме них входят ещё метаногены, термоацидофилы, сульфатредукторы и др., т.е. виды, живущие в экстремальных условиях [116]. Характерными представителями облигатных галофилов являются р. *Halobacterium* и р. *Halococcus*. Довольно широко известными видами рода *Halobacterium* являются Γ^- палочки *H. halobium*, *H. salinarium*, *H. cutirubrum*, *H. vallismortis* и др.

Галобактерии известны как объект самых разнообразных микробиологиче-

ских, генетических и биохимических исследований. Общепризнано, что этот интерес связан, прежде всего, с их способностью использовать энергию солнечного света для частичного обеспечения энергетических потребностей внутриклеточных процессов биосинтеза, а также с уникальными требованиями к ростовым условиям, выраженными в потребности необычайно высокой концентрации NaCl.

Клетки р. *Halobacterium* в нормальных условиях обитания (имеется в виду прежде всего концентрация соли в среде) имеют палочковидную форму, размеры которой разные авторы определяют от 0,5-1,0 : 1,0-6,0 мкм до 0,5-3,0:10,0 мкм [117, 118, 119]. При незначительных снижениях концентрации соли в среде (<2,5М) появляются плеоморфные формы, которые при 1,5 М NaCl становятся сферическими в результате утраты клеточной стенки [119]. При этом объём клетки не изменяется. Концентрация соли 0,5-1,0 М вызывает лизис клеток [115, 119, 120, 121]. Раньше считалось, что единственным определяющим фактором лизиса является осмотическое давление. Однако позже было показано, что главную роль здесь играют клеточные оболочки, адаптированные к высоким концентрациям ионов в окружающей среде.

Концентрация NaCl, необходимая для роста и поддержания формы клеток— 3-5 М [122]. Не было обнаружено соли, которая могла бы заменить NaCl в какой-либо степени.

Повышение температуры также воздействует на морфологию галобактерий, как и разведение солевого окружения. При 60-65°С клетки, суспензированные в 25%-ном растворе NaCl, трансформируются в кокки и лизируют [121, 117].

Высокие солевые концентрации в среде обитания галлофилов вызывают естественный интерес к внутреннему содержанию ионов, ведь клетки в суспензии подвержены высокому осмотическому давлению. Ещё в 1953 году N.Gibbons и R. Вахтег, измеряя содержание хлора в клетках ГБ, пришли к выводу о достаточно высоких концентрациях внутриклеточных ионов, сравнимых с наружными. Однако доминирующим ионом в клетках оказался К⁺ [123], хотя его содержание во внешней среде весьма незначительно по сравнению с Na⁺. По мнению J.K. Lanyi, ГБ способны удалять ионы Na⁺ из внутренней среды, заменяя их на К⁺, более совместимый с метаболическими процессами. Если подсчитать общее содержание в клетках Na⁺ и К⁺, то оно превысит содержание Na⁺ в среде на единицу объёма. Внутриклеточная концентрация хлорид-иона меньше, чем наружная. Другие низкомолекулярные компоненты (аминокислоты, фосфаты) выявлены в клетках в незначительных количествах [121].

Установлено, что К⁺ очень медленно выходит из клетки. Это даёт возмож-

ность предполагать, что K^+ , в отличие от Na^+ , находится в клетке в связанном состоянии, причём одна часть катионов уравновешена Cl^- , а другая – органическими анионами [124].

Одним из важнейших таксономических признаков галобактерий является содержание в ДНК ГЦ-пар. У экстремальных галофилов эта величина составляет примерно 66-68 %. Кроме того, все экстремальные галофилы имеют незначительный сателлитный компонент ДНК с долей ГЦ-пар 57-60 мол %, который отделен от основной ДНК, и, в отличие от неё, не содержит повторяющихся последовательностей нуклеотидов [120].

Генетической особенностью галофильных микроорганизмов является их свойство давать спонтанные мутации. При культивировании образуется около 10% мутантных клеток. Такая необычно частая мутация может быть объяснена тем, что изучаемые микроорганизмы относятся к классу архебактерий, которые прошли огромное количество стадий эволюции и очень тонко реагируют на малейшие изменения условий выращивания [125].

По данным рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии, клеточная оболочка ГБ состоит из клеточной мембраны и двух наружных белковых слоёв. Внешний слой представляет собой совокупность правильно упакованных частиц белковой или гликопротеиновой природы и идентифицирован как клеточная стенка. Между ней и клеточной мембраной находится внутренний белковый слой толщиной 20 ангстрем, отделённый от внешнего пространством шириной 65 ангстрем, электронная плотность которого приближена к электронной плотности окружающей клетку среды.

Клеточная стенка состоит из частичек приблизительно сферической формы от 130 до 150 ангстрем в диаметре [115, 122], упакованных в гексагональные структуры. Гексагональная структура поверхности клеточной стенки сохраняется при снижении концентрации в среде NaCl от 4,5 до 2,5 М, т.е. в условиях, когда клетки ГБ принимают сферическую форму.

К настоящему моменту достаточно достоверно показана зависимость структуры клеточных мембран галлофилов от высоких солевых концентраций в среде, что лишний раз свидетельствует о глубоких биохимических адаптациях организма к экстремальным условиям обитания.

Показано, что клеточная мембрана *H. halobium* имеет структуру ассиметричного белкового бислоя и содержит много гидрофобных белков, проникающих глубоко в липидный слой [122].

Поскольку ГБ обитают в необычных условиях, характеризующихся высоким уровнем содержания солей в среде, в большинстве случаев высокой ин-

тенсивностью света и низким содержанием кислорода в среде, эти условия, естественно, нашли своё отражение в необычных биохимических свойствах организмов и, прежде всего, в химическом составе и структуре оболочки бактерий, которая имеет непосредственный контакт с агрессивной средой.

Липиды ГБ необычны. Они не являются производными диацилглицеринов и почти не содержат азота [120]. Почти все липиды принадлежат к фосфолипидам, характеризующимся практически полным отсутствием жирных кислот. В состав липидов входят жирные спирты, которые не содержат двойных связей. Основной липидный компонент идентифицирован многими авторами [120, 121, 126, 127] как диэфирный аналог фосфатидилглицерофосфата. Гидрокарбоновые цепи такого соединения представляют собой С₂₀-цепи, каждая из которых состоит из 4-х остатков изопрена [120]. 22% общих липидов ГБ локализованы в оболочке. Сплошной липидный слой пронизан большим количеством пор, образованных функциональными белковыми структурами.

В оболочке клеток *Н. halobium* содержится 65% белка. Белки галобактерий, несомненно, отличаются от таковых у негалофилов, о чём свидетельствует тот факт, что белок, обеспечивающий ригидность оболочки ГБ, растворяется в среде с низкой ионной силой.

Анализ как общих аминокислот, так и очищенного белка показывает, что за исключением некоторых белковых комплексов, белки ГБ содержат больше полярных и меньше гидрофобных остатков, чем соответствующие негалофильные белки. Кроме того, белки ГБ экстремально кислые. Ярким примером кислого белка ГБ является гликопротеин, главный компонент клеточной стенки. По структуре он сходен с поверхностными гликопротеинами клеток эукариот [120]. Гликопротеин содержит 10-12% сахаров двух типов: треонин-подобный ди- или трисахарид, не содержащий аминосахаров, и аспарагинподобный сахарид, содержащий наряду с гексозами аминосахара. Гликопротеины придают клеточной стенке стабильность и жёсткость [120, 128].

Ещё одной важной характеристикой организмов р. Halobacterium является отсутствие в клеточной стенке мурамовой кислоты [129], столь важного компонента пептидогликана у негалофилов.

Особой чертой экстремальных галлофилов является пигментация этих организмов. Все известные виды содержат пигмент, окрашивающий клетки от ярко-желтого до пурпурных цветов, за исключением некоторых мутантных штаммов, не содержащих пигмент.

Ещё в 1922 г. было высказано предположение, что пигментация—это защита бактерий от яркого солнечного света. Позднее эта гипотеза подтвердилась

экспериментально.

Наиболее часто встречающаяся красная окраска ГБ обусловлена наличием в клетках каротиноидов, и прежде всего, α -бактериоруберина—основного пигмента галофилов [115, 122]. Бактериоруберины представляют собой C_{50} -каротиноиды [130, 131], содержащие две, три или четыре гидроксильные группы, расположенные на терминальных концах алициклической полиеновой цепи.

Синтез каротиноидов происходит интенсивнее в клетках, освещенных сине-фиолетовым светом с длиной волны 380-450 нм, и менее интенсивно при освещении красным светом с длиной волны 590 нм.

Значительную роль в синтезе каротиноидов в клетке играют содержащиеся в среде глицерол и глюкоза. В частности, глюкоза стимулирует синтез бактериоруберинов [132].

На основе разработанного метода анализа пигментов галобактерий показано, что свет улучшает биосинтез бактериоруберина и конверсию β -каротина в ретиналь, но не влияет на биосинтез β -каротина у штамма *Halobacterium salinarium* Oyon Moussa-16. Дефицит кислорода на свету приводит к незначительному увеличению в накоплении ретиналя [101].

Каротиноиды у галобактерий выступают антиоксидантами [133, 134, 135], также относящиеся к классу липидов. Имеются сообщения [135, 136, 137], что каротиноиды в определенных условиях приобретают прооксидантные свойства. При взаимодействии их как антиоксидантов с активными формами кислорода в реакциях окисления – дезактивации могут образовываться токсичные соединения.

Продукты химического и фотохимического окисления, приводящие к образованию перекисных и радикальных частиц [14, 100], участвуют в регуляции синтеза каротиноидов на внутриклеточном уровне, стимулируя в первую очередь синтез каротиноидов.

При помещении клеточных оболочек ГБ в дистиллированную воду, они дезинтегрируют на фрагменты различной величины. При центрифугировании в градиенте плотности сахарозы из смеси фрагментов можно выделить отдельную фракцию пурпурного цвета [138], пурпурные мембраны (ПМ) – дифференцированные участки клеточной оболочки, занимающие около 50% общей поверхности клетки [119].

Ключевым компонентом ПМ является ретиналь-содержащий белок **бакте-риородопсин** (**БР**), впервые обнаруженный в 1971 году [139]. В составе пурпурных мембран БР образует двумерные кристаллы с гексагональной решеткой. Эти участки содержат сам белок, некоторые липиды, каротиноиды и воду. ПМ видны в электронный микроскоп как округлые или овальные пластинки

диаметром около 0,5 мкм и толщиной 48-50 ангстрем [140]. Высушенные на холоде ПМ *Н. halobium* и *Н. cutirubrum* содержат 75% белка и 25% липидов [141]. И белок, и липиды настолько взаимозависимы в ПМ, что ни один из компонентов не воспроизводит в отдельности свойств нативной мембраны [142].

Липиды ПМ галобактерий представляют собой дифитаниловые аналоги ФГФ, ФГС (фосфатидилглицеросульфат) и ФГН. Позже был выделен четвёртый фосфолипид в составе ПМ, идентифицированный как фитаниловый аналог кардиолипина [141]. Бактериоруберин в составе ПМ не обнаружен.

ПМ – очень стабильный биологический материал. Они могут храниться в течение нескольких месяцев при комнатной температуре и освещении. ПМ устойчивы к солнечному свету, воздействию кислорода, температуре более чем 80°С (в воде) и до 140°С (сухие), рН от 0 до 12, высокой ионной силе (3 М NaCl), действию большинства протеаз, чувствительны к смесям полярных органических растворителей с водой, но устойчивы к неполярным растворителям типа гексана. Хромофор сохраняет свои свойства в диапазоне рН от 1 до 10, выдерживает температуру до 80-100°С. Чистый белок менее устойчив к экстремальным воздействиям. Большое практическое значение имеет существующая возможность встраивания ПМ в полимерные матрицы без потери фотохимических свойств.

Обычно синтез ПМ имеет место при высокой плотности клеток в культуральной жидкости и низком давлении кислорода. Анализ мембранных фракций в сахарозном градиенте показал, что в экспоненциальной фазе роста клетки содержат пурпурные и бурые мембраны (БМ), причём плотность БМ несколько выше плотности ПМ. На более поздних стадиях роста отмечено уменьшение доли бурой фракции с соответствующим повышением доли ПМ [143]. Количество ПМ достигает максимума в стационарной фазе [144], причём клетки, культивируемые на свету, содержат в 6-7 раз больше ПМ, чем темновая культура.

Спектр поглощения ПМ показывает два максимума — при 560 и 280 нм. При кратковременном освещении ПМ наблюдается эффект обесцвечивания. При этом максимум поглощения смещается от 560 к 415 нм. При комнатной температуре 415-комплекс за несколько секунд спонтанно реверсирует в исходное состояние. Освещение красным и синим светом при комнатной температуре вызывает сдвиг максимума поглощения на 12 нм от исходного уровня. На основе этих и ряда других наблюдений Остерхельт с сотр. в 1971 г. пришли к выводу, что ПМ функционируют как фоторецептор, главную роль в котором играет БР [139].

Галофильные микроорганизмы имеют три энергетические системы: цепь дыхания — окислительное фосфорилирование, фотофосфорилирование с использованием имеющейся фотохимической системы на основе белка бактериородопсина и фосфорилирование за счет деградации аргинина [124, 145]. Первые две системы имеют наибольшее физиологическое значение. На свету галофилы потребляют меньше кислорода, чем в темноте. В анаэробных условиях в темноте клетки очень быстро используют остатки кислорода и истощают уровень АТФ до минимального. Снижение уровня АТФ происходит очень стремительно. Однако довольно быстро уровень АТФ восстанавливается до 30% от начального количества. Это говорит о том, что клетки выключают большинство своих энергопотребительных функций, прежде чем резерв АТФ будет истощен. Эти функции реактивируются, когда кислород или свет снова появляются в качестве источника энергии.

1.7.2. Бактериородопсин и его функции

Фотосистема преобразования энергии солнечного света в электрохимическую энергию у галофильных бактерий р. Halobacterium на основе бактериородопсина уникальна. Она включается в условиях дефицита кислорода, когда окислительное фосфорилирование становится невозможным. Таким образом, физиологическая роль ее заключается в том, чтобы обеспечивать галобактериям возможность существования как факультативным анаэробам в случае недостатка кислорода в окружающей среде. БР функционирует в ней как система преобразования света в химическую энергию, которая запасается в синтезируемых молекулах АТФ [139]. Бактериородопсин включен в цикл такого "солнечного дыхания" как основное звено: молекулы бактериородопсина служат насосом, который под действием солнечного света выкачивает Н⁺-ионы из клеток наружу. Возникающий в результате этого переноса градиент концентрации Н ионов, создаваемый на свету посредством функционирования фотоцикла данного белка, является источником энергии для синтеза АТФ. Наличие двух систем преобразования энергии поддерживает динамическое равновесие между двумя системами фосфорилирования на постоянном уровне и позволяет выживать галобактериям в различных экстремальных ситуациях.

Молекулярная масса БР составляет около 25 кД [125]. Одна молекула БР состоит собственно из белковой части – бактериоопсина (БО) и связанной с ней молекулой *транс*-ретиналя. Анализ аминокислот БО свидетельствует о наличии только одного вида белка в ПМ. Одна бляшка ПМ содержит около 105 мо-

лекул БР, ориентированных в одном и том же направлении.

Согласно общепринятой модели строения БР, каждая молекула белка состоит из 7 α-спиральных сегментов, которые пересекают мембрану почти под прямым углом к её плоскости. В составе белка 248 аминокислот. N- и С-концы полипептидной цепи находятся по разные стороны цитоплазматической мембраны: N-конец обращен наружу, а С-конец - внутрь клетки (рис. 3A). Вообще, α-спираль является доминирующим типом вторичной структуры в БР. α-спирали образуют водородные связи с аминокислотами соседних цепей. Молекула БР организуется в кристаллическую систему, что исключает её подвижность и вращение вокруг отдельных атомов углерода.

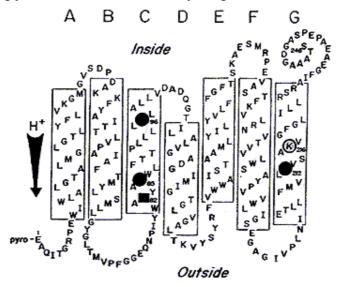


Рис. 3А. Модель БР в элементах вторичной структуры. Выделены аминокислоты, участвующие в протонном транспорте: кружками – остатки аспарагиновой кислоты, квадратом – остаток аргинина. С Lys-216 (K-216) образуется основание Шиффа (SB). Стрелкой показано направление протонного транспорта.

Хромофор БР – протонированный альдимин ретиналя с є-аминогруппой остатка Lys-216 размещен в гидрофобной части молекулы. После поглощения кванта света в ходе фотоцикла происходит изомеризация ретиналя из all-Е в 13Z-форму. Белковое микроокружение хромофора может рассматриваться как рецептор с субстратной специфичностью для all-Е/13Z-ретиналя, который катализирует эту изомеризацию при комнатной температуре. Кроме того, часть аминокислот ответственна за подавление изомеризаций, отличных от all-Е/13Z, например от all-Е- к 7Z-, 9Z-, 11Z-ретиналю. Остальная часть полипептидной цепи обеспечивает канал протонного транспорта или экранирует фотохромную внутреннюю группу от влияний внешней среды.

Взаимная топография образованных полипептидной цепью БР элементов

вторичной структуры после поглощения молекулой хромофора кванта света изменяется, в результате чего формируется канал трансмембранного переноса протонов из цитоплазмы во внешнюю среду.

Спектры поглощения БР, полученные разными исследователями у разных видов бактерий, характеризуются некоторым разбросом величин. Так, спектр поглощения БР *H. cutirubrum* имеет максимум при 560 и 265 нм, а БР *H. halobium* – при 560 и 280 нм, что соответствует спектральным характеристикам ПМ и подтверждает то, что кроме БР в ПМ нет других окрашенных компонентов.

Если учесть, что опсин показывает максимальное поглощение при 280 нм, а ретиналь – при 380 нм, то становится очевидным, что при образовании молекулы БР происходит значительный батохромный сдвиг полосы поглощения, обусловленный взаимодействиями простетической группы хромопротеида с белковым окружением, в частности, с двумя точечными зарядами.

Индуцированный светом протонный транспорт сопровождается рядом циклических спектральных изменений БР, совокупность которых называется фотоциклом. Тридцать лет исследований привели к довольно детальному пониманию фотоцикла, однако подробности протонного транспорта все еще изучаются.

Фотохимический цикл БР (рис. 3Б) состоит из отдельных интермедиатов, которые могут быть идентифицированы как максимумами поглощения, так и кинетикой образования и распада [146].

Фотохимические и тепловые стадии на рис. 3Б показаны как толстые и тонкие стрелки соответственно. Вертикальные символы указывают на all-Eконформацию ретиналя (интермедиаты ${\bf B}$ и ${\bf O}$), наклонные символы – на 13 ${\bf Z}$ конформацию. В темноте БР превращается в 1:1 смесь **D** и **B**, эта смесь называется темноадаптированным БР. При освещении БР происходит световая адаптация, т.е. переход в основное состояние В. С этого состояния начинается фотоцикл, который приводит к транспорту протона через мембрану. В течение перехода $L \to M$, длящегося примерно 40 мкс, Шиффово основание депротонируется и Asp85 становится протонированным. Затем протон идет к внешней стороне внеклеточной части протонного канала. В течение перехода $\mathbf{M} \to \mathbf{N}$ альдимин репротонируется. В качестве донора протонов выступает остаток Asp96. Asp96 репротонируется через цитоплазматический протонный полуканал. В то время как все преобразования между интермедиатами обратимы, переход от $\mathbf{M}^{\mathbf{I}}$ к $\mathbf{M}^{\mathbf{II}}$, как полагают, является основным необратимым шагом в фотоцикле. В течение этого перехода азот Шиффова основания становится недоступным для внеклеточной части протонного канала, а только для цитоплазматического полуканала, что связано с конформационными изменениями белковой молекулы.

Кроме основного фотоцикла имеется два состояния, которые могут быть

вызваны искусственно. В интермедиатах \mathbf{P} и \mathbf{Q} конформация ретиналя 9Z. Это достигается после фотохимического возбуждения *all*-E-ретиналя, когда в то же самое время Asp85 протонирован.

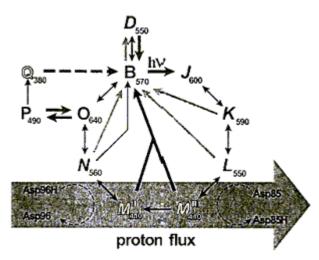


Рис. 3Б. Фотоцикл БР.

Формирование в ходе фотоцикла БР нескольких зависящих от температуры конформационных изменений белка с образованием соответствующих интермедиатов может быть подавлено охлаждением.

Цикл светоиндуцированных конформационных изменений БР, идущий в нейтральной среде и при низкой ионной силе раствора, сопровождается освобождением и поглощением протонов. Освобождение протонов происходит на внешней поверхности мембраны, тогда как поглощение – на ее внутренней поверхности, обращенной к цитоплазме [141, 147] (см. рис. 3А). То есть создается трансмембранный протонный градиент, направленный наружу. На один поглощенный фотон выделяется 0,4–0,7 Н⁺, при этом квантовый выход перемещенных Н⁺ меняется в зависимости от продолжительности и условий освещения [147а]. Полученная энергия фотона используется для синтеза АТФ через Н⁺-АТФазу, находящуюся в мембране. Для каждой синтезируемой молекулы АТФ требуется энергия 20 фотонов. Интересно, что на синтез АТФ клетки используют лишь один процент протонного градиента [148]. В кислой среде поглощение протона может предшествовать его высвобождению.

Фотохимические реакции находятся в зависимости от коэффициента экстинкции БР, квантового выхода фотопроцесса и интенсивности света. Свет является контролирующим параметром протонного транспорта. Фотореакции можно ускорить освещением суспензии голубым или зелёным светом [148].

Помимо фотохимической реакции БР, по-видимому, принимает участие в других клеточных процессах. Так, например, БР оказывает определённое влия-

ние на внутриклеточное содержание ионов K^+ и Na^+ . Истощенные клетки, лишенные БР, теряют K^+ и накапливают Na^+ , тогда как в присутствии БР сохраняют низкое содержание Na^+ и высокое K^+ [149].

Клетки *Н. salinarium* содержат также два так называемых сенсорных родопсина (СР I и СР II), которые обеспечивают положительный и отрицательный фототаксис. Различные длины волн считываются СР I и СР II как детекторными молекулами, что вызывает каскад сигналов, управляющих жгутиковым двигателем бактерии. При помощи такого элементарного процесса светового восприятия микроорганизмы самостоятельно перемещаются в свет подходящего спектрального состава. Кроме того, в клетках имеется галородопсин (ГР), представляющий собой светозависимый насос ионов СГ. Его основная функция — транспорт в клетку ионов хлора, которые постоянно теряются бактерией, перемещаясь в направлении изнутри — наружу под действием электрического поля, создаваемого БР. Механизм действия ГР неясен. Предполагается, что СГ связывается с положительно заряженным четвертичным азотом протонированного Шиффова основания, а изомеризация ретиналя из all-E в 13Z-форму вызывает перемещение этого азота с прикрепленным к нему ионом СГ от входного к выходному СГ—проводящему пути.

1.7.3. Особенности культивирования галобактерий и синтеза бактериородопсина

БР синтезируется бактериями из двух компонентов – бактериоопсина (БО, апопротеина) и ретиналя, на свету и в условиях недостатка кислорода. При синтезе БР и образовании ПМ сначала на клеточной оболочке микроорганизма образуются петчи – островки БО, параллельно в клетке синтезируется ретиналь; во второй стадии процесса происходит присоединение ретиналя к белку ковалентно через Шиффово основание, образуются бурые мембраны, которые состоят из БО и БР в некристаллической форме. Затем происходит кристаллизация бурых мембран и образование истинных пурпурных мембран, обладающих ясно выраженной кристаллической структурой.

При полностью сформированных ПМ весь ретиналь в галобактериях соединён с БО. Следовательно, существует механизм некоторой взаимной регуляции синтеза ретиналя и БО. Некоторые исследователи считают, что БО контролирует стадию перехода ликопина в β-каротин в процессе синтеза ретиналя [150]. Возможно, БО активирует ферментные системы, связанные с мембраной и катализирующие циклизацию ликопина [144].

Низкая концентрация О2 индуцирует синтез БО, но накапливающийся

"свободный" БО ингибирует собственный синтез. Ретиналь, присоединяясь к БО, реконструирует его в БР и таким образом индуцирует синтез БО. Освещение стимулирует присоединение ретиналя к БО и синтез самого ретиналя.

При понижении в среде концентрации Mg^{2+} , при котором палочковидные клетки принимают сферическую форму, происходит нарушение в синтезе БО. При этом вместо бактериоопсина в мембранах обнаруживается другой белок с молекулярной массой 19 тыс., близкий по структуре к БО. В этом случае происходит либо преждевременная терминация цепи в биосинтезе БО, либо имеет место ошибочный протеолиз предшественника БО. Если же концентрацию Mg^{2+} снова поднять до нормального уровня (50–150 мМ), то синтез БО полностью восстанавливается.

Одним из ингибиторов синтеза ретиналя является никотин. Никотин селективно ингибирует синтез ретиналя, посредством блокирования циклизации ликопена в β-каротин, при этом совершенно не влияя на развитие клеточной популяции. Клетки, выращенные в присутствии 0,5 мм никотина содержат только 2% ретиналя по сравнению с контролем. БО, аккумулирующийся в "никотиновых" клетках не образует кристаллической упаковки.

Молекула БО – привлекательная модель для изучения различных проблем, связанных биосинтезом и интеграцией экстремальных гидрофобных мембранных белков. Кроме того, БО служит основой для получения аналогов бактериородопсина, которые могут быть получены встраиванием хромофоров, отличных от ретиналя, встраиванием меченых аминокислот. БО может быть использован для изучения молекулярной динамики БР—протонной помпы.

Аналоги БО позволяют проводить определение динамических аспектов структуры белков. Изучение динамики отдельных типов алифатических и ароматических аминокислот и даже групп этих аминокислот открывает возможность исследования их роли в фотоцикле БР.

Существуют генетические измененные штаммы галобактерий, в которых синтезируется только бактериоопсин, а синтез ретиналя подавлен. Штаммы именно таких культур могут быть использованы для получения необходимого белка. Кроме того, существуют методы изменения условий культивирования, при которых подавляется синтез ретиналя в клетках, способных синтезировать БР в обычных условиях. Например, используя лимитированную аэрацию при культивировании клеток можно простимулировать синтез бактериоопсина в отсутствие ретиналя.

Ретиналь- не содержащие мембраны называют апомембранами в отличие от пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин.

Известеный способ получения апомембран - отщепление в бактериоро-

допсине ретиналя от белковой молекулы в присутствии гидроксиламина на свету. Кинетика реакции зависит от интенсивности света, температуры, рН среды и концентрации гидроксиламина. При этом в реакционной смеси оказываются апо-мембраны и ретинальоксим, который очень сложно удалить. Он не может быть полностью удален путем процедуры промывок, сопровождающих приготовление апомембран. Органические сольвенты и детергенты могут быть использованы для экстракции ретинальоксима, но при этом повреждается мембранная структура. Оставшийся в смеси с апомембранами ретинальоксим может предотвращать проявление активности встраивания других хромофоров – аналогов ретиналя. Поэтому предпочтительнее использовать безретинальные мутанты для получения апомембран, при этом обеспечивается большая корректность эксперимента.

При реконструировании апомембран из липидов, БО или БР их соотношение может быть иное по сравнению с ПМ галобактерий. Поэтому возможно некоторое различие в поведении естественного БР и полученного реконструкцией с использованием БО и ретиналя.

Концентрация бактериородопсина в апомембранах после добавления олтранс-ретиналя, т.е. синтеза БР, может быть оценена по величине поглощения в области 560 нм или по спектру поглощения белка.

Для получения бактериородопсина используют классические методы культивирования галобактерий.

Рост галобактерий является важной физиологической характеристикой состояния культуры. Скорость роста сильно зависит от условий инкубационной среды – ее состава, физических параметров, освещения.

Известно, что освещенная культура галофилов растет быстрее темновой. А при перенесении световой культуры, выращенной при лимитированной аэрации, в темноту без изменения кислородного режима, наблюдается снижение скорости роста [151]. Помимо зависимости от интенсивности освещения, скорость роста клеток весьма чувствительна и к длинам волн света. Так, максимальная скорость отмечена при 540–610 нм, что совпадает с максимумом поглощения бактериородопсина – 570 нм. По-видимому, бактериородопсин оказывает значительное влияние на описываемый физиологический процесс. Клетки, содержащие достаточное количество бактериородопсина, могут расти и в отсутствие кислорода [148]. Культуры клеток, не содержащие бактериородопсин из-за присутствия в среде никотина, при лимитированной аэрации растут медленнее, чем без никотина. В присутствии никотина свет не влияет на скорость роста культуры.

Экстремальные галофилы обычно растут на средах с протеиновыми вытяжками (триптон, пептон или дрожжевой автолизат), содержащими необходимое количество хлорида натрия и имеют полные комплексные требования по питанию [152].

Составлена химически определенная среда для *H. salinarium*. Кроме неорганических солей эта среда содержит 10 аминокислот, из которых валин, метионин, лейцин, изолейцин, аргинин, лизин необходимы для роста, а остальные стимулируют рост [153].

Химически определенная среда, обеспечивающая хороший рост всех экстремальных галобактерий, описана в [149]. Кроме неорганических солей среда содержала 15 аминокислот, 2 нуклеотида (аденозин и уридин) и глицерин.

Таким образом, в составе питательных сред аминокислотное питание представлено либо в виде комплексного источника аминокислот: пептона, дрожжевого экстракта, гидролизата казеина (казаминовых кислот) или их комбинаций – комплексных питательных сред, либо комбинированием состава из отдельных аминокислот с добавлением или без добавления нуклеотидов и нуклеозидов, а также витаминов – синтетических сред [154].

В табл. 1Б и табл. 1В приведен состав аминокислотного питания и среды культивирования экстремальных галофилов для синтетических (SM) и комплексных (CM) сред по данным литературы.

Для экстремальных галофилов необходимо высокое содержание NaCl в среде (около 250 г/л), при этом возможна частичная замена иона Na на K и Mg.

Экстремальные галофилы требуют для хорошего роста необычно высокие концентрации Mg $(0,1-0,5\ M)$ [130]. В то же время потребности экстремальных галофилов в ионах K лишь немного выше, чем для большинства других организмов и составляет от $0,05\ до\ 0,1\ мг/л\ K^+$ $(0,0013-0,0025\ M)$. Калий в количестве 1 мг/мл $(0,025\ M)$ необходим для максимального роста галобактерий на синтетической среде. В то же время внутриклеточная концентрация ионов K^+ у экстремальных галофилов чрезвычайно высокая.

На рост галобактерий на комплексной питательной среде сильно влияет качество и состав основного органического компонента – гидролизата казеина, пептона или триптона. Небольшие добавки глицерина (0,1-1%) стимулируют рост галобактерий. Описано влияние глицерина на уменьшение выхода бактериоруберина и увеличение выхода β-каротина [155].

Таблица 1Б. Состав аминокислотного питания и ростовых факторов для синтетической среды для галобактерий, мг/л

| Компоненты | | Лит. источ | чник | | | | |
|-------------------|---------------------|------------|--------|------|------|----------|-----------|
| | 149 | 155 | 156 | 157 | 153 | 149пром. | 149конеч. |
| | a | минокисло | ТЫ | | | | |
| DL-аланин | 430 | _ | - | - | 430 | 430 | 430 |
| L-аланин | - | - | 430 | - | - | _ | - |
| L-аргинин | 400 | 400 | 400 | 500 | 400 | 400 | 400 |
| DL-аспараги- | - | - | - | - | 450 | - | 450 |
| новая к-та | | | | | | | |
| L-цистеин | 50 | 50 | 50 | - | 50 | 50 | 50 |
| | (| HCl-моноги | идрат) | | | | |
| L-глутамино- | 1300 | 1300 | 1300 | 1500 | 1300 | 1300 | - |
| вая к-та | | | | | | | |
| глицин | 60 | - | 60 | - | 60 | 60 | 60 |
| DL-гистидин | - | - | - | - | 30 | - | - |
| DL-изолейцин | 440 | - | - | 250 | 440 | 440 | 440 |
| L-изолейцин | - | 440 | 440 | - | - | - | - |
| L-лейцин | 800 | 800 | 800 | 250 | 800 | 800 | 800 |
| L-лизин | 850 | 850 | 850 | 250 | 850 | 850 | 850 |
| DL-метионин | 370 | - | - | - | 370 | 370 | 370 |
| L-метионин | - | 370 | 370 | 100 | - | - | - |
| DL-фенилаланин | 260 | - | - | - | 260 | 260 | 260 |
| L-фенилаланин | - | - | 260 | 50 | - | - | - |
| L-пролин | 50 | - | 50 | 250 | 50 | 50 | 50 |
| DL-серин | 610 | - | - | - | 610 | 610 | 610 |
| L-серин | - | 610 | 610 | - | - | - | - |
| DL-треонин | 500 | - | - | - | 500 | 500 | 500 |
| L-треонин | - | 500 | 500 | - | - | - | - |
| L-тирозин | 200 | 200 | 200 | 100 | 200 | 200 | 200 |
| DL-триптофан | - | - | - | - | 50 | - | - |
| DL-валин | 1000 | - | - | - | 1000 | 1000 | 1000 |
| L-валин | - | 1000 | 1000 | 250 | - | - | - |
| | | нукле | озидь | I | | | |
| аденозин (АМФ) | 100 | - | - | - | 100 | 100 | 100 |
| уридин (УМФ) | 100 | - | - | - | 100 | 100 | 100 |
| цитидин (ЦМФ) | - | - | - | 200 | 100 | - | - |
| гуанин (ГМФ) | - | - | - | - | 100 | - | - |
| | В | итамины | | | | | |
| тиамин (B_1) | - | 1 | - | - | - | - | - |
| фолиевая к-та | - | 1 | - | - | 10 | - | - |
| биотин | - | 0,1 | - | - | 0,1 | - | - |
| цианокобаламин (l | B ₁₂) - | - | - | - | 0,02 | - | - |

Таблица 1В. Состав среды для галобактерий, мг/л

| Источник | 158, 155 | 149, 155 | 156 | 157 | 140,159,150 |
|------------------------------------|---|------------|-----------|-----------|-------------|
| Культура | H.cutirubrum | H.halobium | | H.halo | bium |
| | H. halobium | | | R1N | 1 1 |
| Объем выра- | колбы | колбы | | колбы | 10 л |
| щивания | | | | 125 мл | |
| Тип среды | CM | SM | SM | SM | CM |
| Азотное І | Сазаминовые кисло- | - | - | - | пептон |
| питание т | гы 7,5 г/л | | | | Oxoid |
|] | Црожжевой экстракт | | | | L37 |
| 1 | 10 г/л (Дифко) | | | | 10 г/л |
| NaCl | 250г/л | 250г/л | 210г/л | 250Г/Л | 250 г/л |
| MgSO ₄ .7H | ₂ O 20г/л | 20г/л | 20г/л | 20г/л | 20 г/л |
| KC1 | 3г/л | - | 2г/л | 1г/л | 2 г/л |
| цитрат Na | 3г/л | 0,5г/л | - | 0,5г/л | 3 г/л |
| FeSO ₄ .7H ₂ | O 49,8мг/л (10ppm Fe ²⁺) | - | - | - | - |
| FeC1 ₂ (4H ₂ | | 2,3 мг/л | 2,3мг/л | 2,3мг/л | - |
| KNO ₃ | , - | 100 мг/л | 0,1 г/л | 100мг/л | _ |
| K_2HPO_4 | - | 50 мг/л | 0,15г/л | 150мг/л | - |
| KH_2PO_4 | - | 50 мг/л | 0,15г/л | 150мг/л | _ |
| MnSO ₄ .7H | ₂ O - | 0,3мг/л | 0,3мг/л | 0,3мг/л | - |
| CaC1 ₂ .7H ₂ | О - | 7мг/л | 0,7мг/л | 0,7мг/л | - |
| $ZnSO_4.7H_2$ | O - | 0,04 мг/л | 0,44мг/л | 0,44мг/л | - |
| CuSO ₄ .5H ₂ | ₂ O - | 0,05мг/л | 0,05 мг/л | 0,05 мг/л | - |
| NH_4C1 | - | 5 г/л | 5 г/л | - | - |
| Глицерин | - | 1 г/'л | 0,8 мл/л | 0,1%w/v | - |
| • | pH NaOH | NaOH | NaOH | NaOH | KOH |

Испытание модифицированной SM [149, 157] при росте ГБ в качалочных колбах показали, что:

- нуклеотиды и нуклеозиды несущественны в присутствии 150–300 мг/л ортофосфата; при концентрации фосфата 100 мг/л рост замедлялся и выход биомассы был ниже, однако добавки нуклеотидов в количествах компенсирующих дефицит фосфата в среде, положительно сказываются на росте и выходе биомассы;
- замена L-аминокислот на казаминовые кислоты приводит к ухудшению показателей роста.

1.7.4. Практическая значимость галобактерий и бактериородопсина

С момента открытия БР интерес к нему не ослабевает. Как заметил Ј. К. Lanyi [160], за последние три десятилетия немногие биологические объекты привлекли такое пристальное внимание исследователей, как это сделал БР. Это доказывают более 5000 статей, посвященных исследованию самого белка и еще большее количество статей, указывающих на то, что БР в ближайшее время станет основой для многих биомолекулярных устройств. Экстремальные условия обитания и длительная эволюция ГБ способствовали отбору высокоустойчивых к внешним воздействиям клонов бактерий и белков, одним из которых является БР. В настоящее время ведутся активные разработки БР-содержащих материалов для использования в обработке изображений, создания систем хранения информации, оптических переключателей, сверхбыстрых детекторов света, голографических интерферометров [161–164] и других целей. ГБ представляют интерес и как источник биомассы, используемой в качестве биологически активных добавок с антиоксидантными и радиопротекторными свойствами, вклад БР в которые недостаточно изучен.

Одним из приоритетных направлений исследований в последнее время становится разработка материалов на основе биополимеров для нужд биоэлектроники. Уже сегодня на рынке появляются устройства, использующие в своей основе "гибридные технологии" – объединение полупроводниковых и биологических элементов. Выходит большое количество публикаций о возможности применения различных сенсорных систем микроорганизмов в качестве основы биомолекулярных устройств. Значимую часть этих публикаций составляют работы, посвященные бактериородопсину.

Большой интерес к использованию уникальных свойств БР проявляют разработчики компьютерной техники. Поскольку в окружающей среде находится большое количество достаточно мощных источников радиоизлучения различной природы, возникла задача обеспечения надежности работы компьютерных систем, используемых на важных технологических и военных объектах, и о необходимости их защиты от внешних воздействий. В этих условиях биомолекулярные устройства оказываются более надежными и не требуют таких мощных систем защиты, как полупроводниковые. Соответственно, это позволяет значительно уменьшить габариты и массу компьютеров, что имеет большое значение, например, для космических технологий [165, 166].

В 1980-х годах впервые была показана возможность использования БР для создания голографических изображений. Запись голографических изображений на пленках БР основана на интерференции двух когерентных лазерных лучей. Эти лучи образуют голографическую решетку, которая возникает благодаря изменению оптической плотности и показателя преломления пленки БР при поглошении кванта света.

К настоящему времени появляются сведения о всё новых и новых областях и вариантах применения БР. Некоторые из них перечислены ниже.

Голографическая интерферометрия – современная методика анализа деформации объектов путем обработки сложного оптического сигнала. Необходимость таких измерений возникает при определении амплитуд вибрации поверхностей, микросмещений и крайне малых скоростей движения. Использование в качестве среды для записи пленок БР, являющихся полностью обратимым материалом, позволяет расширить возможности голографической интерферометрии [167].

Молекулярная память на основе БР, имеющая следующие преимущества перед полупроводниковой памятью: а) данные сохраняются постоянно – даже если выключить питание системы памяти, это не приведет к потере информации; б) оптический носитель позволяет осуществлять объёмную запись информации, что значительно увеличивает его емкость; в) система может функционировать в более широком диапазоне температур [168].

Молекулярные фоторецепторы на основе БР способны переносить протон в ответ на поглощение света и создавать фототок. Открытие бактериородопсина дало возможность использовать галобактерии в качестве модели для изучения механизма зрения, а кроме того, открыло широкие перспективы в области биоэлектроники.

БР-содержащие краски, изменяющие цвет в зависимости от условий освещения, для защиты денежных купюр и важных документов от подделки. Существует целый набор фотохромных органических соединений, однако они не обладают необходимыми для использования в технике свойствами — высокой цикличностью и одновременно достаточно высоким квантовым выходом. Цикличность же молекул БР превышает 10^6 .

Эксперты по вопросам современных прикладных биотехнологических исследований и, в частности по нанобиотехнологии, отмечают огромную скорость роста размеров финансирования исследований в области разработки биомолекулярных устройств [Research Review, 2002, 15(2)]. Так, журнал Nanotechnology оценивает расходы на проведение исследований в США как более чем 2 миллиарда долларов за период с 2000 года, отмечая рост венчурных капиталовложений за последние два-три года как 313%. Эта же область оценивается как

наиболее перспективная для долгосрочных капиталовложений [Nanotechnology, *The Nanotech Report*, 2003].

Таким образом, из приведенных данных видно, что в настоящее время существуют многочисленные и ясные перспективы инженерного использования фоточувствительного белка пурпурных мембран — бактериородопсина. Галобактерии могут войти в число наиболее важных промышленных микроорганизмов — в качестве продуцентов бактериородопсина.

Внедрение БР в массовое производство сдерживается его высокой стоимостью, которая проистекает из трудностей культивирования галобактерий и выделения БР. Традиционное культивирование дает малый выход биомассы с незначительным содержанием целевого продукта, выделение которого осложняется наличием каротиноидов у вырабатывающих БР штаммов. Сами штаммы при культивировании нестабильны, поэтому все производство БР ограничивается лишь опытными партиями.

Превращение многочисленных существующих лабораторных методик культивирования галобактерий (для получения малообъёмных препаратов БР) в высокоэффективную промышленную технологию возможно путём решения двух вопросов: а) получение высокоэффективных штаммов – продуцентов бактериородопсина; б) оптимизация состава ростовых сред и условий промышленного культивирования галобактерий для получения препаратов пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин в высокой концентрации и в состоянии, наиболее подходящем для использования в биоэлектронных устройствах.

Существующие данные говорят о том, что на настоящий момент в мировой практике нет промышленной высокоэффективной технологии культивирования галобактерий для производства бактериородопсина.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и особенности их культивирования.

Дрожжи.

Первыми объектами исследований являлись дрожжи *Candida tropicalis* штамм СК-4 и *Saccharomyces cerevisiae* штаммы SL-100 и Меуеп расы Т 9895. Эти микроорганизмы обитают на поверхности листьев и плодов растений. Питательная среда для них в природных условиях – растительные углеводы (фруктоза, сахароза), растительные экссудаты (в основном сахароза и полисахариды), этанол. Используются в крупномасштабных процессах получения кормового дрожжевого белка, биологически активных веществ, генноинженерных продуктов. Повсеместность использования дрожжей в биотехнологических производствах и доступность данных по стрессовому отклику сделали их первостепенной модельной культурой для настоящих исследований. Выращивание дрожжей вели на стандартных минеральных средах с внесением сахарозы.

Культивирование дрожжей проводили в колбах на качалке и в биореакторе.

При культивировании оптимальная температура для роста дрожжей C. tropicalis 32–34 °C, для S. cerevisiae 28-30°C, pH от 3,0 до 6,0. Эксперименты с дрожжами в колбах 250 мл при объеме среды 50 мл проводились на термостатируемой качалке с числом оборотов 220 об/мин при начальном значении pH среды 5,5. Компоненты среды стерилизовали при 0,5 ати в автоклаве в течение 30 мин. Посевной материал составлял 2–10% об., H_2O_2 (пергидроль) вносили в различные фазы роста в количестве 0,025–0,5 мл.

Типичный состав среды для культивирования дрожжей С. tropicalis, г/л: $(NH_4)_2SO_4 - 3$, $MgSO_4*7H_2O - 1,4$, $K_2SO_4 - 0,1$, $KH_2PO_4 - 3$, $K_2HPO_4 - 0,1$, $(NH_4)_2HPO_4$ или $NH_4H_2PO_4 - 5$, $NaH_2PO_4*2H_2O - 10$. Микроэлементы (1:100), состав: $FeSO_4*7H_2O - 50$ мг, $MgSO_4*7H_2O - 30$ мг, $ZnSO_4*7H_2O - 30$ мг, NaCl - 20 мг, $CuSO_4*3H_2O - 10$ мг.

Состав среды для культивирования дрожжей *S. cerevisiae*, г/л: $(NH_4)_2SO_4 - 5,0$, $KH_2PO_4 - 1,0$, KCl - 0,15, $MgSO_4*7H_2O - 0,2$ г/л, $CaCl_2 - 0,05$ г/л, дрожжевой экстракт -0,5, сахароза -5, 30 или 150, вода - водопроводная, pH 5,8.

При культивировании в колбах в экспериментах с изучением влияния видимого света на рост дрожжей часть колб помещалась в светонепроницаемые чехлы (два слоя черной материи, содержимое колбы не освещается). Опыты в лабораторном биореакторе с обечайкой из стекла, рабочим объемом 3 л («Фермус–3», изготовитель НИЦ «Биоавтоматика», г. Н. Новгород) проводили при 32–34 °C в режиме глубинного культивирования с автоматическим контролем рH, рO₂, Eh после модернизации системы с использованием разработанного программного обеспечения BioDrome 1.0 на базе инструментария LabView 7.0 фирмы National Instruments (США) (рис. 4, подробное описание см. ниже). При закислении среды в ходе ферментации подтитровку вели раствором NaOH или NH₄OH.

В ряде экспериментов использовали облучение дрожжей мягким ультрафиолетом. В качестве источников мягкого УФА и УФБ-излучения использовали лампы PHILIPS TL 20W/05 и ДРШ-100 со светофильтрами ФС-6 и УФС-8 или без светофильтров. В качестве источников лазерного излучения использовали He-Ne- лазер и Аргон-ионный лазер.

Система культивирования в биореакторе, с помощью которой исследовался отклик популяции дрожжей на воздействие пероксида водорода и мягкого УФ-излучения отличалась от изображенной на рис. 4 отсутствием емкости с адсорбентом и блока сканирования. Облучение УФ проводили через выносной контур с кварцевой кюветой.

Галобактерии.

В работах с галобактериями использовались штаммы *Halobacterium salinarium* 353П, ST-033, а также спонтанные мутанты, полученные из ST-033 облучением ультрафиолетом. Процедура облучения ультрафиолетом подробно описана в п. 4.1.

Состав и подготовка среды.

Минеральная основа для выращивания галобактерий содержала, г/л: NaCl -250, MgSO₄×7H₂O -20, KCl -2, цитрат Na -3, CaCl₂ -0,2, вода - водопроводная. Состав и содержание органических компонентов среды варьировались. За основу (стандартная среда) было взято содержание триптона (пептона) 5 г/л, дрожжевого экстракта 2 г/л, глицерина 4 мл/л. Использовались триптоны (пептоны) Serva, Hispanlab, Difco, дрожжевые экстракты Hispanlab, Organotechnie, Difco, глицерин. При необходимости pH среды доводилось до 6,8-7,2 щелочью (NaOH). Среда стерилизовалась 30 мин. при 0,5 ати.

Ход эксперимента на качалочных колбах.

Культивирование в 100 мл колбах проводили в стерильных периодических условиях на качалке G10 (New Brunswick) при 150 об/мин, температуре 37–38 °C, объеме среды в колбах 25-75 мл. Уровень аэрации регулировался степенью заполнения колб питательной средой. Объем посевного материала, находящегося в стационарной фазе роста, составлял 2–20% об. Время культивирования – от 3 до 8 сут. в зависимости от целей эксперимента.

Часть колб помещалась в светонепроницаемые чехлы (два слоя черной материи, содержимое колбы не освещается).

При культивировании галобактерий с использованием инкапсулированного угля подготовка посевного материала проводилась следующим образом. В колбы объемом 100 мл вносилось от 0,2 до 1,5 г гранулированного активированного угля. Затем в колбы добавлялось по 25 мл среды, содержащий минеральную основу среды с агаром (2,5-5%) для фиксации угля на дне колб, после чего содержимое колб стерилизовалось 30 мин. при 0,5 ати и охлаждалось до застывания агара; уголь оказывался хорошо зафиксированным внизу колб. Питательная среда (5 г/л триптона фирмы Serva или Hispanlab, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина и минеральные компоненты) стерилизовалась отдельно в тех же условиях, после охлаждения заливалась в количестве 50 мл в колбу с углем и агаром и засевалась клетками галобактерий в количестве 4% суспензии клеток от объема жидкой среды в колбах. Засеянные колбы ставились на качалку.

Ход эксперимента в реакторе.

Опыты проводили с использованием выше описанной системы (рис. 4) при 37-38 °C в режиме глубинного культивирования в стерильных условиях с автоматическим контролем pH, pO₂, Eh. Величина pH поддерживалась в диапазоне 6.8-7.2 и при необходимости регулировалась подтитровкой NaOH. Содержание кислорода поддерживалось в зависимости от характера эксперимента на уровне 1-100% от равновесного путем изменения расхода подаваемого воздуха и/или интенсивности перемешивания (механической мешалкой). Засев проводился 2-20% об. посевного материала, находящегося в стационарной фазе роста. При необходимости колбы и биореактор освещалась лампами дневного света или светодиодными матрицами с интенсивностью 10-150 мВт/л (в пересчете на длину волны $\lambda=555$ нм).

При культивировании с использованием адсорбента (активированный уголь АГ-3) периодически включали прокачку насосом содержимого биореак-

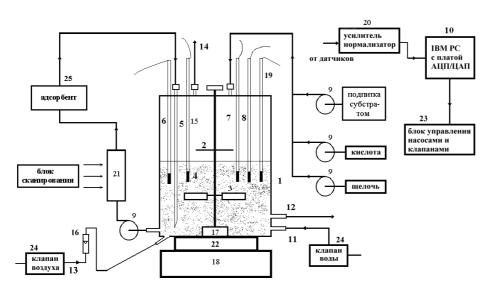


Рис. 4. Схема автоматизированного комплекса для культивирования дрожжей и галобактерий.

1 – корпус ферментера; 2 – дискообразный пеногаситель; 3 – лопастная мешалка; 4 – среда культивирования; 5 – сливной патрубок; 6 – электрод сравнения; 7 – рН-электрод; 8 – рО₂-электрод; 9 – перистальтические насосы; 10 – IBM РС с платой АЦП/ЦАП; 11, 12 – подача охлаждающей воды в теплообменник ферментера; 13 – подача воздуха; 14 – выход воздуха; 15 – термосопротивление; 16 – ротаметр; 17 – магнитный привод; 18 – привод двигателя; 19 – Еһ-электрод; 20 – усилитель-нормализатор; 21 – проточная кювета с блоком сканирования; 22 – нагревательный элемент; 23 – блок управления насосами и клапанами; 24 – клапаны, 25 – емкость с адсорбентом.

тора через емкость, в которой реализовывался процесс извлечения ингибибиосинтеза, торов образующихся питательной среде. Для повышения выхода биомассы ГБ и содержания БР в реактор вносили субстратную подпредставпитку, ляющую концентрированный pacтвор, содержащий триптон, дрожжевой экстракт и гли-

церин. Контроль и регулирование процесса осуществляли с помощью разработанного программного обеспечения и экспресс-методики.

Характеристики комплекса для культивирования микроорганизмов.

Возможности комплекса позволяют:

- отслеживать ход ферментационного процесса, регистрируя такие параметры, как T° , pH, pO₂, eH, оптическая плотность суспензии;
- регулировать pH, p O_2 , T° , управлять подачей питательной среды, расходом подаваемого воздуха, приводом электродвигателя ферментера; устранять помехи;
 - калибровать датчики с поправочными зависимостями (например, pO_2 от T°);
- снимать данные как в программном режиме, так и в режиме прямого доступа к памяти (ПДП);
- работать в режимах: периодическом, периодическом хемостатном, периодическом с подпиткой субстратом с обратной связью по показаниям датчика рО₂.

В табл. 2. приведены комплектация и основные технические характеристики модернизированной установки для культивирования микроорганизмов с использованием разработанного программного обеспечения.

Таблица 2. Состав и основные технические характеристики установки для культивирования микроорганизмов.

| Основной биореактор. | | | | | |
|---|---|--|--|--|--|
| Технические характеристики: | | | | | |
| объем общий, л | 4,5 | | | | |
| объем рабочий, л | 1,5-3,5 | | | | |
| • режим культивирования | периодический | | | | |
| • материал корпуса биореактора | дно и крышка – нержавеющая сталь, обечай- | | | | |
| | ка – термостойкое стекло, прокладки – пи- | | | | |
| | щевая резина, соединительные шланги - си- | | | | |
| | ликон | | | | |
| • условия перемешивания | 6-ти лопастная мешалка, число оборотов | | | | |
| | мешалки от 50 до 1200 об/мин, привод маг- | | | | |
| | нитный, мощностью 100-250 Вт, скорость | | | | |
| | массопереноса по кислороду – до 2 гО ₂ /л.ч. | | | | |
| | время непрерывной работы биореактора – до | | | | |
| прочие требования | 1 мес. | | | | |
| Технические характеристики системы из- | | | | | |
| мерения. | | | | | |
| Диапазон измерения параметров: | | | | | |
| • T ^o | в пределах 2040 ± 0,05 °C | | | | |
| • pH | в пределах 2-10 ± 0,1 ед | | | | |
| • pO ₂ | в пределах 0-100 ± 2% | | | | |
| • Eh | в пределах -1000 +1000±5 мВ | | | | |
| • Частота регистрации | до 10 измерений по всем параметрам в сек. | | | | |
| Автоматически поддерживаемые парамет- | | | | | |
| ры культивирования: | | | | | |
| • температура | | | | | |
| • pH | | | | | |
| Задаваемые параметры: | | | | | |
| • pH _{yct} , T ^o _{yct} | 7 0 1000 1 10 =: | | | | |
| • частота вращения мешалки | 50 1000 ± 10 об/мин | | | | |
| • расход воздуха | $0 \dots 5 \pm 0,1$ л/мин | | | | |
| производительность перистальтических | $0 \dots 5 \pm 0,2$ л/ч | | | | |
| насосов | | | | | |

Измерительная система включает первичные датчики pH, T° , pO₂, Eh, блок контроля и управления ферментационным процессом, промежуточные платы: усилитель-нормализатор и плата ЦАП/АЦП, а также программное обеспечение "Biodrome 1.0".

В системе предусматривается подключение датчиков контроля параметров к АЦП L-card и управления внешними устройствами с помощью ЦАП.

Для программирования задач ввода-вывода и обработки сигналов использована система LabView фирмы National Instruments, работающая в среде Windows.

В существующей реализации используется плата АЦП/ЦАП L-305 производимая ЗАО "Л-Кард".

Универсальный усилитель-нормализатор обеспечивает подключение 4-х датчиков: pH, eH, p O_2 и Т. Он представляет собой плату из комплекта установки "Фермус-3", разработанной ранее в НПО "Биоприбор" (г. Нижний Новгород), и модифицированной для работы в автономном режиме (вне блоков системы "Фермус-3"). Усилитель-нормализатор собран целиком на отечественных компонентах и обеспечивает стыковку датчиков с АЦП. Расстояние от датчиков до нормализатора должно быть как можно меньше и в использованной в работе установке не превышает 1,5 м. Соединение осуществляется экранированным проводом.

Измерение pH на установке осуществляется с помощью стеклянного pHэлектрода и электрода сравнения. Электродом сравнения служит хлорсеребряный электрод.

Окислительно-восстановительный потенциал измеряется с помощью электродной пары, состоящей из инертного и сравнительного электродов. При измерении Еh, как и при измерении рH, электродом сравнения служит хлорсеребряный электрод. В качестве инертного электрода используется гладкий платиновый электрод.

Для измерения концентрации растворенного кислорода для работы в составе биореактора используется амперометрический датчик Кларка. Принцип его работы основан на преобразовании парциального давления растворенного в среде кислорода в падение напряжения на нагрузочном сопротивлении вольтамперометрического датчика с внутренним источником поляризующего напряжения. Кислород, растворенный в анализируемой среде, диффундирует через газопроницаемую мембрану и восстанавливается на платиновом катоде. Диффузионный ток восстановления кислорода создает на нагрузочном сопротивлении падение напряжения, которое передается по соединительному кабелю к нормализатору.

Для измерения температуры используется термопреобразователь сопротивления фирмы Honeywell. Датчик Hel-775 обеспечивает измерение температур с погрешностью \pm 0,5 °C. У него линейная зависимость сопротивления от температуры, отличная стабильность показаний и небольшой размер.

Для регистрации показаний с ферментера в работе использовался персональный компьютер Pentium-III.

В качестве исполнительных устройств используются перистальтические насосы, служащие для прокачки суспензии, например, через кювету для облучения суспензии микроорганизмов или в других целях, подпитки субстратом, добавления щелочи или кислоты.

ПО может управлять перистальтическими насосами и клапанами: подкислять или подщелачивать среду, добавлять субстрат, прокачивать среду культивирования через кювету, подавать воздух, охлаждающую воду с помощью имеющихся ТТL выходов и блока управления насосами (НИЦ "Биоавтоматика") и клапанами (Burkert). В системе применен тиристорный привод (собственного изготовления) с внешним управлением для регулирования оборотов двигателя в соответствии с подаваемым на ЦАП напряжением. С помощью него регулируется содержание кислорода (увеличение, уменьшение оборотов) в культуральной жидкости при постоянном расходе воздуха.

Управление осуществляется в соответствии с выбранным режимом работы или заданием характеристик вручную по ходу процесса с помощью ПО, полностью написанного на базе LabVIEW 7.0 фирмы National Instruments.

ПО включает приложение-сервер (устанавливается в лаборатории) и приложение-клиент (для просмотра информации на удаленном компьютере). Измерительная система интегрируется в Интернет с помощью программной технологии DataSocket, упрощающей программирование. Для управления с удаленного компьютера разработан дополнительный модуль, соответствующий модулю управления в основной программе, но обеспечивающий соединение с сервером с помощью TCP/IP функций LabVIEW, идентификацию пользователя, прав доступа. Просмотр хода эксперимента возможен и без устанавливаемого на удаленном компьютере ПО, т.к. используется WEB-сервер LabVIEW.

Программа представлена четырьмя основными модулями (рис. 5): "Руководство пользователя", "Установки оборудования", "Анализ данных", "Эксперимент" (включая управление).



Рис. 5. Главное окно программы.

В модуле установок (рис. 6) задаются: тип платы АЦП/ЦАП, количество сканируемых каналов, тип подключения, описание величин, единиц измерения, коэффициенты усиления (для каждого канала), настраивается стиль вывода графиков, сетевые настройки, режимы ввода данных, параметры управления, а также множество других параметров.

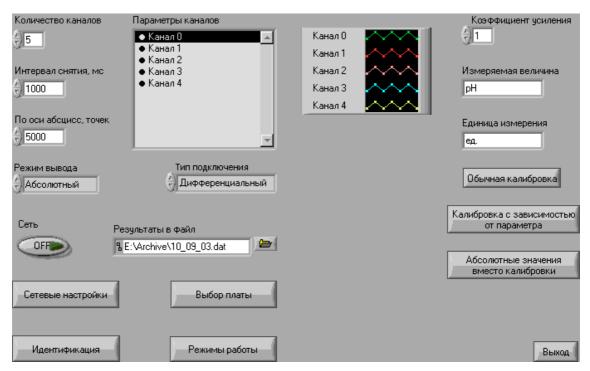


Рис. 6. Окно модуля установок.

Отсюда можно перейти к различным видам калибровки датчиков (рис. 7). Параметры конкретной калибровки вводятся через всплывающие диалоговые окна.

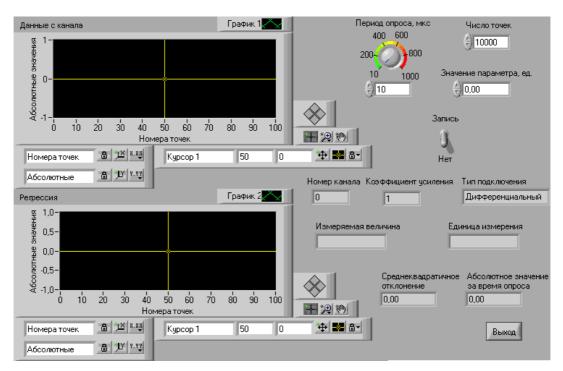


Рис. 7. Окно калибровки датчиков.

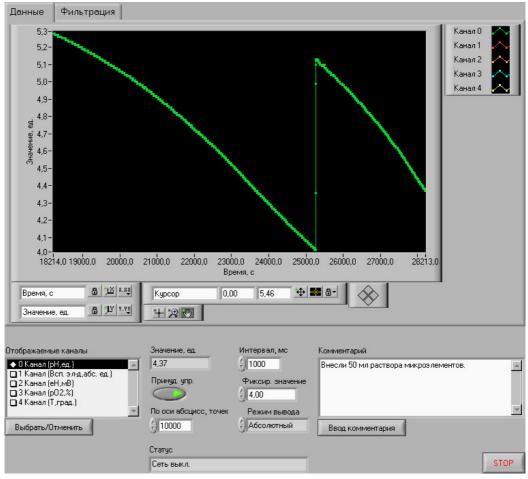


Рис. 8. Передняя панель модуля "Эксперимент".

В модуле эксперимента (рис. 8) отображаются данные в реальном времени с выбранных в списке каналов. Их можно убирать, выключая определенные каналы (нажимая кнопку "Выбрать/Отменить"), совмещать в относительных единицах в процессе эксперимента, менять параметры управления, интервал снятия данных с каналов и число точек по оси абсцисс. Для выбранного канала отображается текущее значение. Возможен просмотр, масштабирование любой части графика, привязка к точкам с помощью инструментария внизу графика, реализована программная фильтрации сигнала. Предусмотрен ввод комментария. Результаты эксперимента записываются в файл и доступны после конвертирования для обработки с помощью электронных таблиц (Origin, Excel и др.).

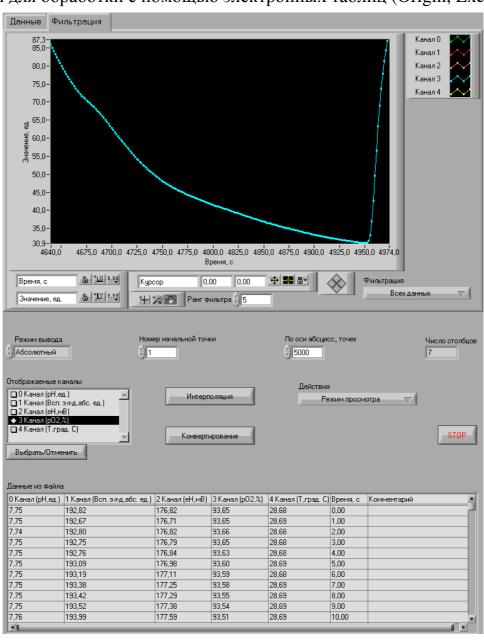


Рис. 8А. Окно модуля анализа данных.

В программе предусмотрен анализ полученных данных без загрузки дополнительного программного обеспечения (модуль "Анализ данных"), что делается средствами LabVIEW (рис. 8A).

Методики измерения и анализа.

Накопление биомассы дрожжей определяли по изменению оптической плотности на КФК-3.01 (λ=540 нм, толщина кювет – 3 мм), а также непосредственым измерением сухого веса дрожжей с последующим использованием калибровочных кривых для пересчета показаний с единиц оптической плотности на сухой вес. При определении сухого веса дрожжей суспензию клеток отфильтровывали и промывали на мембранном фильтре, и в дальнейшем высушивали при 105 °С до постоянного веса.

Содержание клеток галобактерий в среде культивирования определялось измерением оптической плотности при λ =660 нм (толщина кюветы 10 мм) на спектрофотометре Specord M40, с последующим пересчетом на сухой вес по калибровочной кривой. Сухой вес биомассы галобактерий и калибровочную кривую пересчета в единицы оптической плотности определяли путем аккуратного отбора некоторого количества биомассы с чашек Петри, определяли вес отобранной влажный биомассы и сухой вес, после высушивания при 105 °С до постоянного веса.

Статистическую обработку результатов определения оптической плотности проводили по общепринятым методам с использованием критерия Стьюдента и уровня значимости p=0,05.

<u>Микроскопирование</u> проводилось стандартными методами с использованием препаратов типа "раздавленная капля" и "фиксированная капля" при увеличении от 160х до 1600х.

В конце экспериментов на колбах фиксировали рН. В качестве контрольного прибора для <u>измерения рН</u> растворов использовали иономер ЭВ-74 со стеклянным измерительным и хлорсеребряным электродом сравнения.

Замер освещенности производился с помощью люксметра—УФ-радиометра ТКА-01/3 (г. Санкт-Петербург).

Содержание сахарозы определяли модифицированным методом Бертрана-Шарля. Содержание НАД⁺ определяли спектрофотометрическим методом, измеряя нарастание поглощения при 340 нм в присутствии этанола и фермента алькогольдегидрогеназы.

<u>Содержание этанола</u> в среде после брожения определяли методом ГЖХ. Бродильную активность определяли методом вытеснения.

<u>Наличие БР и каротиноидов</u> контролировалось по спектрам лизатов. Для этого клетки ГБ осаждались центрифугированием, ресуспендировались в бидистилляте с добавлением 10 мг/л ДНКазы (Sigma) при перемешивании. Полученный лизат центрифугировался при 7000 g 10 мин. и анализировался на спектрофотометре (Specord M40) со снятием спектра в диапазоне видимого света в интервале длин волн 400–620 нм.

Определение цвета суспензии и содержания БР.

Для выяснения динамики накопления БР была разработана экспрессметодика, основанная на цветовом анализе суспензии. Методика позволяет оценивать содержание БР в процессе роста, не прибегая к непосредственному выделению БР. Для этого суспензия ГБ непрерывно прокачивается через кювету определенной толщины и сканируется с помощью ССD (Charge Coupled Device) матрицы сканера Epson Perfection 1270. Цвет разлагается на компоненты и сопоставляется с цветом эталонных вариантов. Обработка производится в автоматическом режиме с применением разработанной системы BioDrome 1. Подробно методика описана в п. 4.4.

Непосредственное определение содержания БР.

Методика выделения БР аналогична методике, описанной в [169].

Посевной материал.

Готовят посевной материал путем выращивания микроорганизмов на твердых питательных средах в чашках Петри с последующим размножением в колбах на качалке. Посевной материал в дальнейшем используют для засева качалочных колб и хранят на холоду при +2 - +4°C.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ

Исследования с дрожжами были инициированы и явились продолжением ранее проведенных работ (см. обзор литературы), в которых было показано, что в определенных условиях умеренные дозы агента окислительного стресса, такого как пероксид водорода, могут благоприятно влиять на физиологическую активность популяций микроорганизмов, улучшать показатели ферментационных процессов. В частности, положительное воздействие на продуктивность, жизнеспособность, выход биомассы, бродильную активность, уменьшение содержания остаточных субстратов и метаболитов в среде культивирования, эффективность биодеструкции было выявлено при изучении деструкции фенола микробоценозами с доминированием дрожжей [1], при культивировании дрожжей Candida tropicalis на сахарозе [1], дрожжей Saccharomyces cerevisiae на сахарозе и зерновом сусле [2].

Однако в проведенных работах не было дано однозначного ответа или не были прояснены такие вопросы как:

- возможность использования других агентов окислительного стресса, например УФ-излучения ближнего диапазона, для индукции позитивных эффектов;
- наблюдается ли истинная адаптация к агентам окислительного стресса популяций дрожжей;
- зависимость эффектов от фазы роста, плотности клеток в популяции и других ростовых и физиологических характеристик дрожжевых культур;
- продолжительность сохранения благоприятных свойств у популяций после воздействия на них факторами окислительного стресса;
- возможность использования антистресс-факторов для минимизации негативных и максимизации позитивных эффектов у стресс-индуцированных культур.

Очевидно, выяснение особенностей изменения физиологического состояния у исследуемых объектов при воздействии факторов окислительного стресса позволило бы выбрать более рациональные варианты и режимы их культивирования.

3.1. Культивирование дрожжей Candida tropicalis

3.1.1. Культивирование дрожжей *C. tropicalis* при одновременном воздействии света видимого и УФ диапазонов спектра

Как отмечалось в обзоре литературы, действие на живую клетку H_2O_2 как агента окислительного стресса, во многом аналогично действию ультрафиолетового излучения ближних УФА и УФБ диапазонов спектра [39]. В живых клетках и H_2O_2 , и мягкое УФ-излучение вызывают окислительный стресс и индуцируют одну и ту же систему антиоксидантного антистрессового ответа. Кроме того, мягкое УФ-излучение может нести определенные сигнальные функции в отношении активности микроорганизмов. В этой связи на данном этапе исследований было интересно выяснить, может ли воздействие мягкого ультрафиолетового излучения быть благоприятным для роста микроорганизмов и при каких условиях.

Тестовые эксперименты, выполненные с использованием культуры дрожжей *Candida tropicalis*, выращиваемых на среде с сахарозой в качалочных колбах и облученных предварительно УФ-излучением лампового источника (в работе использовалась УФ-лампа фирмы «Филипс»), показали, в принципе, положительное действие мягкого ультрафиолета на скорость роста и выход дрожжей. Эффект при этом зависел от активности роста и плотности дрожжевой популяции. Заметное положительное действие УФ-излучения проявлялось только для активно растущих культур микроорганизмов – в фазе экспоненциального роста, а также, когда плотность клеточной популяции превышала величины 0,5–1,0 г/л (по сухому веществу биомассы).

Было также замечено, что влияние УФ-излучения на рост дрожжей более существенно в случае, когда клетки микроорганизмов после облучения некоторое время (1 час) пребывают в состоянии покоя. Облученные микроорганизмы, выращиваемые лишь спустя 1 час после облучения, быстрее росли по сравнению с необлученными клетками, также пребывавшими такое же время в состоянии покоя. Оптимальный режим облучения, найденный при использовании УФ-лампы «Филипс»: 1 мин при облучении слоя суспензии толщиной 4 мм с концентрацией активно растущих клеток дрожжей 0,5–0,7 г/л при дозе излучения около 1000 Дж/м² (250 Дж/л).

Вместе с тем опыты, выполненные в качалочных колбах, показали неудовлетворительную воспроизводимость результатов, что обусловило необходимость проведения экспериментов с более полным контролем параметров окружающей среды (рН, уровня аэрации, уровня растворенного кислорода, температуры, освещенности и др.).

С учетом общепринятых методов управляемого культивирования микроорганизмов и существующих в этой области разработок была создана лабораторная установка с выносной кварцевой кюветой для облучения суспензии, описание которой приведено в разделе «Материалы и методы» (см. рис. 4), и проведены опыты для изучения воздействий УФ-облучения на биологический процесс. Регистрация основных параметров культивирования (рH, T° , pO₂, Eh) осуществлялась с помощью программного обеспечения «BioDrome 1.0».

В качестве источника УФ-излучения использовалась отечественная ртутная лампа ДРШ-100. О результатах воздействия УФ-излучения на микроорганизмы судили по изменению хода кривых зависимости концентрации растворенного кислорода рО₂, рН, Еһ от времени, выводимых непосредственно на монитор компьютера, а также путем сравнения кривых роста биомассы. Ввиду того, что в процессе ответа микроорганизмов на окислительный стресс, индуцируемый ультрафиолетом, может участвовать система фоторепарации [87], было обращено повышенное внимание на фактор света, а эксперименты решено было проводить в двух вариантах: с подсветкой (освещением) биореактора видимым светом и с экранированием (затемнением) его содержимого от света лаборатории.

Освещение видимым светом содержимого биореактора производилось через его стеклянную обечайку светом лабораторного помещения (люминесцентные лампы дневного света, оценочная мощность освещения по видимому свету – 40 мВт/л). В опытах с отсутствием освещения видимым светом биореактор затемняли светонепроницаемой черной тканью.

Предварительно были определены подходящие условия для выявления отклика системы на действие УФ-излучения по показаниям изменения концентрации растворенного кислорода:

- концентрация биомассы 0,3-3,0 ед. оптической плотности (0,2-2,0 г/л по абсолютно сухой биомассе),
 - интенсивность облучение ультрафиолетом 0,5–2 Вт/л,

- скорость вращения мешалки - 150-370 об/мин.

При невысокой интенсивности перемешивания и высокой концентрации биомассы величина pO_2 невелика (несколько процентов), а при высокой интенсивности перемешивания и невысоком содержании биомассы – близка к уровню насыщения, что затрудняет выявление возможных изменений в характере кривой pO_2 .

На рис. 1–8 приведены примеры отклика системы¹ на воздействие УФ-излучения (мощность облучения по УФ-излучению – 1 Вт/л) и видимого света, определяемого по показанию рО₂ в биореакторе при культивировании дрожжей *Candida tropicalis*.

Видно, что при отмеченных условиях облучения дрожжи реагируют на действие УФ-излучения как при освещении биореактора (рис. 9, 10), так и в темноте (рис. 11-13), при этом процесс роста становится чувствительным к действию видимого света (рис. 14-16). Изменения условий освещения индуцирует у культуры переходное состояние, проявляющееся в преломлении хода кривой рО₂: в ускорении или замедлении падения рО₂, смены роста рО₂ на падение и наоборот, колебания в показаниях рО₂. Такой переходный процесс длится 1-2,5 ч.

При освещении биореактора видимым светом включение УФ-облучения влияет положительно на дыхательную активность суспензии дрожжей (ускоряет падение pO_2 , рис. 9). Отключение УФ-облучения суспензии, облучаемой до этого в освещенной лаборатории, замедляет ход падения дыхательной активности по ходу опыта (рис. 10), т.е. отрицательно влияет на дыхательную активность. В темноте включение УФ замедляет падение pO_2 (рис. 12), т.е. отрицательно влияет на дыхательную активность, а отключение УФ-облучения суспензии, облучаемой до этого ультрафиолетом при затемнении биореактора, либо замедляет падение pO_2 (рис. 13), либо не влияет на темп изменения дыхательной активности.

В системе, постоянно облучаемой ультрафиолетом, включение света в лаборатории ускоряет падение pO_2 (положительно влияет на дыхательную активность, рис. 14).

¹ Необходимо отметить, что в этих опытах прокачка суспензии через кювету осуществлялась на протяжении всего ферментационного цикла, поэтому возмущения в системе обусловлены только включением или отключением УФ или видимого света.

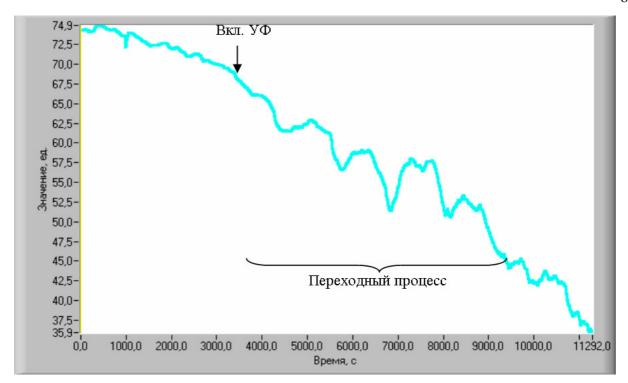


Рис. 9. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на включение УФ-излучения при освещении светом лаборатории.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 150 об/мин; концентрация биомассы в момент включения УФ-лампы -0.45 опт. ед, концентрация сахарозы в исходной среде (здесь и далее на рис. 9-16) -8 г/л.

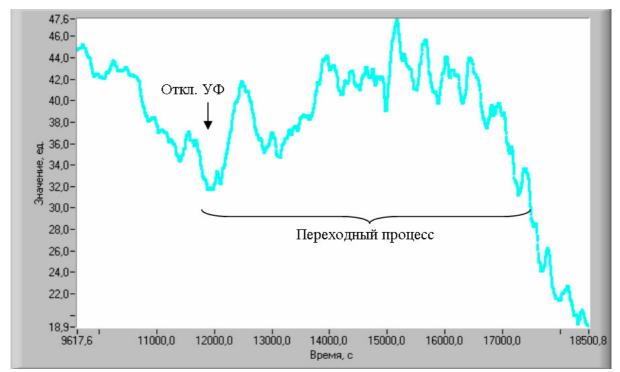


Рис. 10. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на отключение УФ-излучения при освещении светом лаборатории.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 150 об/мин; концентрация биомассы в момент отключения УФ-лампы -0.7 опт. ед.

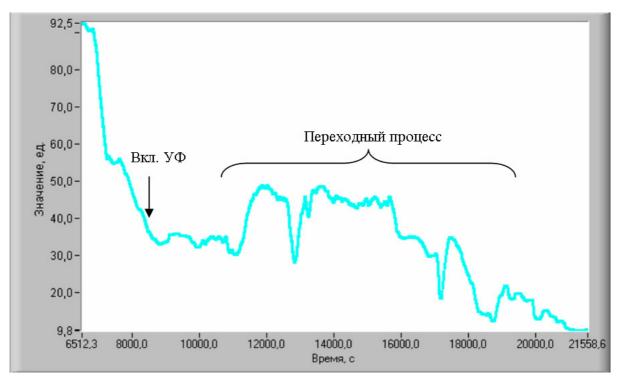


Рис. 11. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на включение УФ-излучения в темноте.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 200 об/мин; концентрация биомассы в момент включения У Φ -лампы – 0,7 опт. ед.

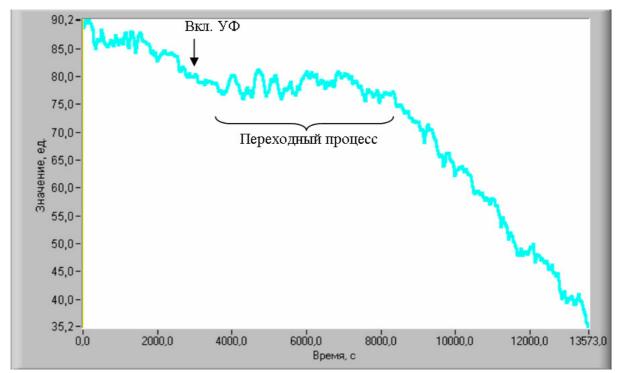


Рис. 12. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на включение УФ-излучения в темноте.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 300 об/мин; концентрация биомассы в момент включения У Φ -лампы – 0,9 опт.ед.

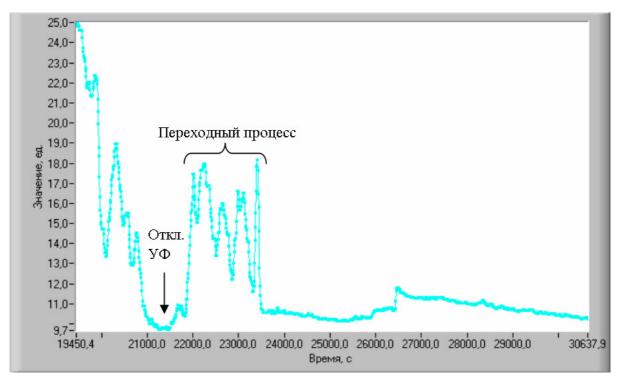


Рис. 13. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на отключение УФ-излучения в темноте.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 200 об/мин; концентрация биомассы в момент отключения У Φ -лампы – 1,3 опт. ед.

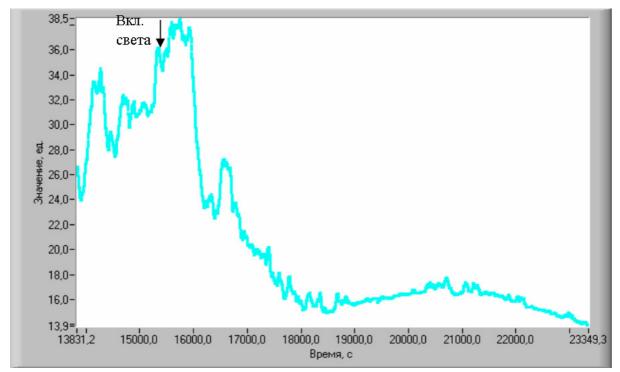


Рис 14. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на включение света при УФ-облучении суспензии биореактора.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 150 об/мин; концентрация биомассы в момент включения света в лаборатории – 1,6 опт. ед.

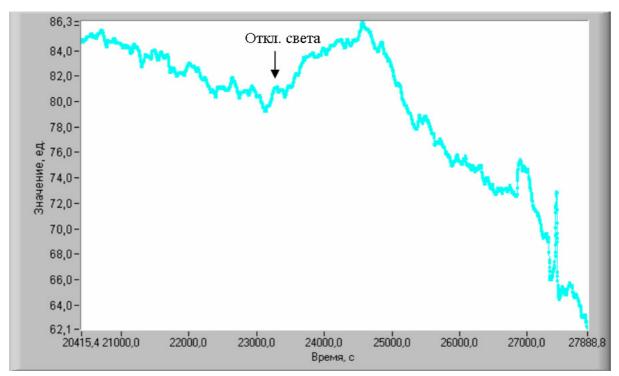


Рис. 15. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на отключение света при УФ-облучении суспензии биореактора.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 300 об/мин; концентрация биомассы в момент отключения света в лаборатории – 3,0 опт. ед.

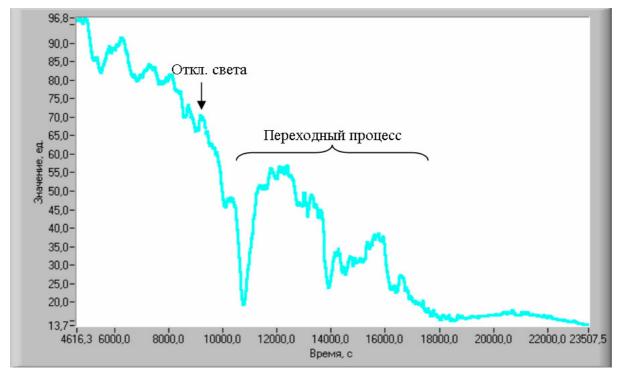


Рис. 16. Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на отключение света при УФ-облучении суспензии биореактора.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 150 об/мин; концентрация биомассы в момент отключения света в лаборатории –1,6 опт. ед.

В то время как отключение света при постоянном облучении суспензии ультрафиолетом либо отрицательно влияет на дыхательную активность (рис. 16), либо не влияет на дыхательную активность (рис. 15).

В отсутствии УФ-облучения дрожжи нечувствительны к воздействию видимого света.

Отклик дрожжевой популяции на режимы и изменение облучения, определяемый непосредственно из кривой роста биомассы, в целом, коррелировал с характером изменения хода величины pO_2 . В моменты, когда наблюдалось ускорение падения величины pO_2 , наблюдался более интенсивный рост дрожжей. Это подтверждает вывод о влиянии УФ-облучения и света, полученный на основании отклика датчика растворенного кислорода на включение-выключение ультрафиолета и света.

Таким образом, из анализа кривых отклика датчика растворенного кислорода и роста биомассы можно сделать вывод как о заметном влиянии ультрафиолета, так и о влиянии видимого света при облучении ультрафиолетом на рост дрожжей.

В отсутствии УФ-облучения дрожжи нечувствительны к видимому свету. Наилучшие условия для ускорения дыхания дрожжей – освещение ультрафиолетом и видимым светом.

Полученные данные указывают, что рост дрожжей при совместном действии УФ-излучения и видимого света на дрожжи не только не ингибируется, но и может стимулироваться. Для подтверждения такого стимулирования был поставлен ряд экспериментов по выращиванию дрожжей при постоянном действии ультрафиолета и/или света на всем протяжении цикла выращивания. Данные представлены на рис. 17.

Результаты этих экспериментов показывают, что явно наихудший рост наблюдается при облучении суспензии ультрафиолетом и затемнении биореактора. Для варианта выращивания дрожжей с облучением ультрафиолетом и светом наблюдается тенденция более интенсивного роста с превышением удельной скорости роста над вариантом без облучения (контроль) к моменту завершения экспоненциальной фазы роста (т.е. до момента исчерпания субстрата) и повышения конечного уровня накопления биомассы на 5–20%. Изучение влияния таких факторов как концентрация посевного материала и субстрата, интенсивность облучения, наличие светофильтров, отсекающих определенную часть спектра ультрафиолетового излучения, на рост и выход дрожжей показало следующее:

- разница по выходу конечной биомассы между облучаемыми на свету и в темноте вариантами более заметна при меньшей концентрации внесенного инокулята (менее 0,2 опт. ед.). С увеличением концентрации посевного материала эффект становится меньше. В темноте с ростом концентрации инокулята отрицательное действие умеренных доз УФ исчезает;
- положительный эффект сохраняется при повышении концентрации субстрата в среде;
- с увеличением интенсивности видимого света положительный эффект существенно не меняется;
- более интенсивное воздействие УФ-излучения лампы ДРШ на суспензию дрожжей порядка 5–10 Вт/л вызывает репрессию роста дрожжей независимо от того, освещается ли содержимое биореактора видимым светом или нет (рис. 10), при этом репрессирующий эффект сохраняется даже при повышении дозы вносимого инокулята в 2–3 раза.

Опыты с использованием светофильтров, отсекающих видимую часть спектра при облучении суспензии УФ-лампой ДРШ-100 (рис. 19), подтвердили предыдущие выводы о лучшем росте дрожжей при одновременном освещении суспензии видимым светом и ультрафиолетом и о худшем росте дрожжей при освещении УФ в темноте. Вместе с тем использование светофильтров не показало качественных изменений в характере отклика дрожжевых клеток. Эффект от действия светофильтра скорее всего связан с суммарным уменьшением дозы ультрафиолета, частично задерживаемого светофильтром, а не с изменением спектра падающего на суспензию излучения.

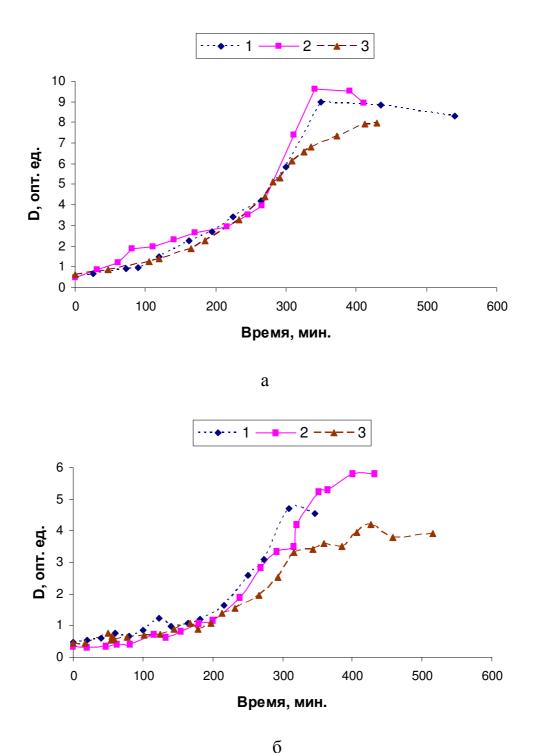


Рис. 17. Рост дрожжей *С. tropicalis* при облучении УФА-излучением умеренной интенсивности и видимым светом.

- 1 контроль (без УФ облучения, рост при включенном освещении лаборатории).
- 2 с УФ-облучением (лампа ДРШ-100, 1 Вт/л) с освещением лаборатории.
- 3 с УФ-облучением в темноте.

УФ-облучение через проточную кювету – с момента внесения инокулята.

- а Исходная концентрация субстрата (сахарозы) 16 г/л; исходная концентрация биомассы 0,6 опт. ед.
- 6 Исходная кончентрация субстрата (сахарозы) 8 г/л; исходная концентрация биомассы 0,4 опт. ед.

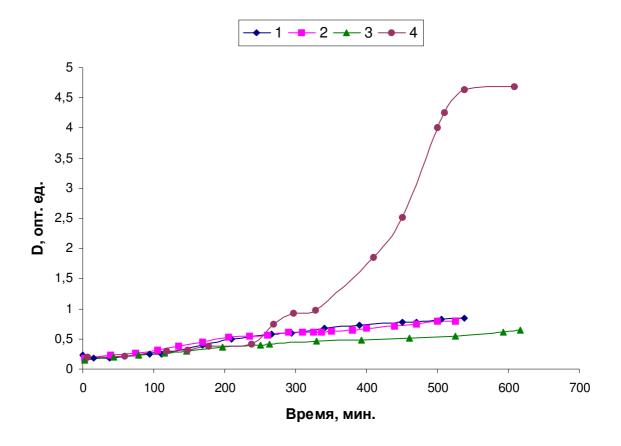


Рис. 18. Рост дрожжей С. tropicalis при облучении УФ большой интенсивности.

- 1. Облучение УФ с интенсивностью 5 Вт/л, рост при отключенном освещении лаборатории.
- 2. Облучение УФ с интенсивностью 5 Вт/л, рост при включенном освещении лаборатории.
- 3. Облучение УФ с интенсивностью 5 Вт/л при включенном освещении лаборатории с дополнительным освещением биореактора двумя лампами накаливания суммарной мощностью 175 Вт.
 - 4. Контроль, без УФ облучения биореактора.

Исходная концентрация субстрата (сахарозы) во всех вариантах 8 г/л; исходная концентрация биомассы -0.2 опт. ед.

Таким образом, в темноте действие мягкого ультрафиолета диапазона УФА или УФБ задерживает рост дрожжей. Освещение облученных клеток видимым светом даже небольшой интенсивности (40 мВт/л) устраняет ингибирование роста ультрафиолетом умеренной интенсивности (1 Вт/л). Одновременное действие и ультрафиолета и видимого света создает благоприятные условия для стимулирования роста дрожжей. В таком случае видимый свет на фоне действия ультрафиолета может выступать в качестве фактора, управляющего ростом клеток. Без видимого света ультрафиолет репрессиру-

ет рост дрожжей. Видимый свет без действия ультрафиолета не действует на рост дрожжей.

Как показали результаты экспериментов, представленных на рис. 20, 21, отклик на видимый свет популяции дрожжей, подвергнутых такому стрессовому воздействию, как замораживание дрожжевой суспензии с последующим размораживанием, во многом аналогичен отклику на воздействие УФ и видимого света. При этом замороженные-размороженные клетки (без УФоблучения) становятся чувствительными к видимому свету и на свету растут лучше чем без света. Рост после замораживания-размораживания без УФоблучения на свету аналогичен росту при действии УФ умеренной (1 Вт/л) дозы и света.

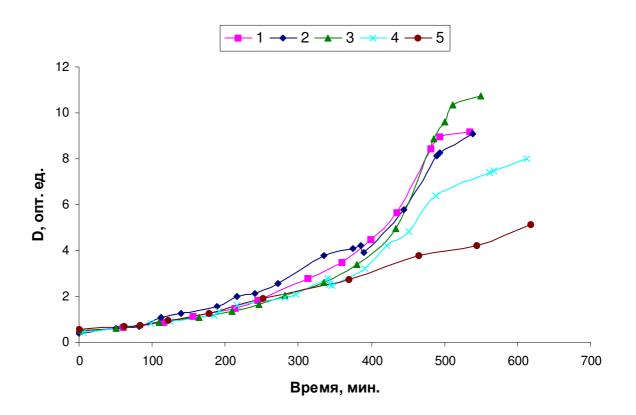


Рис. 19. Рост дрожжей C. tropicalis в зависимости от интенсивности УФ-облучения и наличия светофильтра Φ C-6.

Во всех вариантах исходная концентрация биомассы – 0,47 опт.ед.

N=370 об/мин. Исходная концентрация сахарозы 16 г/л.

УФ-облучение включено через 1,5 ч после внесения инокулята.

- 1. Контроль.
- 2. С УФ, светом и светофильтром ФС-6.
- 3. С УФ и светом.
- 4. С УФ макс. дозы, светом и светофильтром ФС-6.
- 5. С УФ макс. дозы, со светофильтром ФС-6 в темноте.

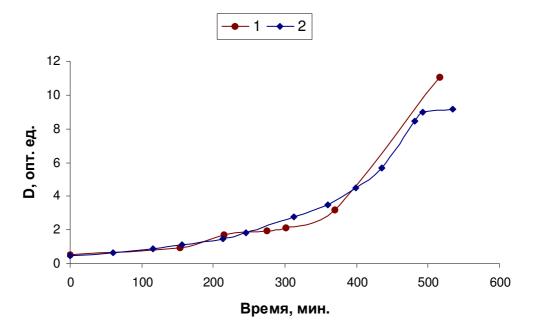


Рис. 20. Рост дрожжей *С. tropicalis* на свету после замораживанияразмораживания инокулята.

N=370 об/мин. Исходная концентрация сахарозы 16 г/л.

- 1. На свету с замораживанием-размораживанием инокулята.
- 2. На свету без замораживания-размораживания инокулята.

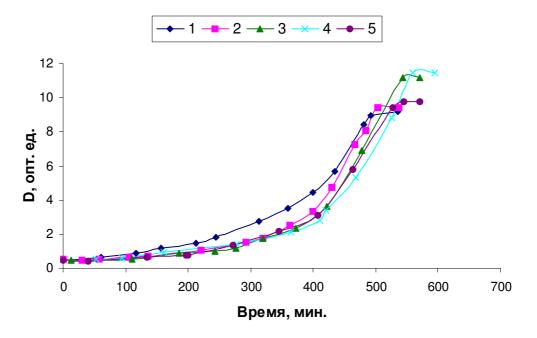


Рис. 21. Рост дрожжей *С. tropicalis* на свету и в темноте после замораживания-размораживания инокулята.

N=370 об/мин. Исходная концентрация сахарозы 16 г/л.

- 1. Контроль на свету без замораживания-размораживания.
- 2. В темноте с замораживанием-размораживанием.
- 3. Со светом с замораживанием-размораживанием.
- 4. С облучением УФ со светом.
- 5. В темноте с замораживанием-размораживанием.

Из данных, представленных на рис. 9–21, следует важный вывод: для того, чтобы гетеротрофные микроорганизмы (дрожжи) стали чувствительными к видимому свету, в том числе низкой интенсивности, они должны быть подвергнуты стрессовым воздействиям или находиться в состоянии стресса. При этом стрессовое состояние необязательно должно быть вызвано воздействием ультрафиолета, а например, такими факторами, как пероксид водорода, механическое действие (замораживание-размораживание) и, возможно, тепловой шок, ультразвук и др.

Чувствительность клеток, находящихся в состоянии стресса, к видимому свету может быть объяснена функционированием системы фоторепарации с фотолиазой в качестве ключевого фермента этой системы репарации. Поскольку в клетках прокариот и эукариот возможно одновременное функционирование нескольких систем репарации, их тесное пересечение на определенных путях метаболизма и регуляции физиологического состояния клеток, то этим можно объяснить чувствительность стрессовых клеток к видимому свету.

Обнаруженная новая возможность улучшения показателей ферментации предполагает, одновременное воздействие на выращиваемую культуру стрессфактора, в частности, оптимальных доз мягкого ультрафиолета, и антистрессфактора, например, видимого света. Такое стресс-антистрессорное воздействие можно охарактеризовать как управляемый или контролируемый окислительный стресс, как дополнительный инструмент в управляемом культивировании гетеротрофных микроорганизмов.

Комбинированное воздействие видимого света и мягкого ультрафиолета в определенной степени имитирует природное солнечное излучение, имеющее не только видимую, но и УФА и УФБ-составляющую и воздействующее на микроорганизмы, обитающие на поверхности воды, почвы, растений.

3.1.2. Исследование роста дрожжей *C. tropicalis* при воздействии УФизлучения и лазерного излучения видимого диапазона спектра

Полученные данные свидетельствуют, что в условиях окислительного стресса микроорганизмы могут быть чувствительны к воздействиям окружающей среды, которые принято относить к низкоэнергетическим, в частности к видимому свету низкой интенсивности (10–100 мВт/л). Первичным рецептором

таких низкоэнергетических воздействий может быть фермент фотолиаза — ключевой компонент системы фоторепарации. Фотолиазы, существующие у микроорганизмов, бывают двух типов [86, 87]. Их максимальная чувствительность к видимому свету проявляется в диапазонах 370-390 нм — для фотолиазы 1-го типа и 430-450 нм — для фотолиазы 2-го типа.

Для подтверждения факта чувствительности дрожжей в состоянии окислительного стресса к видимому свету низкой интенсивности были проведены эксперименты с облучением дрожжей светом лазера низкой энергии, низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) с использованием лазеров двух типов: гелий-неонового (красный свет) и аргон-ионного (сине-зеленый свет).

Изучение влияния лазерного излучения на рост дрожжей проводили в колбах на качалке (рис. 22).

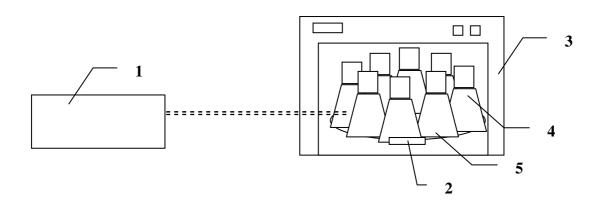


Рис. 22. Схема установки для культивирования микроорганизмов с облучением лазером

- 1 лазер (гелий-неоновый или аргон-ионный в зависимости от опыта)
- 2 качалка (тип Шейкер Ш8, производитель НПФ «Флоби», г. Москва)
- 3 термостат качалки (производитель Т8, производитель НПФ «Флоби», г. Москва).
- 4, 5 колбы в чехлах и без чехлов с чередованием через одну.

Способ организации перемешивания (качаний) колб на установке, представленной на рис. 22 – круговые качания платформы с колбами (до 8 колб на платформе). Платформа помещается в термостатируемый светонепроницаемый бокс со шторкой. Луч лазера проходит через окошко вырезанное в боковой стенке термостата (2), и освещает ближайшую к окошку колбу, при этом при качании все колбы периодически попадают под луч лазера с интервалом 10–20 с в зависимости от установленной скорости качаний. Часть колб (в опытах –

половина) помещена в светонепроницаемые чехлы (два слоя плотной черной ткани, содержимое колбы не освещается светом лазера), остальная часть качается без чехлов (содержимое колбы освещается светом лазера).

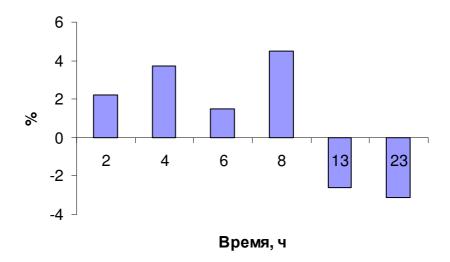


Рис. 23. Процентное отношение накопления биомассы на свету к накоплению в темноте по мере роста.

Приведены значения, усредненные по 4-м повторностям. Облучение инокулята ультрафиолетом не проводилось.

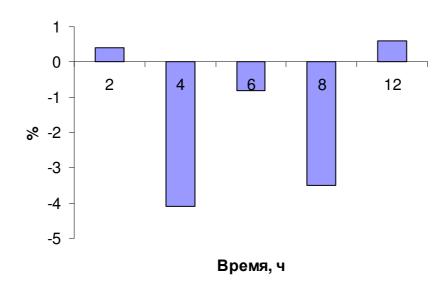


Рис. 24. Процентное отношение накопления биомассы при облучении He-Ne лазером к накоплению в темноте (без облучения) по мере роста.

Приведены значения, усредненные по 4-м повторностям. Облучение инокулята ультрафиолетом не проводилось.

На рис. 23–25 приведены усредненные по всем опытам данные о накоплении биомассы дрожжей в колбах при различных режимах облучения в сравнении (в %) с необлучаемыми и неосвещаемыми вариантами без облучения лазером и ультрафиолетом, но с освещением (колбы без чехлов) или без освещения (колбы в чехлах) светом лаборатории (контрольные опыты).

Видно, что без предварительного облучения ультрафиолетом различия в накоплении биомассы в колбах при росте дрожжей на свету и в темноте незначительны и не превышают ± 5 %.

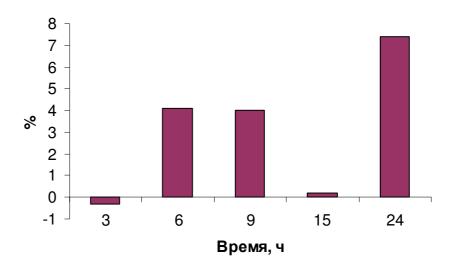


Рис. 25. Процентное отношение накопления биомассы при облучении Arионным лазером к накоплению в темноте (без облучения) по мере роста.

Приведены значения, усредненные по 4-м повторностям. Выходная мощность луча лазера 5 мВт. Облучение инокулята ультрафиолетом не проводилось.

Также не наблюдается положительного эффекта при облучении суспензии дрожжей одним только красным цветом He-Ne- лазера (рис. 24) без ее предоблучения ультрафиолетом.

Аналогично не наблюдается достоверного положительного эффекта (максимальные различия также не более 5–8%) при облучении содержимого качалочных колб аргон-ионным лазером без предоблучения дрожжевой суспензии ультрафиолетом (рис. 25).

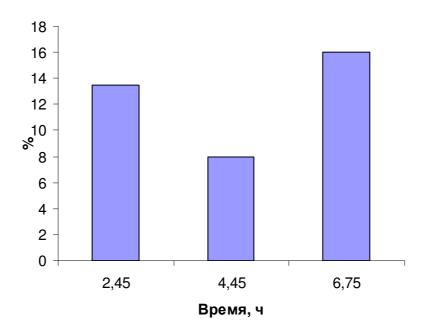


Рис. 26. Процентное отношение накопления биомассы при облучении He-Ne лазером к накоплению в темноте по мере роста.

Приведены значения, усредненные по 4-м повторностям. Инокулят предварительно облучался ультрафиолетом оптимальной дозы.

При предварительном облучении суспензии дрожжей ультрафиолетом последние становятся существенно более чувствительными к свету лазера. Так, предварительное облучение инокулята оптимальной дозой УФ излучения и дальнейшее облучение Не-Ne лазером по ходу роста дает увеличение прироста биомассы приблизительно 10-15% (рис. 26, 27), при этом наибольшая разница наблюдается в момент экспоненциальной фазы роста и к моменту исчерпания субстрата в среде она нивелируется (рис. 27). Из этого можно заключить, что Не-Ne лазер увеличивает скорость роста дрожжей, а не выход биомассы с единицы субстрата после предоблучения дрожжей оптимальной дозой ультрафиолета.

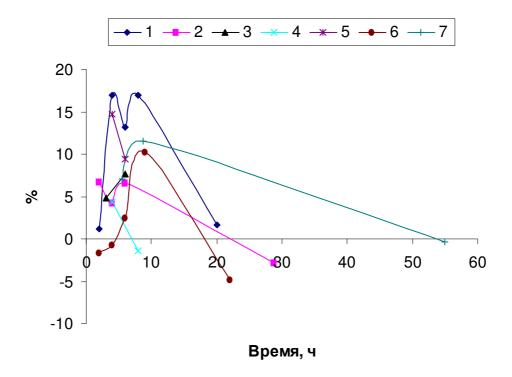


Рис. 27. Процентное различие в накоплении биомассы по ходу роста при облучении He-Ne лазером относительно роста без облучения лазером при различной концентрации дрожжей в облучаемой суспензии и дозе предоблучения ультрафиолетом.

- 1 инокулят (оптическая плотность суспензии во время облучения D=0,81) облучен ультрафиолетом с дозой 1150 Дж/л.
 - 2 инокулят (D=0,9) облучен ультрафиолетом с дозой 800 Дж/л.
- 3 инокулят (D=0,9) облучен ультрафиолетом с дозой 13600 Дж/л через светофильтр УФС-8.
 - 4 инокулят (D=42) облучен ультрафиолетом с дозой 6000 Дж/л.
 - 5 инокулят (D=75) облучен ультрафиолетом с дозой 16000 Дж/л.
 - 6 инокулят (D=0,63) облучен ультрафиолетом с дозой 3200 Дж/л.
 - 7 инокулят после замораживания-размораживания без УФ-облучения.

В опытах с облучением сине-зеленым светом Ar-ионного лазера также наблюдается стимулирование роста дрожжей, предоблученных ультрафиолетом (рис. 28). При этом нет явных отличий в стимулировании роста при низкой мощности выходного излучения лазера и при высокой. Для появления положительного эффекта достаточно мощности облучения около 5 мВт, что в пересчете на 1л суспензии выращиваемых дрожжей составляет около 10 мВт/л. Для красного света He-Ne лазера стимулирующий эффект наблюдается при мощности облучения 3 мВт/л.

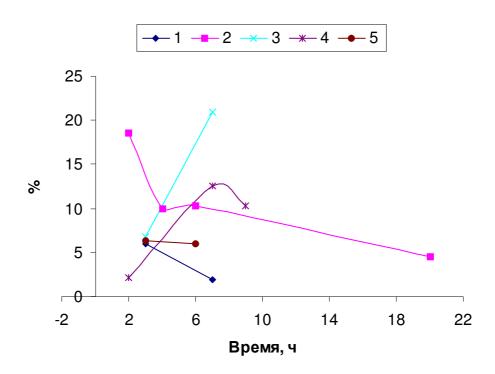


Рис. 28. Процентное различие в накоплении биомассы по ходу роста при облучении Ar-ионным лазером относительно роста без облучения лазером при различной концентрации дрожжей в облучаемой суспензии и дозе предоблучения ультрафиолетом.

- 1 инокулят (оптическая плотность суспензии во время облучения D=0,75) облучен ультрафиолетом с дозой 1500 Дж/л, выходная мощность лазера 5 мВт.
- 2 инокулят (D=0,75) облучен ультрафиолетом с дозой 1500 Дж/л, выходная мощность лазера 16 мВт.
- 3 инокулят (D=100) облучен ультрафиолетом с дозой 10500 Дж/л, выходная мощность лазера 5 мВт.
- 4 инокулят (D=100) облучен ультрафиолетом с дозой 11300 Дж/л, выходная мощность лазера 16 мВт.
- 5 инокулят (D=100) облучен ультрафиолетом с дозой 11300 Дж/л, выходная мощность лазера 50 мВт.

Для суспензии дрожжевых клеток с плотностью 0,5-1,0 опт. ед. (около 0,35-0,7 г/л по асд) оптимальная доза предоблучения ультрафиолетом составляет около 1000 Дж/л. Для суспензии дрожжевых клеток с плотностью 10-100

опт. ед. (около 7–70 г/л по асд) оптимальная доза предоблучения ультрафиолетом составляет около 10000 Дж/л.

С учетом результатов опытов с изучением влияния освещения светом дневных ламп на процесс культивирования в ферментере, можно ожидать стимулирующего действия видимого света на рост клеток дрожжей *Candida tropicalis*, предоблученных ультрафиолетом, при интенсивности около 10–100 мВт/л – для немонохроматического света, 1–10 мВт/л – для красного монохроматического света, 5–50 мВт/л – для сине-зеленого монохроматического света при дозе засевного материала при культивировании в периодических условиях 0,08–0,8 опт. ед. (0,06–0,6 г/л по абсолютно сухой биомассе).

Позитивное воздействие окислительного стресса на рост дрожжей р. Candida может отражать их приспособленность к экологическим условиям обитания на поверхности растений, в ситуациях избытка углеводного субстрата, кислорода и одновременно освещенности солнечным светом.

3.2. Культивирование дрожжей Saccharomyces cerevisiae

Исследования, проведенные с дрожжами Candida tropicalis в качестве модельной системы, позволили выявить условия, при которых воздействие факторов окислительного стресса позитивно с точки зрения показателей биосинтеза. Такое позитивное воздействие можно в определенной мере рассматривать как следствие экологических условий обитания дрожжей p. Candida в среде. В частности, на поверхности растений, плодов типичны ситуации избытка углеводного субстрата и кислорода и одновременно освещенности солнечным светом. В такой ситуации селективное преимущество будут получать те микроорганизмы, которые наиболее эффективным образом адаптируется к сочетанию отмеченных факторов, что должно отражаться и в способах регуляции их метаболизма. При этом сочетание таких факторов, как ультрафиолет и видимый свет, может служить сигналом о благоприятной погоде – в солнечную погоду температура поверхности быстрее прогревается, чем в пасмурную, когда УФизлучение Солнца не доходит до поверхности земли. Прогрев способствует размножению микроорганизмов, поэтому те варианты, которые быстрее реагируют на погодные изменения, на одновременное воздействие ультрафиолета и видимого света, получают адаптивное и селективное преимущество.

Однако с точки зрения получения результатов, важных для практики, большего внимания заслуживают микроорганизмы, широко используемые в промышленности, в частности, из дрожжей – дрожжи-сахаромицеты: Saccharomyces cerevisiae и др. Природные условия обитания многих видов дрожжей-сахаромицетов и дрожжей р. Candida схожи, однако в отличие от первых, представители р. Candida, в частности C. tropicalis не являются истинными бродильщиками – при исчезновении кислорода в среде их бродильная активность, определяемая по выделению СО₂, быстро падает. Вместе с тем, в экспериментах с C. tropicalis наблюдалось и повышение бродильной активности этих дрожжей по отношению к контролю после воздействия оптимальных доз факторов окислительного стресса.

Учитывая отмеченные особенности, были проведены исследования с дрожжами-сахаромицетами, в которых изучалось воздействие факторов окислительного стресса, в частности, пероксида водорода и мягкого ультрафиолета, на рост дрожжей в ходе культивирования.

3.2.1. Исследование эффекта адаптации к пероксиду водорода и ультрафиолету

В исследованиях с сахаромицетами использовались промышленный штамм дрожжей *S. cerevisiae* Meyen T 985 (термофильный, используется при производстве этанола из зерносырья на Серепрянопрудском биохимическом заводе, Моск. обл.) и *S. cerevisiae* SL-100.

Ранее в экспериментальных исследованиях [2] были получены данные о возможности положительного воздействия пероксида водорода на рост дрожжей и их бродильную активность. Было показано, что в неасептических услови-ЯХ при постоянном селективном давлении на популяцию дрожжейсахаромицетов, вызываемого пероксидом водорода, возможен отбор популяций дрожжей, доминирующих в ценозе и устойчивых к относительно большим дозам вносимого H_2O_2 при одновременном снижении бактериальной обсемененности дрожжевого ценоза. В этих исследованиях большая часть данных была получена в неасептических условиях культивирования. Также не обращалось внимание на такой фактор как видимый свет. Учитывая отмеченные обстоятельства, в опытах с сахаромицетами ставилась задача более детального выяснения особенностей влияния агентов окислительного стресса и отклика дрожжей на стресс с учетом возможного вклада фоторепарации (т.е. при освещении ферментационной среды с дрожжами).

Первым этапом исследований было выяснение возможности и скорости адаптации дрожжей к воздействию H_2O_2 в условиях контролируемого освещения среды культивирования. Большая часть опытов проводилась в качалочных колбах, другая часть — в колбах с перемешиванием содержимого магнитными мешалками (см. раздел "Материалы и методы"). Во всех случаях интенсивность освещения составляла 40 мВт/л среды. Для освещения использовались лампы дневного света.

Параллельно путем ведения последовательных пассажей в асептических условиях в зависимости от исследуемых факторов получали разные линии дрожжей при освещении и без освещения среды, в аэробных, микроаэрофильных или анаэробных условиях, при внесении разных концентраций H_2O_2 в среду культивирования, при разном содержании дрожжевой биомассы и субстрата (сахарозы) в ферментационной среде.

При культивировании в аэробных условиях колбы со средой и дрожжами ставились на качалку, а пересев проводился, как правило, один раз в сутки. При использовании анаэробных условий культивирование проводили в колбах с гидрозатвором, в микроаэрофильных – колбы с ватной пробкой стояли в покое. Все варианты термостатировались.

Таблица 3. Чувствительность штамма дрожжей Т985 первого пассажа к пероксиду водорода

| Концентрация | 0,15 г/л Н ₂ О ₂ | | | 0,3 г/л Н ₂ О ₂ | | | 0,6 г/л Н ₂ О ₂ | | |
|---------------|--|-----------|--------------|---------------------------------------|-------|-------|---------------------------------------|-------|-------|
| сахарозы, г/л | Содержание дрожжей в | | | Содержание дрожжей в | | | Содержание дрожжей в | | |
| | момен | т внесени | я H_2O_2 , | момент внесения H_2O_2 , | | | момент внесения H_2O_2 , | | |
| | г/л | | | г/л | | | г/л | | |
| | 0,36- | 1,09- | 2,18- | 0,36- | 1,09- | 2,18- | 0,36- | 1,09- | 2,18- |
| | 0,48 | 1,33 | 2,42 | 0,48 | 1,33 | 2,42 | 0,48 | 1,33 | 2,42 |
| 5 | +/- | _ | _ | + | +/- | +/- | + | + | +/- |
| 30 | +/- | _ | _ | +/- | +/- | +/- | + | +/- | +/- |

⁺ гибель подавляющей части популяции дрожжей, летальные дозы H_2O_2 .

⁻ нет отличий от контроля (без H_2O_2).

^{+/-} промежуточные варианты, сублетальные дозы H_2O_2 .

В предварительных экспериментах, проведенных со штаммом Т 985, были найдены летальные концентрации пероксида водорода и сублетальные дозы внесения пероксида, не приводящие к инактивированию большей части клеток дрожжей в условиях освещения содержимого колб при культивировании в аэробных условиях. Результаты этих опытов приведены в таблице 3.

Концентрации дрожжей в момент внесения пероксида водорода (табл. 3) соответствуют: 0,36–0,48 г/л – ранней экспоненциальной фазе, 1,09–1,33 г/л – середине экспоненциальной фазы, 2,18–2,42 г/л – предстационарной фазе роста.

Внесение более высоких концентраций пероксида (1,2–1,8 г/л) приводит к полному вымиранию культуры.

С внесением найденных сублетальных доз H_2O_2 была проведена серия пассажей с ведением 5 линий дрожжей штамма Т 985 в аэробных условиях и при освещении среды при концентрации сахарозы в исходной среде 5/л и 30 г/л и разной концентрации вносимого H_2O_2 и дрожжей, а также 3 линий дрожжей штамма Т 985 в анаэробных условиях при освещении и концентрации сахарозы в исходной среде 100 г/л. Следом за этими опытами провели аналогичные исследования со штаммом SL-100 при концентрации сахарозы в исходной среде 150 г/л с внесением H_2O_2 в дозах 0.6 г/л и культивировании в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях.

Каждый раз доза засевных дрожжей при пересеве составляла 10 % об. Во всех пассажах через 3 ч после внесения пероксида определялась доля мертвых клеток в дрожжевой суспензии. Результаты этих экспериментов представлены на рис 29–31.

Видно, что в аэробных условиях (рис. 29, 30) в контроле доля мертвых клеток при содержании сахарозы 30 г/л выше, чем при 5 г/л. Однако, при большей концентрации субстрата клетки более устойчивы к пероксиду. При содержании сахарозы 5 г/л количество мертвых клеток в пассажах всех линий по мере пересевов остается практически неизменным. Однако при содержании сахарозы 30 г/л наблюдается явная тенденция уменьшения доли мертвых клеток при внесении H_2O_2 в количестве 0,3–0,6 г/л в суспензию с содержанием дрожжей 2,18–2,42 г/л по мере возрастания числа пересевов, т.е. в этих условиях явно наблюдается адаптация популяция дрожжей к пероксиду.

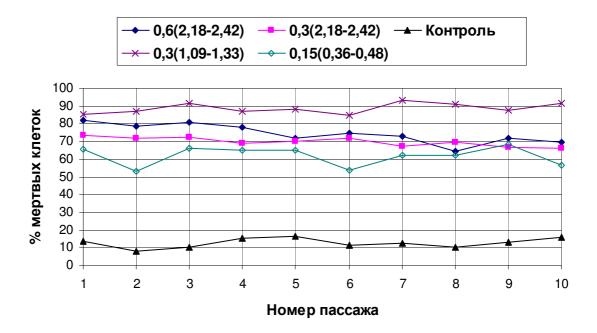


Рис. 29. Изменение доли мертвых клеток штамма Т 985 по мере увеличения количества пассажей при внесении H_2O_2 при начальной концентрации субстрата 5 г/л и культивировании в аэробных условиях.

Первая цифра в надрисуночной подписи — доза вносимого H_2O_2 , значения в скобках — концентрация биомассы в момент внесения (приведен интервал изменения с учетом варьирования в пассажах).

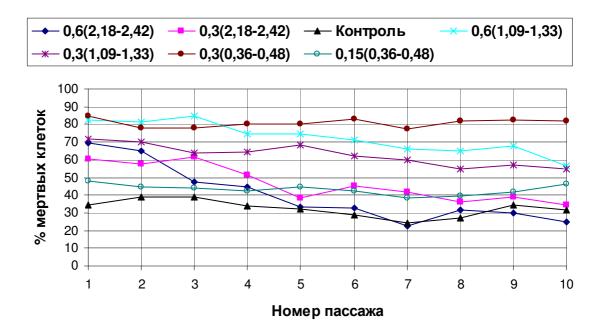


Рис. 30. Изменение доли мертвых клеток штамма Т 985 по мере увеличения количества пассажей при внесении H_2O_2 при начальной концентрации субстрата 30 г/л и культивировании в аэробных условиях.

Обозначения – см. рис. 29.

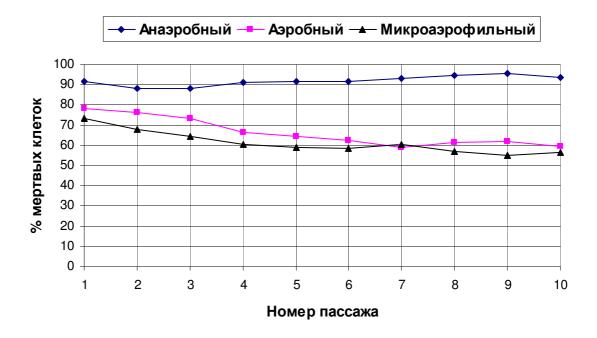


Рис. 31. Изменение доли мертвых клеток штамма SL-100 в пассажах по мере адаптации к воздействию H_2O_2 при различных условиях аэрации.

Исходная концентрация сахарозы в среде – 150 г/л.

Для штамма SL-100 (рис. 31) доля мертвых клеток была существенно выше (большая начальная концентрация субстрата – 150 г/л), чем для штамма Т 985. Однако как и в случае дрожжей штамма Т 985, в аэробных условиях штамм SL-100 адаптировался к воздействию пероксида водорода по мере роста пассажей. Аналогичные изменения наблюдались и в микроаэрофильном режиме. В то же время в анаэробных условиях дрожжевые клетки не адаптировались к внесению пероксида: доля мертвых клеток оставалась на одном и том же уровне (рис. 31).

Пересев дрожжей 5-го и 10-го пассажей, адаптированных к H_2O_2 , на ту же среду, но без внесения пероксида водорода, показал, что устойчивость клеток к стрессовым воздействиям сохраняется лишь после первого пересева, на 2-ом пересеве они ухудшаются и к 3-му пересеву без внесения H_2O_2 культура возвращается практически на уровень контроля.

Таким образом, наблюдается довольно быстрая деадаптация после прекращения внесения H_2O_2 с возвратом культуры к исходному состоянию. Это может говорить о том, что в процессе адаптации изменения обусловлены индукцией и поддержанием в течение некоторого времени систем репарации, помогающим клеткам преодолевать неблагоприятное воздействие стрессоров, при этом скорее всего не происходит отбор относительно устойчивых субклонов на генетическом уровне, что согласуется с литературными данными [3].

С учетом наблюдаемых закономерностей для анализа изменений в показателях роста была проведена дополнительная серия экспериментов, в которых по мере роста определялись содержание биомассы в среде, удельная скорость роста (в экспоненциальной фазе между 6–7 и 11–12 ч культивирования), а также конечный рН по окончании культивирования.

По ходу пересевов из колб производился отбор части суспензии (10 % об.), которая высевалась на питательную среду с последующим определением показателей роста в условиях освещения, но без добавления пероксида.

Результаты этих исследований приведены для штамма Т 985 на рис. 32–34, а для штамма SL-100 на рис. 35.

При исходном содержании сахарозы в среде 30 г/л при использовании в качестве инокулята линий дрожжей Т 985 с оптимальными условиями внесения H_2O_2 уровень накопления биомассы в конце культивирования начал превышать контрольный уже после 2-го пассажа (рис. 32).

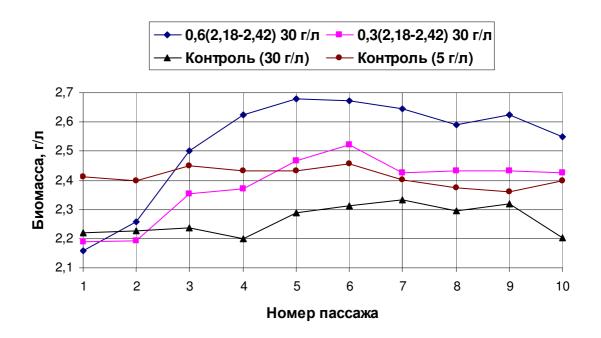


Рис. 32. Изменение конечного уровня накопления биомассы штаммом Т 985 в аэробных условиях по мере увеличения количества пассажей при внесении H_2O_2 и содержании сахарозы в исходной среде 30 г/л.

Обозначения – см. рис. 29.

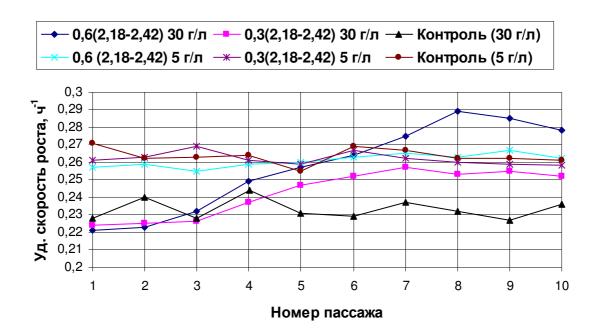


Рис. 33. Изменение удельной скорости роста штамма Т 985 в аэробных условиях по мере увеличения количества пассажей при внесении H_2O_2 и содержании сахарозы в исходной среде 30 г/л.

Обозначения – см. рис. 29.

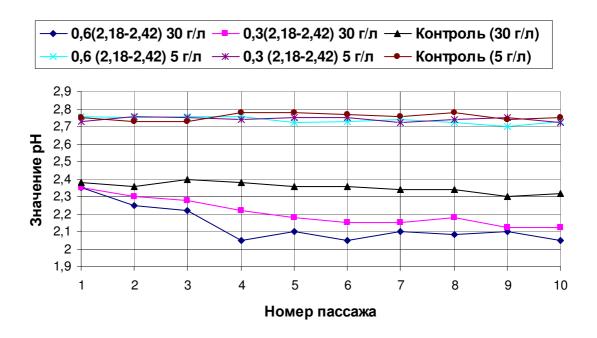


Рис. 34. Изменение конечного значения pH по мере увеличения количества пассажей штамма T 985 при внесении H_2O_2 и содержании сахарозы в исходной среде 30 г/л.

Обозначения – см. рис. 29.

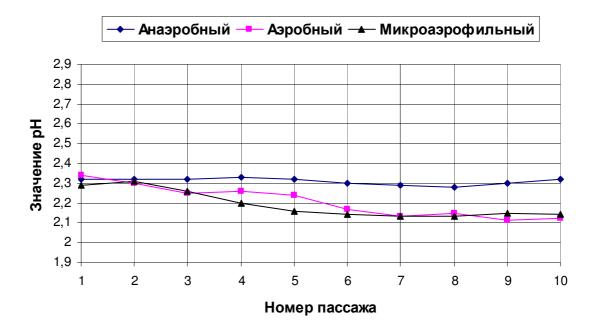


Рис. 35. Изменение конечных значений рН в пассажах штамма SL-100 по мере адаптации к воздействию H_2O_2 при различных условиях аэрации.

Исходная концентрация сахарозы в среде – 150 г/л.

Для вариантов с начальной концентрацией субстрата 5 г/л содержание биомассы существенно не отличалось от содержания в контрольном варианте (данные не приведены).

Для этих же линий при исходном содержании сахарозы в среде 30 г/л на-блюдались аналогичные благоприятные изменения в удельной скорости роста (рис. 33). В аэробных условиях в виду отсутствия подтитровки по ходу культивирования рН сильно меняется. При исходных рН среды 5,8 и концентрации сахарозы 5 г/л конечный рН при культивировании штамма Т 985 понижается до 2,75 и не отличается существенно для всех линий. В вариантах с начальной концентрацией субстрата 30 г/л при использовании инокулята контрольной линии рН снижался до 2,32–2,38 и не зависел существенно от количества пассажей (рис. 34). Однако в линиях с оптимальными условиями внесения H_2O_2 по мере возрастания числа пассажей достигаемый конечный рН снижался: в линии с внесением 0,3 г/л H_2O_2 в суспензию с 2,18–2,42 г/л биомассы конечный рН в первом пассаже понизился до 2,35, а в десятом — до 2,12; в варианте с внесением 0,6 г/л H_2O_2 в суспензию с 2,18–2,42 г/л биомассы конечный рН в первом пассаже понизился до 2,35, а в десятом — до 2,05.

Таким образом, наблюдается явная корреляция между падением доли мертвых клеток, возрастанием уровня накопления биомассы, удельной скорости роста и устойчивостью к рН по мере пересевов в линиях с оптимальными условиями внесения H_2O_2 , т.е. наблюдается адаптация популяции в пероксиду водорода с изменением показателей культивирования в благоприятную сторону, при этом повышается и устойчивость клеток к внесению повышенных доз H_2O_2 : адаптированные клетки выдерживают внесение 1,8-2,4 г/л пероксида, тогда как в контрольном варианте клетки полностью погибают при внесении 1,2 г/л пероксида (данные не представлены на рисунках).

Одновременно с приобретением устойчивости к H_2O_2 клетки становятся устойчивыми к более низким pH.

С повышением концентрации биомассы в момент внесения H_2O_2 устойчивость популяции дрожжей к пероксиду также повышается. Очевидно, этот эффект обусловлен более высокой суммарной каталазной активностью при высокой концентрации биомассы, поэтому скорость разложения пероксида, наблюдаемого сразу после внесения в среду с дрожжами, выше и при одних и тех же дозах внесения H_2O_2 клетки подвергаются воздействию пероксида в течение более короткого времени.

Как следует из данных, приведенных на рис. 36 и 37, действие мягкого ультрафиолета во многом аналогично действию пероксида водорода, при этом решающее значение для адаптации имеет фактор освещения.

Доля мертвых клеток, подвергнутых действию одной и той же дозы пероксида либо УФ, при последующем нахождении в темноте составляет около 90% и 80% соответственно для 1-го пассажа. Без освещения доля мертвых остается высокой и к 10-ому пассажу: примерно 70% при воздействия пероксида (рис. 36) и 60% при воздействии УФ (рис. 37).

При освещении же среды доля мертвых клеток падает до уровня в контроле (без воздействия стресс-фактора) уже к 5-му пассажу. При этом возрастание интенсивности освещения с 40 мВт/л до 90 мВт/л не сказывается существенно на выживаемости и скорости адаптации клеток. Таким образом, достаточно рассеянного света с интенсивностью 40 мВт/л, чтобы восстановить жизнеспособность клеток. Свет в данном случае выступает как антистрессор, помогающий клеткам дрожжей преодолевать последствия окислительного стресса, вероятно, через механизм фоторепарации.

Такая перекрестная адаптация к H_2O_2 , УФ и рН подтверждает ранее полученные данные для сахаромицетов, согласно которым предадаптация дрожжей к рН и пероксиду позволяет культуре выдержать облучение большей, чем в контроле дозой ультрафиолета или гамма излучения [35].

Закономерен вопрос, чем может быть обусловлено благоприятное воздействие пероксида водорода на показатели культивирования: повышение скорости накопления и выхода биомассы. Можно было бы предположить, что при культивировании в колбах без рН-статирования повышение выхода биомассы при адаптации к H_2O_2 следует из способности дрожжей развиваться при более низких рН (рис. 34, 35), поскольку благоприятные эффекты не наблюдаются при невысоких концентрациях сахарозы в среде (порядка 5 г/л). В последнем случае рН не успевает понизиться до достаточно низких значений к концу культивирования. Однако такому предположению противоречит повышение удельной скорости роста у адаптированных дрожжей (рис. 33), а также результаты последующих экспериментов, проведенные в биореакторе с поддержанием оптимального рН.

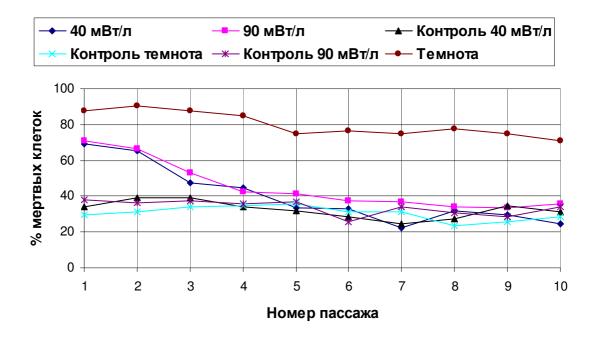


Рис. 36. Изменение доли мертвых клеток в пассажах штамма Т 985 по мере адаптации к оптимальным дозам пероксида водорода при различном уровне освещения среды.

Культивирование в колбах в аэробных условиях, начальная концентрация субстрата 30 г/л. Измерение доли мертвых проводилось через 3 часа после воздействия пероксида.

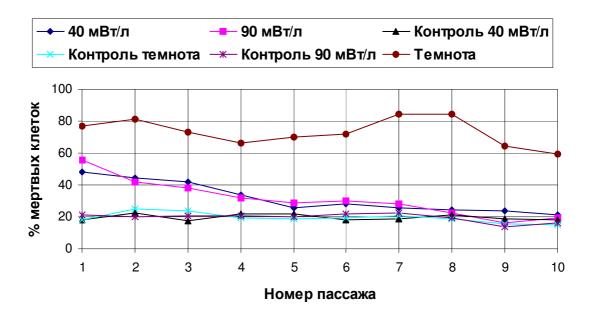


Рис. 37. Изменение доли мертвых клеток в пассажах штамма Т 985 по мере адаптации к воздействию мягкого УФ при различном уровне освещения среды.

Условия культивирования и измерения аналогичны рис. 36.

Другое объяснение может быть основано на стимулировании синтеза стеринов и ненасыщенных жирных кислот при действии окислительных стрессоров. Так, известно, что для поддержания бродильной активности в анаэробном режиме дрожжам необходимо присутствие небольших количеств молекулярного кислорода в среде культивирования, которые необходимы для синтеза стеринов, в частности, эргостерина, и ненасыщенных жирных кислот [77, 4], поэтому в производственных условиях подготовку посевного материала проводят в микроаэрофильных условиях. Также известно, что синтез эргостерина усиливается при обработке клеток УФ излучением, что используется в реальном промышленном процессе производства эргостерина [10]. Если это объяснение верно, то можно было бы ожидать, что эффект адаптации к пероксиду водорода или ультрафиолету будет проявляться и при анаэробных условиях культивирования, чего, однако, не наблюдается для штамма SL-100 (рис. 35). Кроме того, такое предположение кажется неубедительным и потому, что положительный эффект наблюдается в аэробных условиях, когда в среде достаточно кислорода для синтеза необходимых компонентов клеточных мембран: и в присутствии пероксида, и в отсутствие его. Также трудно объяснить тот факт, что при невысоких концентрациях сахарозы в исходной среде (порядка 5 г/л) эффект адаптации не наблюдается.

Следуя данным литературы [83] наиболее вероятная причина благоприятных изменений может заключать в дерепрессии под действием пероксида путей метаболизма, репрессируемых высокими концентрациями сахарозы.

Известно, что высокие концентрации сбраживаемых углеводов у дрожжейсахаромицетов активирует гликолиз и репрессируют аэробные пути катаболизма даже в присутствии кислорода (эффект Кребтри) [10]. Это приводит к снижению выхода биомассы при повышении концентрации сахаров в среде, что наблюдалось и в наших опытах. Так, при росте на среде с 5 г/л сахарозы конечный уровень накопления биомассы (штамм Т 985) в контроле составил 2,4–2,5 г/л, а с 30 г/л сахарозы – 2,1–2,3 г/л при полном сбраживании субстрата.

Дополнительные данные, свидетельствующие в пользу дерепрессии аэробных путей катаболизма, были получены в ходе изучения изменений под действием H_2O_2 в динамике роста биомассы, потребления субстрата, дыхательной активности.

3.2.2. Динамика роста и потребления субстрата при внесении H₂O₂

Следующий этап исследований проводился в лабораторном биореакторе с контролем рН, содержания растворенного кислорода в среде, уровня освещенности содержимого реактора (освещение лампами дневного света через стеклянную обечайку биореактора, интенсивность освещения 40 мВт/л) и отслеживанием динамики накопления биомассы, потребления субстрата, изменения сопутствующих показателей при использовании в качестве инокулята (объем внесения 6% от объема ферментационной среды) неадаптированных и адаптированных к пероксиду (5-й и 10-й пассажи, см. раздел 3.2.1) дрожжей.

На рис. 38–40 представлены результаты культивирования неадаптированных и адаптированных дрожжей штамма Т 985 в аэробных условиях на среде с исходным содержанием сахарозы 30 г/л и освещением лабораторного биореактора.

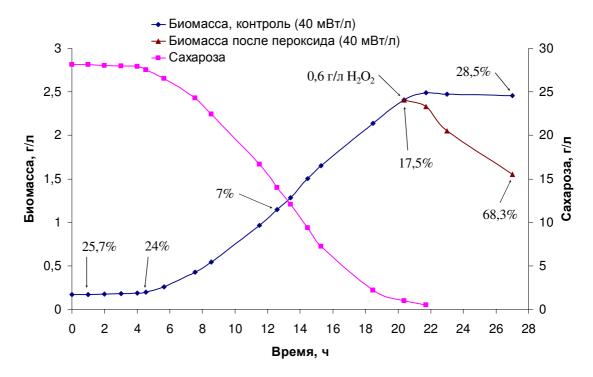


Рис 38. Накопление биомассы и потребление субстрата штаммом Т 985 в аэробных условиях культивирования в биореакторе при использовании в качестве инокулята неадаптированной культуры (контрольный вариант).

Цифрами у стрелок указана доля мертвых клеток.

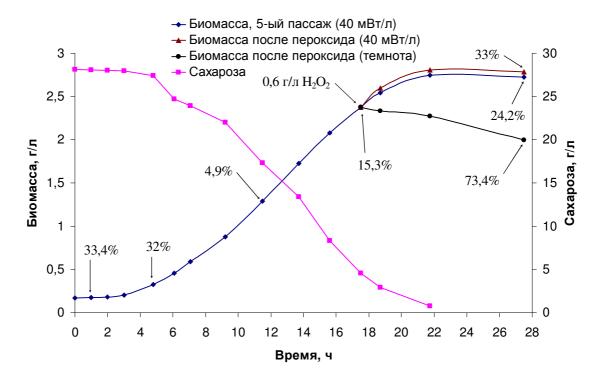


Рис 39. Накопление биомассы и потребление субстрата штаммом Т 985 в аэробных условиях культивирования в биореакторе при использовании в качестве инокулята адаптированной линии 5-го пассажа.

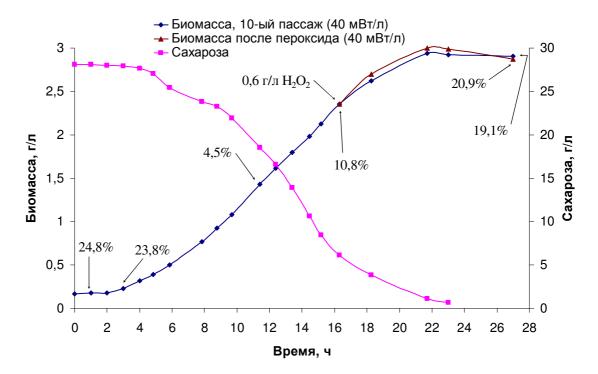


Рис. 40. Накопление биомассы и потребление субстрата штаммом Т 985 в аэробных условиях культивирования в биореакторе при использовании в качестве инокулята адаптированной линии 10-го пассажа.

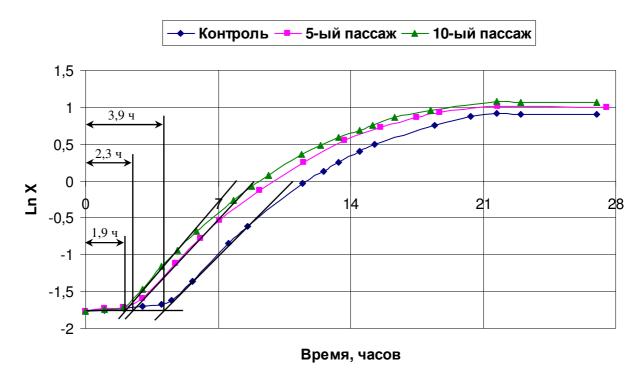


Рис. 41. Определение лаг-фазы при культивировании дрожжей штамма Т 985 неадаптированных, 5-го и 10-го пассажей.

Видно, что при использовании дрожжей 5-го пассажа конечный уровень накопления биомассы увеличивается на 11% по сравнению с неадаптированным (контрольным вариантом), а при использовании 10-го пассажа — на 18%. Потребление сахарозы в контроле идет с большей скоростью по сравнению с адаптированными дрожжами.

Добавление пероксида водорода (0,6 г/л, момент внесения показан на рисунках 38–40) в предстационарную фазу приводит к лизису клеток в контрольном варианте (рис. 38): на момент окончания опыта после внесения H_2O_2 доля мертвых клеток достигает 68,3%, уровень биомассы падает на 37% по сравнению с тем же вариантом без внесения пероксида. При культивировании же адаптированных дрожжей наблюдается даже некоторое увеличение выхода биомассы после добавления пероксида по сравнению с вариантами без внесения H_2O_2 . К концу опыта после внесения пероксида водорода при культивировании дрожжей 5-го пассажа доля мертвых клеток составляет 33%, а 10-го пассажа – 20,9% (рис. 39, 40).

Положительные изменения у адаптированных линий дрожжей сказываются и на уменьшении лаг-фазы (рис. 41). По сравнению с контролем, продолжительность лаг-фазы при засеве дрожжей 10-го пассажа снижается более чем в 2 раза. При культивировании дрожжей неадаптированных, 5-го и 10-го пассажей значения удельных скоростей роста в экспоненциальной фазе изменялись незначительно и составляли около $0.26 \, \text{ч}^{-1}$.

Сразу же после внесения H_2O_2 наблюдается кратковременное (продолжительность 1–2 мин) резкое увеличение содержания кислорода в среде, обусловленное выделением его при разложении пероксида. Однако затем происходит резкое падение величины pO_2 (рис. 42), что свидетельствует об усилении дыхательной активности культуры.

В пользу предположения об активизации окислительных путей метаболизма свидетельствуют и результаты анализа содержания $HAД^+$ в дрожжевых клетках до и после внесения H_2O_2 .

Анализ содержания $HAД^+$ в биомассе неадаптированной и адаптированных линий дрожжей, выполненный со штаммом Т 985, показал, что в адаптированных линиях через 3 ч после внесения H_2O_2 содержание $HAД^+$ существенно выше, чем в контрольной линии без внесения H_2O_2 (рис. 43), что коррелирует с возрастанием дыхательной активности после внесения пероксида (рис. 42).

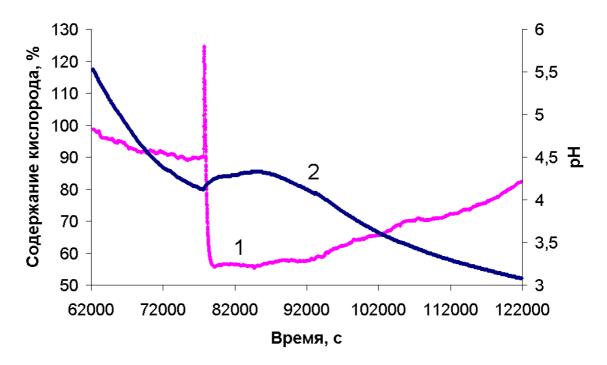


Рис. 42. Усиление дыхательной активности при культивировании адаптированного 10-го пассажа после внесения H_2O_2 .

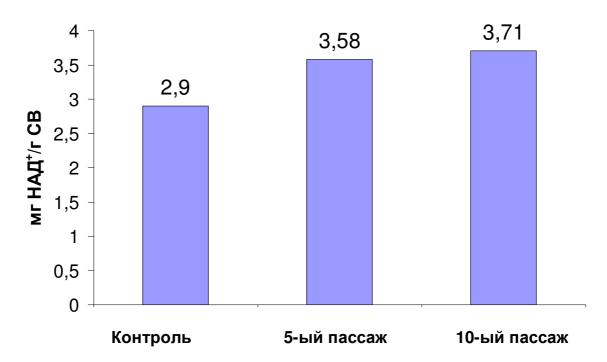


Рис. 43. Изменение содержания НАД⁺ в линиях дрожжей по мере адаптации к пероксиду водорода.

В линиях с адаптацией к H_2O_2 внесение пероксида осуществлялось в предстационарную фазу, измерение $HAД^+$ проводилось спустя 3 ч.

Как и при культивировании в колбах, при выращивании адаптированных к пероксиду линий дрожжей для возникновения физиологически благоприятных изменений важно освещение содержимого ферментационной среды видимым светом (рис. 39). В темноте после внесения H_2O_2 в предстационарной фазе культивирования через 10 ч доля мертвых клеток составляла 73,4%, а на свету 33%.

Таким образом, наблюдаемые изменения — замедление скорости потребления субстрата, повышение выхода биомассы, возрастание дыхательной активности свидетельствуют в пользу предположения о дерепрессии аэробных путей метаболизма под действием пероксида водорода, что влечет за собой более экономное расходование субстрата клетками. Важное значение для возникновения благоприятных изменений имеет фактор освещения клеток дрожжей видимым светом.

Эти физиологические изменения могут неоднозначно влиять на рост и бродильную активность дрожжей в анаэробных условиях культивирования. Конечный результат будет определяться лимитирующим фактором. С одной стороны, если конечный результат определяется жизнеспособностью клеток, их физиологической активностью, то повышение физиологической активности, жизнеспособности клеток дрожжей может способствовать и повышению их бродильной активности в условиях анаэробиоза. С другой стороны, как следует из данных литературы, внесение пероксида водорода репрессирует в первую очередь гликолиз и если лимитирующей стадией брожения является именно гликолиз, то в анаэробных условиях следует ожидать подавления бродильной активности в адаптированных линиях дрожжей. Дальнейшие эксперименты, показали, что бродильная активность адаптированных линий дрожжей может быть выше, т.е. более важен фактор поддержания высокой жизнеспособности и физиологической активности дрожжевых клеток.

Результаты дополнительных экспериментов, проведенных в биореакторе в анаэробных условиях со штаммами Т 985 и SL-100, подтверждают вывод о возможности повышения бродильной активности линий дрожжей, адаптированных к H_2O_2 .

Эти эксперименты проводились следующим образом. Готовился посевной материал в аэробных условиях при освещении среды (интенсивность освещения 40 мВт/л). При использовании неадаптированной линии при подготовке по-

севного материала H_2O_2 в среду не вносился. При использовании адаптированной линии — вносился в предстационарной фазе роста. Дрожжи вносились в среду в биореакторе и выращивались в течении 27 ч в аэробных условиях на среде с 30 г/л сахарозы при освещении биореактора или в темноте. Затем содержимое биореактора сливалось до объема 1 л, добавлялся 1 л свежей стерильной среды (концентрация сахарозы становилась 150 г/л) и процесс ферментации продолжался в анаэробных условиях также при освещении биореактора или в темноте.

На рис. 44A—44С представлены результаты культивирования дрожжей штамма Т 985 неадаптированной и 5-го и 10-го пассажей адаптированных к пероксиду линий в анаэробных условиях при освещении биореактора.

Во всех вариантах лаг-фаза роста была примерно одинаковая (около 3 ч). Однако удельные скорости роста биомассы в экспоненциальной фазе были у адаптированных вариантов выше и составляли $0,067 \, \text{ч}^{-1}$ – для линии 10-го пассажа, $0,059 \, \text{ч}^{-1}$ – для линии 5-го пассажа и $0,046 \, \text{ч}^{-1}$ – для неадаптированных дрожжей.

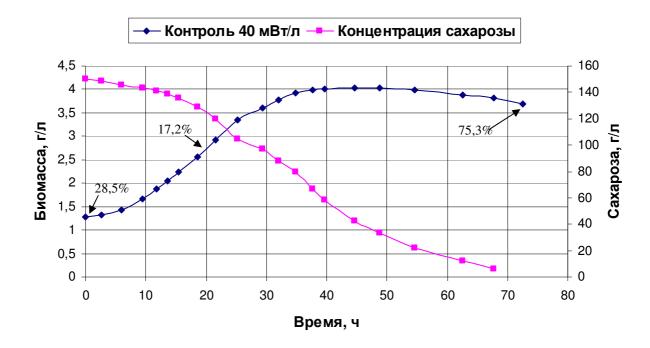


Рис. 44А. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе неадаптированной линии дрожжей (контрольный вариант) штамма Т 985 и освещении среды.

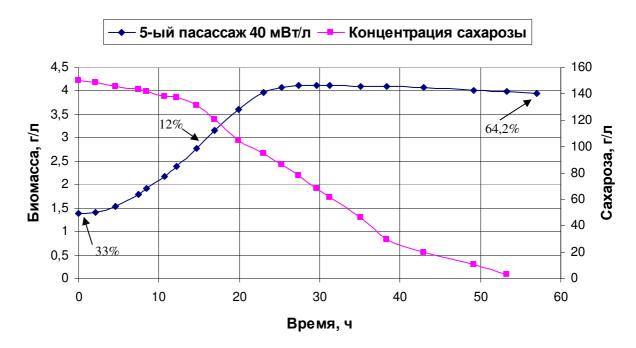


Рис. 44В. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе адаптированной к пероксиду линии дрожжей 5-го пассажа (штамм Т 985) и освещении среды.

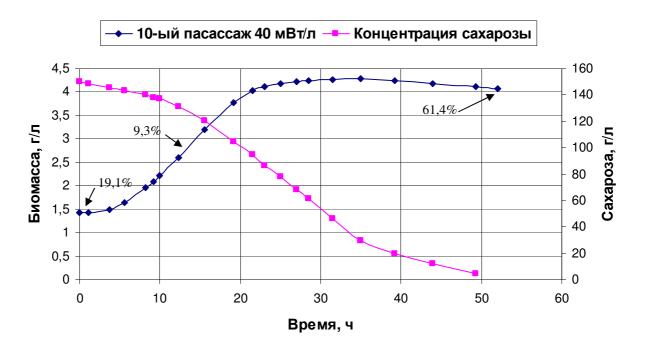


Рис. 44С. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе адаптированной к пероксиду линии дрожжей 10-го пассажа (штамм Т 985) и освещении среды.

По окончании брожения концентрация сахарозы во всех вариантах не превышала 1 г/л. Доля мертвых клеток в экспоненциальной и стационарной фазах роста в вариантах с адаптированными дрожжами была ниже.

Выделение углекислого газа во всех вариантах начиналось примерно через 20 мин. после долива свежей среды и перехода в анаэробный режим культивирования. Однако последующая скорость сбраживания субстрата у адаптированных линий была существенно выше (рис. 45): наибольшая – при использовании адаптированных дрожжей 10-го пассажа, несколько ниже, но тем не менее превышающая уровень контроля, – при использовании дрожжей 5-го пассажа. 10-ый предадаптированный пассаж завершает брожение через 52 ч, 5-ый – через 57 ч, а контроль – через 72,5 ч.

Содержание спирта во всех вариантах было практически одинаково и составляло 6,2–6,4%.

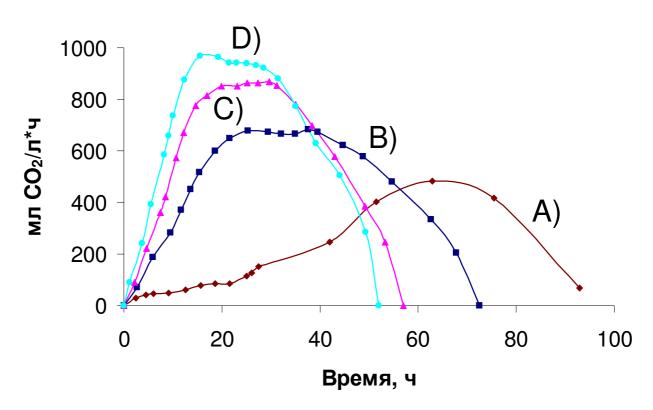


Рис. 45. Бродильная активность при анаэробном культивировании штамма сахаромицетов Meyen T 985 в биореакторе. А – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост в темноте; В – неадаптированная культура (контроль), рост на свету; С – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост на свету; D – адаптированная культура (инокулят – линия 10-го пассажа), рост на свету.

В темновых условиях ферментации использование пероксида водорода на стадии подготовки посевного материала и при адаптированных линий дрожжей приводило к резкому ухудшению показателей роста и брожения (рис. 45A, 46). Лаг-фаза в этом случае составляла 47 ч, удельная скорость роста в экспоненциальной фазе – 0,044 ч⁻¹, а конечный выход биомассы снизился на 40%. Резко выросла и доля мертвых клеток: в середине экспоненциальной фазы роста – до 42%, к концу культивирования – до 92%. Продолжительность брожения составила более 93 ч, а выход спирта – всего 4,1%.

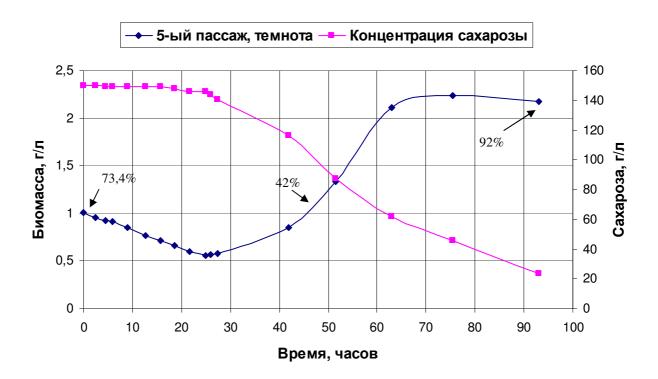


Рис. 46. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе адаптированной к пероксиду линии дрожжей 5-го пассажа (штамм Т 985) в темноте.

Аналогичные закономерности наблюдались для штамма SL-100 (рис. 47–49).

В отличие от опытов со штаммом Т 985 при анаэробном культивировании штамма SL-100 посевной материал вносился непосредственно из колб в количестве 10% об. Опыты также проводились при освещении содержимого колб и ферментера.

В случае адаптации к пероксиду линии дрожжей SL-100 в аэробных или микроаэрофильных условиях полученные адаптированные линии дрожжей 10-го пассажа, используемые в качестве посевного материала, показывали более высокую бродильную активность при переносе клеток в анаэробные условия при примерно схожей динамике накопления биомассы и потребления субстрата (рис. 47 – 48). Доля мертвых клеток на протяжении всех стадий роста и брожения была ниже при использовании адаптированной линии по сравнению с долей в случае использования контрольной, неадаптированной линии дрожжей. Такие изменения ведут к повышению выхода этанола и, по всей видимости, к уменьшению содержания побочных продуктов брожения. Выход спирта при выращивании посевного материала в аэробных или микроаэрофильных условиях в контрольном варианте составил 4,1–4,4%, а при использовании адаптированных дрожжей 10%-го пассажа – 4,7–5,1%. Остаточная концентрация сахарозы во всех случаях была ниже 1 г/л.

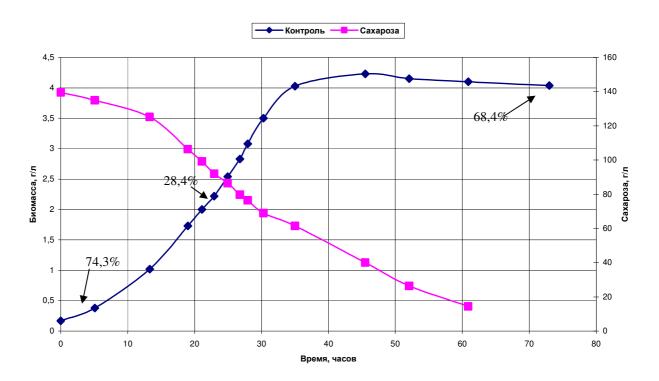


Рис. 47А. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе неадаптированной линии дрожжей (контрольный вариант) штамма SL-100 и освещении среды.

Посевной материал готовился в аэробных условиях.

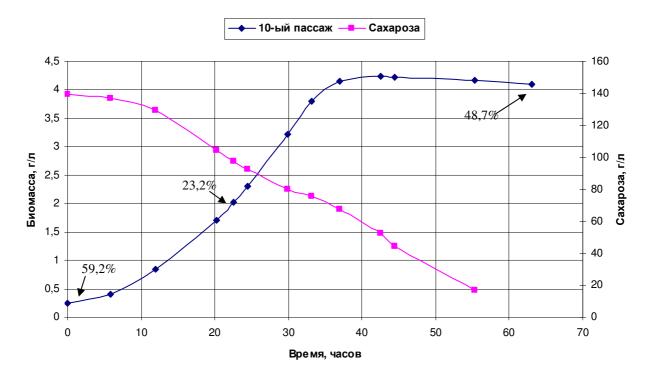


Рис. 47В. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе адаптированной к пероксиду линии дрожжей 10-го пассажа штамма SL-100 и освещении среды.

Посевной материал готовился в аэробных условиях.

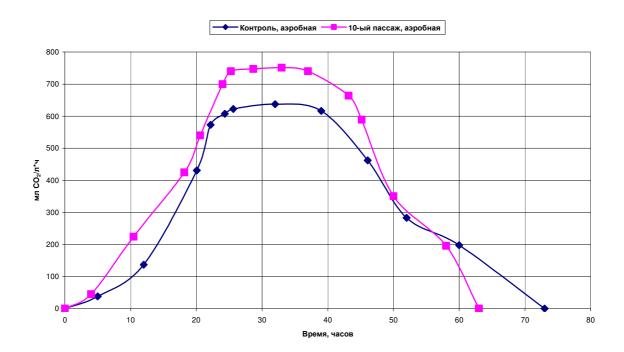


Рис. 47С. Сопоставление изменения бродильной активности неадаптированной и адаптированной линий дрожжей штамма SL-100 при культивировании в анаэробных условиях при освещении среды и подготовке посевного материала в аэробных условиях.

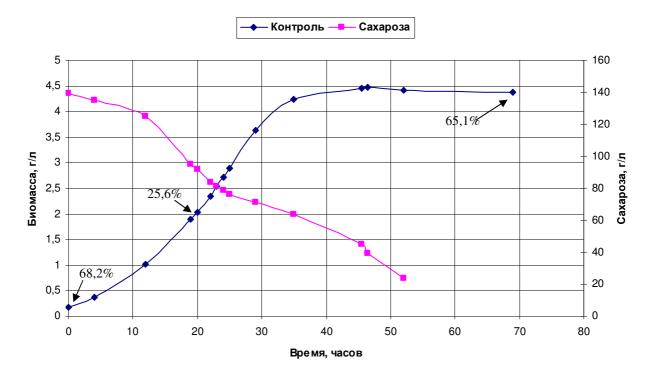


Рис. 48А. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе неадаптированной линии дрожжей (контрольный вариант) штамма SL-100 и освещении среды.

Посевной материал готовился в микроаэрофильных условиях.

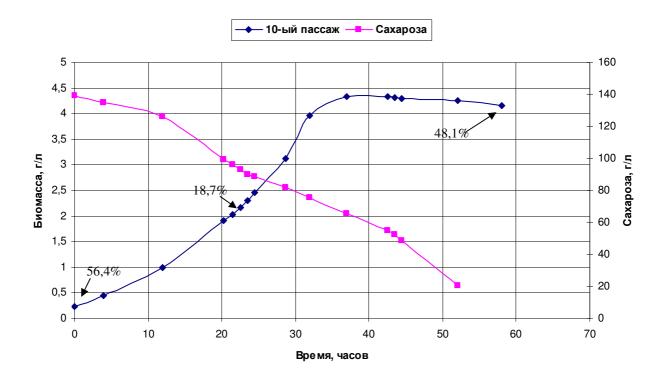


Рис. 48В. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе адаптированной к пероксиду линии дрожжей 10-го пассажа штамма SL-100 и освещении среды.

Посевной материал готовился в микроаэрофильных условиях.

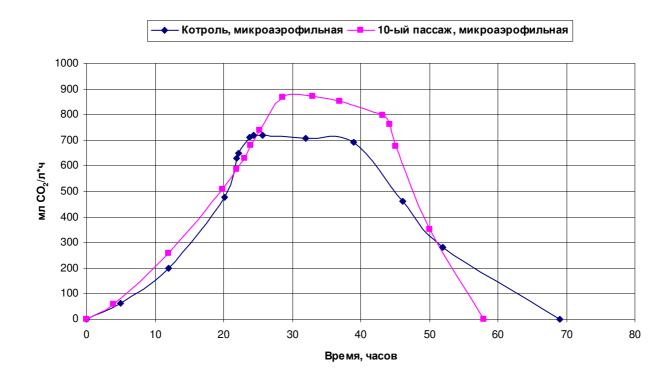


Рис. 48С. Сопоставление изменения бродильной активности неадаптированной и адаптированной линий дрожжей штамма SL-100 при культивировании в анаэробных условиях при освещении среды и подготовке посевного материала в микроаэрофильных условиях.

В то же время при использовании линии дрожжей, которую пытались адаптировать к H_2O_2 путем пересевов в анаэробных условиях культивирования, показатели роста и брожения резко ухудшались (рис. 49). Доля мертвых клеток была высокая и превышала уровень в контроле на протяжении всех фаз культивирования. Лаг-фаза в контроле составила 7,5 ч, а при использовании "адаптированной" линии 10-го пассажа – 9 ч. Несмотря на то, что во втором случае уровень накопления биомассы был существенно выше, бродильная активность штамма, обработанного пероксидом водорода, была ниже. Выход спирта в контроле составил 3,7%, а при использовании "адаптированной" линии – всего 1,9%. Во всех случаях в среде к концу брожения остаточное содержание сахарозы было высоким.

Полученные результаты подтверждают факт отсутствия адаптации дрожжей штамма SL-100 к пероксиду в анаэробных условиях (рис. 31).

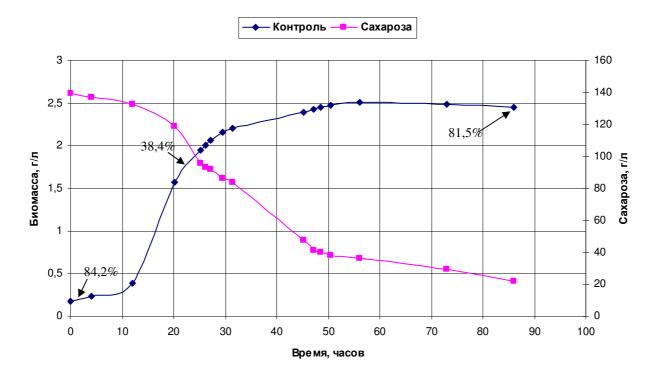


Рис. 49А. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе неадаптированной линии дрожжей (контрольный вариант) штамма SL-100 и освещении среды.

Посевной материал готовился в анаэробных условиях.

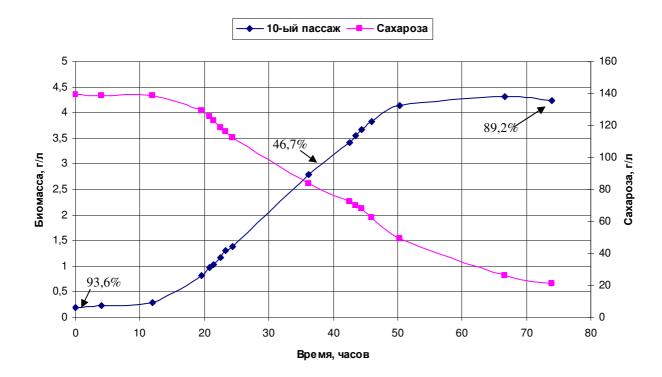


Рис. 49В. Динамика накопления биомассы и убыли субстрата при анаэробном культивировании в биореакторе адаптированной к пероксиду линии дрожжей 10-го пассажа штамма SL-100 и освещении среды.

Посевной материал готовился в анаэробных условиях.

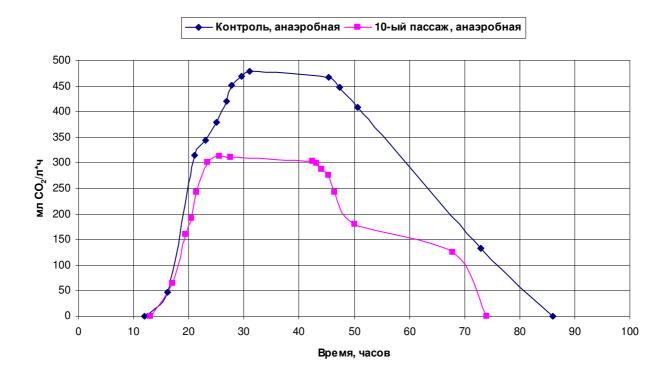


Рис. 49С. Сопоставление изменения бродильной активности неадаптированной и адаптированной линий дрожжей штамма SL-100 при культивировании в анаэробных условиях при освещении среды и подготовке посевного материала в анаэробных условиях.

Таким образом, результаты экспериментов убедительно свидетельствуют о возможности существенного улучшения показателей роста дрожжей и процесса спиртового брожения, используя совместное воздействие на дрожжи оптимальными дозами стресс-факторов (пероксидом водорода или мягким ультрафиолетом) и антистресс-факторами, в качестве которого, в частности, может выступать видимый свет.

3.2.3. Разработка рекомендаций по использованию процесса культивирования с внесением пероксида водорода в промышленных условиях

Проведенные исследования позволяют предложить новый способ ведения процесса спиртового брожения.

По предлагаемому способу для поддержания высокой физиологической активности дрожжей-сахаромицетов подготовку посевного материала целесо-

образно проводить в аэробных или микроаэрофильных условиях при совместном воздействии H_2O_2 или мягкого ультрафиолета диапазона УФА/УФБ. Такую стресс-индуцированную линию дрожжей необходимо вести постоянно, т.е. путем периодических пересевов на среду с содержанием сбраживаемых углеводов 30 г/л и более, периодическим внесением H_2O_2 дозах 0.3-0.6 г/л при содержании дрожжевых клеток в ферментационной среде не менее 1-2 л в условиях освещения дрожжевых клеток и среды культивирования видимым светом при уровне освещенности порядка 40 мВт/л).

Последующий ферментационный процесс также необходимо вести в условиях освещения видимым светом той же интенсивности, но без внесения пероксида водорода.

Оценки показывают, что обработка дрожжей и ведение ферментационного процесса по предложенному способу позволит поддерживать высокую физиологическую активность клеток дрожжей, повысить производительность стадии брожения – сократить время брожения в периодических условиях на 30 %.

Результаты исследований вошли в план перспективного развития ФГУП "Биотехнологический завод" (пос. Серебряные Пруды, Моск. обл.).

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГАЛО-БАКТЕРИЙ

Как уже отмечалось в обзоре литературы, одним из наиболее интересных и практически важных объектов исследования являются экстремальные фототрофные галофильные бактерии р. *Halobacterium*. Галобактерии обладают уникальной системой фоторецепции, одним из компонентов которой является белок – бактериородопсин, который в настоящее время находит все большее практическое применение. Экологическая среда обитания галобактерий – сильно минерализованные озера и лиманы в аридных зонах, зачастую недостаток кислорода, интенсивное освещение, воздействие УФ-излучения Солнца на поверхности сред, поэтому не удивительно, что галобактерии выработали разнообразные механизмы ответа на внешние воздействия. Значимыми механизмами, управляющими жизнедеятельностью, метаболизмом и синтезом компонентов галобактерий, могут быть системы ответа на различные стрессы (системы репарации, каротиногенез и др.).

Таким образом, галобактерии являются интересным и практически важным объектом, исследования которого могут послужить основой для отработки различных, более совершенных по сравнению с существующими способов культивирования, используя такие факторы управления процессом, как состав питательной среды, свет, концентрация растворенного кислорода, стрессовые воздействия.

4.1. Выбор исходных и получение мутантных штаммов

Особенностью галобактерий является повышенная вариабельность их генотипа, фенотипически проявляющаяся в изменении окраски колоний отдельных клонов при высеве на твердых питательных средах (типично около 10% общего числа колоний). Такую необычно высокую вариабельность связывают с тем, что галобактерии, обитая в экстремальных условиях, за долгое время эволюции выработали разнообразные механизмы и чувствительные системы регуляции, позволяющие им успешно адаптироваться к изменениям во внешней среде [126].

В лабораторных условиях при высеве на чашки Петри наблюдаются колонии галобактерий, окрашенные в оранжевый, оранжево-желтый, варианты от розово-сиреневого до сиреневого (пурпурного) цвета, белесые.

Бактерии, колонии которых окрашены с сиреневый или пурпурный цвета, способны к наибольшему накоплению бактериородопсина. Клоны, не накапливающие БР, окрашены в оранжевый цвет, обусловленный накоплением преимущественно каротиноидов, или белесые.

В исследованиях, проведенных в данной работе, в качестве исходных использовались штаммы галобактерий *Halobacterium salinarium* 353П (клетки окрашены в оранжевый цвет), ST-033 (клетки окрашены в сиреневый цвет). Исходные штаммы были предоставлены Д.А. Складневым (ГНЦ ГосНИИ генетики и селекции микроорганизмов, г. Москва).

В предварительных экспериментах с предоставленными штаммами, проведенных в качалочных колбах на стандартной питательной среде и при высеве на агаризованную питательную среду, наблюдали неудовлетворительную воспроизводимость и нестабильность результатов, зачастую при отсутствии значимого роста галобактерий, большую вариабильность в морфологии и цвете колоний при высеве на чашки Петри и в цвете суспензии галобактериальных клеток при выращивании в колбах. Так, при пересеве штамма ST-033 на среде с агаром (при освещении) появлялись оранжевые колонии (около 10% и более от общего числа колоний), встречались и белые колонии.

В этой связи было решено провести серию экспериментов по получению мутантных штаммов из исходных с оценкой их устойчивости к морфологическому расщеплению, способности росту и накоплению БР на стандартной питательной среде.

Для получения мутантов был использован широко используемый стандартный метод индуцированного мутагенеза с облучением суспензии клеток жестким ультрафиолетом (λ =254 нм) и его модифицированный вариант. Стандартная процедура, использованная первоначально, проводилась следующим образом. Клетки галобактерий с предстационарной стадии роста концентрировали в 5 раз и ресуспендировали в 2 мл минеральной основы. Полученную суспензию с концентрацией ГБ около 15 г/л переносили в открытую чашку Петри и облучали с расстояния 15 см от источника, после чего высевали на агаризованную среду.

Облучение наиболее продуктивного по бактериородопсину сиреневого штамма ST-033 жестким УФ по стандартной методике приводило к полной гибели всех клеток уже после 5 секунд обработки: при последующем переносе облученной суспензии на агаризованную среду или в качалочные колбы прироста бактерий не наблюдалось. При меньшем же времени облучения клетки хотя и сохраняли жизнеспособность, но окраска колоний первоначально получаемых сиреневых мутантов была нестабильна: при последующем пересеве на агаризованную питательную среду появлялись колонии разного цвета. Интересно, что расщепление у мутантов штамма ST-033 на сиреневые, оранжевые и белые колонии было более выражено при выращивании на свету, как и у исходного штамма. При выращивании в темноте сиреневые клоны практически не расщеплялись, расщепление оранжевых и белесых клонов мало зависело от освещения. Исходя из этих наблюдений, можно предположить, что свет индуцирует расщепление у штаммов, содержащих БР.

При облучении мягким УФ штамма ST-033 наблюдалось лишь небольшое возрастание изменчивости в цвете колоний по сравнению с исходным штаммом. Облучение оранжевого штамма 353П не приводило к сколько-нибудь выраженным изменениям в изменчивости.

Нестабильность морфо-физиологических признаков может быть обусловлена как свойствами используемых штаммов, так и вариациями условий внешней среды, например, уровня освещенности (что наблюдалась в вышеописанных экспериментах), обеспеченности субстратом, состава компонентов питания, наличием ингибиторов и стимуляторов различных путей метаболизма и т.д. Учитывая эти факторы, было решено модифицировать методику облучения и отбора мутантных клонов, моделируя природные условия обитания галобактерий, в которых большую роль может играть гетерогенность среды, наличие микроагрегатов, градиентов концентраций субстратов и продуктов метаболизма, уровня освещенности, концентрации кислорода. В качестве такого фактора, обеспечивающего микрогетерогенность условий, было решено использовать гранулированный активированный уголь. Уголь, добавлялся в жидкую питательную среду (в марлевом мешочке в количестве 20-30 г/л) при выращивании клеток ГБ, в последующем подвергаемых облучению жестким УФ, и в твердую агаризованную среду (гранулы угля АГ-3 добавлялись в количестве 15-20 г/л) при ее приготовлении.

Эксперименты проводили со штаммом ST-033. Добавление угля в жидкую питательную среду с выращиваемым штаммом на предстационарной стадии роста приводило к исчезновению желтого оттенка ее окраски и возрастанию насыщенности сиреневым цветом, обусловленным цветом выращиваемых клеток бактерий. Через 6–8 ч после внесения угля в колбу 2 мл суспензии вносилось на чашку Петри, где находилась агаризованная среда с распределенными в ней гранулами угля, суспензия распределялась шпателем по поверхности агара. После этого поверхность агара облучалась жестким УФ.

При приготовлении суспензии и облучении клеток по такому модифицированному варианту с использованием угля клетки выживали и после 3–5 мин. облучения. При этом непосредственно над гранулами угля преимущественно встречались оранжевые колонии, рядом с гранулами доминировали сиреневые клоны, вдали от гранул – белые. Высев клонов, образующих сиреневые колонии, на чашки Петри показал, что в большинстве своем, они не расщеплялись на субклоны с разной цветовой окраской. С другой стороны, если на чашки Петри высевалась суспензия, полученная в колбах без внесения угля, то наблюдалась изменчивость в цвете колоний на чашках. Полученные результаты свидетельствуют, что в индукции цветового расщепления колоний могут участвовать некие компоненты исходной питательной среды или продукты метаболизма, которые поглощаются углем.

По результатам опытов с облучением клеток по модифицированной методике на среде с углем было отобрано несколько клонов (штаммов) различного цвета с колоний наибольшего размера.

Способность отобранных клонов к росту и накоплению БР были протестированы на среде с триптоном Serva (5 г/л) дрожжевым экстрактом Organotechnie (2 г/л) и глицерином (4 мл/л) в качалочных колбах (табл. 4).

Все оранжевые клоны имели сходные ростовые характеристики, накапливали больше биомассы по сравнению с клонами, окрашенными в другие цвета, но вырабатывали мало БР.

По результатам тестирования в качестве наиболее перспективного был отобран штамм UM-17, колонии которого при росте на агаризованной среде окрашены в пурпурный цвет, показавший наибольшую способность к синтезу БР в качалочных колбах при приемлемых ростовых характеристиках.

Таблица 4. Ростовые и биосинтетические показатели некоторых из полученных штаммов в сравнении со штаммом ST-033

| Мутант, | Удельная ско- | Цвет суспензии | Выход биомассы | Выход БР |
|---------|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| штамм | рость роста в экс- | на 7-ые сутки | (7 сут. культиви- | (7 сут. культиви- |
| | поненциальной | культивирования | рования), г/л | рования), |
| | фазе, ч ⁻¹ | | | мг/л |
| ST-033 | 0,054-0,056 | Розово- | 3-3,3 | 40-45 |
| | | сиреневый | | |
| UM-7 | 0,056 | Розово- | 3,38 | 45–50 |
| | | сиреневый | | |
| UM-17 | 0,054-0,056 | Пурпурный | 3-3,3 | 70–75 |
| UM-21 | 0,056 | Розово- | 3,4 | 20–25 |
| | | сиреневый | | |
| UM-23 | 0,057 | Розово- | 3,75 | 40–45 |
| | | сиреневый | | |
| UM-44 | 0,055 | Розово- | 3,4 | 50–55 |
| | | сиреневый | | |
| UM-53 | 0,064 | Оранжевый | 5,8 | 5–10 |
| UM-79 | 0,042 | Белый | 2,5 | _ |
| UM-92 | 0,056 | Розово- | 2,96 | 40–45 |
| | | сиреневый | | |
| UM-93 | 0,062 | Оранжево- | 4,4 | 5–10 |
| | | желтый | | |
| UM-111 | 0,055 | Розово- | 3,7 | 55–60 |
| | | сиреневый | | |

Сравнительная динамика накопления биомассы исходными и отобранными штаммами галобактерий в периодических условиях представлена на рис. 50.

В стандартных условиях культивирования в колбах на качалке штамм UM-17 накапливает бактериородопсина 70–75 мг/л, что в 1,6–1,8 раз больше, чем исходный штамм ST-033, и не расщепляется на разноокрашенные клоны при пересеве.

Оранжевые клоны, как и 353П, отличаются более высокой скоростью роста и уровнем накопления биомассы, однако накапливают к концу ферментации не

более 5–10 мг/л БР. Белые клоны хуже растут, чем окрашенные и практически не накапливают БР и каротиноиды.

Стабильность свойств выделенного штамма UM-17 в отношении синтеза БР при пересевах и последующем росте была проверена в асептических и неасептических условиях на свету и в темноте. Всего было проведено 10 пассажей, и результаты экспериментов показали, что штамм не только сохраняет свои ростовые и биосинтетические характеристики при пересевах на свету, но и увеличивает свою биосинтетическую активность на свету (рис. 51): накопление биомассы к 10-му пассажу выросло примерно на 15%, хотя удельное содержание БР в биомассе изменилось мало.

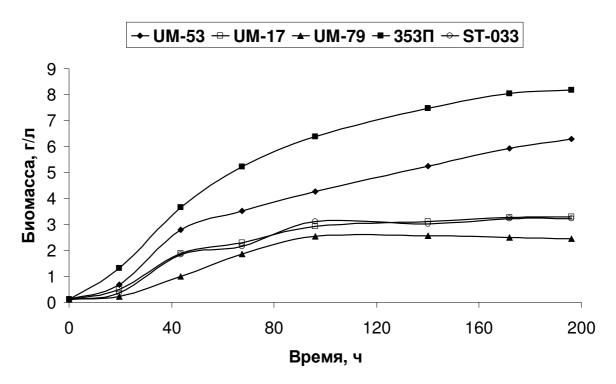


Рис. 50. Сравнительная динамика накопления биомассы исходными и полученными штаммами галобактерий в периодических условиях.

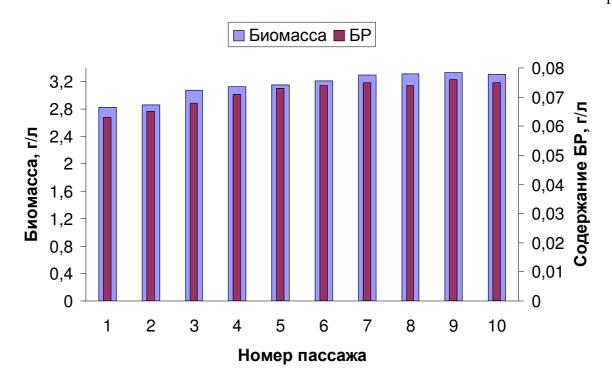


Рис. 51. Изменение биосинтетической активности штамма UM-17 при пересевах на свету в стерильных условиях.

При пересеве в темноте при большем, чем на свету, накоплении биомассы (см. рис. 61) удельное содержание БР к 10-му пассажу снижалось более чем в 2 раза. В неасептических условиях результаты были нестабильны и при высеве клеток на агаризованную среду появлялись оранжевые колонии.

Пересевы и выращивание штамма UM-17 в последующем, если это не оговорено особо, проводились в стерильных условиях с инокулятом 5-10 пассажей.

Таким образом, в ходе первого этапа исследований с галобактериями был выделен штамм UM-17, обладающий способностью накапливать повышенные количества бактериородопсина и стабильный при пересевах в асептических условиях.

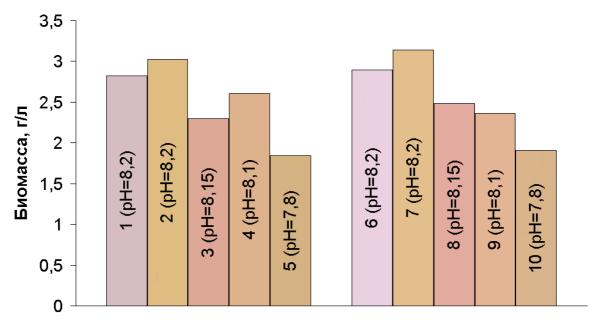
4.2. Выявление основных факторов, определяющих активность культуры галобактерий в отношении синтеза бактериородопсина

Как уже отмечалось в обзоре литературы, рост галобактерий сильно зависит от условий инкубационной среды – ее состава, физических параметров, освещения, интенсивности аэрирования. Считается, что наиболее благоприятные условия для синтеза бактериородопсина – рост при освещении в микроаэрофильных условиях при лимитировании кислородом [101, 144, 170].

Как следует из данных, представленных в предыдущем подразделе работы, использованная методика мутагенеза позволила получить мутанты исходного штамма ST-033, стабильные и перспективные в отношении синтеза бактериородопсина. С наиболее перспективным штаммом UM-17 была проведена серия экспериментов, в которой выявлялись основные факторы, определяющие активность культуры галобактерий в отношении синтеза бактериородопсина. При этом при планировании экспериментов принималось во внимание, что определенную роль в регулировании метаболизма галобактерий и синтеза их внутриклеточных компонентов могут выполнять процессы, протекающие при стрессовых воздействиях на клетки галобактерий, в частности, при окислительном стрессе.

4.2.1. Подбор питательной среды

На рост бактерий сильно влияет качество и состав основного органического компонента питательной среды – гидролизата казеина, пептона или триптона [149, 152, 153, 155]. Применяемый в биологической промышленности ферментативный сухой пептон является продуктом ферментативного гидролиза белков. При приготовлении пептона глубина и степень гидролиза трудно регулируема, поэтому в различных марках пептона, применяемого для бактериологических целей, соотношения продуктов с высокой и низкой степенью расщепления белка непостоянны. Поэтому прежде всего было важно проверить способность к росту штамма UM-17 и накопление им БР на средах с различными марками триптонов, пептонов, дрожжевых экстрактов при варьировании концентрации их в питательной среде. Опыты проводились в качалочных колбах.



Группы, отличающиеся дрожжевыми экстрактами

Рис. 52. Рост штамма UM-17 на различных пептонах и дрожжевых экстрактах.

1-4-5 г/л триптона (пептона) 1-4 и 2 г/л YE1; 6-9-5 г/л триптона (пептона) 1-4 и 2 г/л YE2; 5-5,5 г/л только YE1; 10-5,5 г/л только YE2.

Интенсивность освещения 70 мВт/л; Vсреды=50 мл; Vинокулята=2 мл; культивирование в течение 5 суток без подпиток и регулирования рН, в столбцах указано конечное значение рН. Цвета столбцов соответствуют цветам получаемых суспензий.

В качестве источников органического углерода было испытано 4 триптона и пептона и 2 дрожжевых экстракта различных фирм, а именно:

Триптон 1 – триптон (гидролизат казеина, получаемый обработкой трипсином) фирмы «Serva».

Триптон 2 – триптон фирмы «Hispanlab» (Испания).

Пептон 3 – пептон Difco.

Пептон 4 – пептон «Hispanlab».

Дрожжевой экстракт 1 (YE1) – фирма «Hispanlab».

Дрожжевой экстракт 2 (YE2) – фирма «Organotechnie».

Результаты исследований с некоторыми из композиций питательных сред представлены на рис. 52.

Из рис. 52 видно, что марка дрожжевого экстракта не влияет на рост галобактерий, так как при использовании разных экстрактов наблюдается практиче-

ски одинаковый рост бактерий и цвет получаемой суспензии. Существенных отличий не наблюдалось и при использовании дрожжевых экстрактов других фирм-производителей.

Наибольшая оптическая плотность достигается при росте на триптоне 2, однако наибольшее содержание БР наблюдается для триптона 1. Следом за ним по интенсивности сиреневого оттенка следуют пептоны 3 и 4. Среда на триптоне 2, а также чистом дрожжевом экстракте (YE) имеет конечные оттенки ржаво-желтого цвета, что говорит о малом выходе бактериородопсина. Накопление биомассы на триптоне 1 значительно превышает накопление на пептонах 3, 4.

Варианты 1, 6 (сиреневые) содержат наибольшее среди остальных вариантов количество БР. Остальные варианты содержат много каротиноидов, придающих суспензии клеток оттенки от желтого до бурого, что маскирует цвет БР.

На среде с добавлением глицерина наблюдались аналогичные закономерности. Наилучший рост и необходимый сиреневый цвет наблюдались при использовании в качестве источника углерода смеси триптона или пептона в концентрации 5 г/л, дрожжевого экстракта в концентрации 2 г/л и глицерина в количестве 4 мл/л.

На рис. 53 представлена динамика накопления биомассы и синтеза бактериородопсина штаммом UM-17 на некоторых из тестированных композиций сред с добавлением глицерина.

При использовании в качестве источника углерода только дрожжевого экстракта и глицерина (рис.53, вариант A) максимальный выход БР составил 11 мг/л, конечный уровень биомассы около 2 г/л, удельная скорость роста $0.041 \, \text{ч}^{-1}$. Эти показатели культивирования мало зависели от марки экстракта с (YE Hispanlab, Organotechnie).

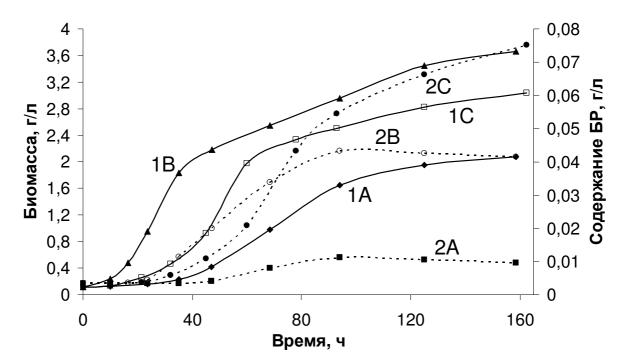


Рис. 53. Сравнительная характеристика роста биомассы и накопления БР штаммом UM-17 на средах с различным составом органических компонентов и добавлением глицерина.

A-5,5 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина; B-5 г/л триптона Hispanlab, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина; C-5 г/л триптона Serva, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина. 1- накопление биомассы, 2- накопление бактериородопсина.

Рост ГБ и синтез БР на среде с глицерином также сильно зависел от марки используемого триптона или пептона. Наилучшим оказался триптон фирмы Serva (рис. 53, вариант C). Триптон Hispanlab и пептон Difco показали сходные результаты (рис. 53, вариант B). На триптоне Serva с дрожжевым экстрактом и глицерином конечный уровень биомассы составил 3 г/л, удельная скорость роста в экспоненциальной стадии $-0.054~\rm q^{-1}$, максимальное накопление БР $-75~\rm Mг/л$. На триптоне Hispanlab с дрожжевым экстрактом и глицерином конечный уровень биомассы $-3.7~\rm r/n$, удельная скорость роста $-0.1~\rm q^{-1}$, максимальное накопление БР $-43-44~\rm Mr/л$. Аналогичная картина наблюдалась при культивировании штамма ST-033 на тех же питательных средах, однако накопление им бактериородопсина составило лишь 55-60% от уровня штамма UM-17.

Как видно из динамики роста биомассы (рис. 53), после достижения уровня накопления биомассы 1,9–2,1 г/л наступает стадия ее линейного роста, что

обусловлено дефицитом в обеспечении среды кислородом в условиях качалочных колб, однако такое лимитирование кислородом благоприятно для синтеза БР. В дальнейшем, в стационарной фазе роста микроорганизмов, наблюдается падение содержания БР (рис. 53, варианты A, B).



Рис. 54. Изменения в спектрах лизатов по ходу культивирования штамма UM-17.

1-4 – среда содержит триптон Serva, 5 – среда содержит триптон Hispanlab. Время культивирования: 1-45 ч; 2-93 ч; 3-162 ч; 4-210 ч, 5-158 ч.

Качественные изменения в состоянии культуры хорошо прослеживаются по спектрам лизатов. На рис. 54 приведены спектры лизатов галобактерий по ходу выращивания на триптоне Serva (5 г/л), дрожжевом экстракте Organotechnie (2 г/л) и глицерине (4 мл/л) в сравнении со спектром лизата, полученного при выращивании на среде с триптоном Hispanlab. После 96–100 ч культивирования в спектрах наряду с пиком БР (568 нм) начинают проявляться пики каротиноидов (λ =480–550 нм). Они тем ярче выражены, чем дольше проводится культивирование. Штамм UM-17 на 162 ч накапливает до 75 мг/л БР, а на 210 ч его содержание снижается до 50–55 мг/л. При использовании триптона Нispanlab ярко выраженные пики каротиноидов проявляются уже на 158 ч культивирования. Содержание БР к этому времени составляет 44 мг/л, а на 210

ч падает до 38 мг/л. При использовании среды с дрожжевым экстрактом, но без триптона или пептона, пики каротиноидов проявляются еще раньше.

В целом данные, представленные на рис. 50–54 указывают на отсутствие прямой зависимости между накоплением биомассы в ходе культивирования и синтезом бактериородопсина, скорее напротив, при высоком уровне накопления биомассы синтез бактериородопсина репрессируется и синтезируются каротиноиды, пики которых начинают проявляться уже на ранних стадиях роста.

По результатам экспериментов с подбором питательной среды для дальнейших опытов в качестве основной была выбрана среда состава, г/л: NaCl - 250, MgSO₄x7H₂O - 20, KCl - 2, цитрат Na - 3, триптон фирмы Serva или Hispanlab -5 г/л, дрожжевой экстракт Organotechnie - 2, глицерин, мл/л - 4.

4.2.2. Рост и накопление БР в условиях культивирования с подпиткой

С целью определения возможности повышения конечного содержания биомассы и БР в среде и выхода их за цикл ферментации были проведены эксперименты с подпиткой среды органическим субстратом по ходу культивирования. Эксперименты проводились с исходными штаммами 353П, ST-033, и полученными сиреневым UM-17, оранжевым UM-53, белым UM-79 (см. табл. 4), выращиваемыми в качалочных колбах. Подпитки, добавляемые по ходу ферментации, представляли собой стерильные высококонцентрированные растворы вносимых компонентов. Результаты опытов представлены на рис. 55–56.

Как показали результаты этих ферментаций, исходный штамм 353П и оранжевый штамм UM-53 способны накапливать относительно высокий уровень биомассы (10-14 г/л по сухой биомассе) в условиях подпитки органическим субстратом (рис. 55, 56) с экономическими коэффициентами выхода биомассы 0,58 г АСБ/г и 0,43 г АСБ/г комплексного органического субстрата соответственно. Однако при этом наблюдается низкое содержание БР в среде, не более 5–8 мг/л.

Штамм ST-033 показал иное поведение (рис. 50, 55, 56). Фаза активного роста его наступает на 2-е сутки. Без подпитки культура достигает стационарной фазы роста через примерно 5 суток при содержании биомассы около 3,2 г/л с экономическим коэффициентом выхода биомассы 0,27 г АСБ/г органического субстрата. 1-я подпитка приводит к дальнейшему росту (рис. 55), 2-я подпитка значимого влияния на рост биомассы не оказывает (рис. 56) – рост культуры прекращался, цвет суспензии при подпитках стремится к ржаво-желтому.

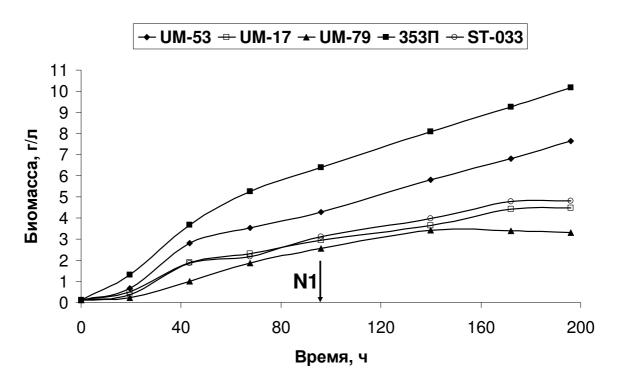


Рис. 55. Сравнительная характеристика роста разных штаммов с однократной подпиткой.

N1 – добавление 5 г/л триптона Serva + 2 г/л дрожжевого экстракта.

Необходимо отметить, что в этих экспериментах рН по ходу ферментации изменялся в пределах 6,8–7,1, что характерно для сред, содержащих глицерин (изменение рН на средах без глицерина отображено на рис. 52), т.е. закисление или подщелачивание среды не могло быть причиной торможения и остановки роста после внесения подпиток.

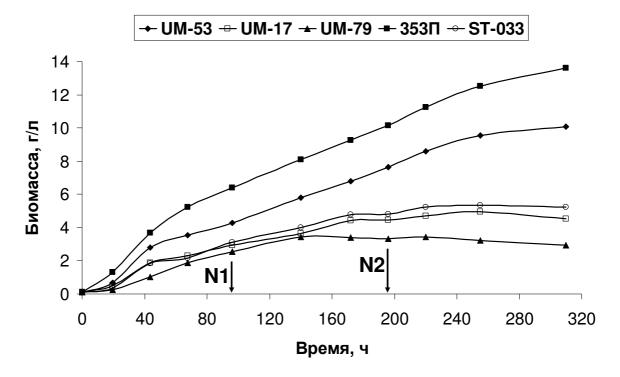


Рис. 56. Сравнительная характеристика роста биомассы разных штаммов с двукратной подпиткой.

N1: добавление 5 г/л триптона Serva + 2 г/л дрожжевого экстракта, N2 добавление 2,5 г/л триптона Serva + 1 г/л дрожжевого экстракта + 2 мл/л глицерина.

Штамм UM-17 имеет схожие со штаммом ST-033 характеристики роста, накапливая биомассу до уровня 4,7-4,9 г/л (рис. 55, 56) с экономическим коэффициентом выхода биомассы (после 1-ой подпитки по достижении предела роста) 0,25 г АСБ/г комплексного органического субстрата. Накопление биомассы белым штаммом UM-79 было наименьшее (Y = 0,18 г АСБ/г субстрата).

Таким образом, клоны или штаммы галобактерий, окрашенные в оранжевый цвет и в сиреневый цвет, существенно различаются по физиологическим характеристикам. Оранжевые штаммы способны накапливать биомассу при подпитке в 2–2,5 раз больше, чем сиреневые, однако они мало накапливают бактериородопсина. Учитывая, что оранжевый цвет штаммов обусловлен повышенным содержанием каротиноидов, можно заключить, что штаммы, накапливающие повышенное количество каротиноидов, накапливают много биомассы, но мало бактериородопсина и наоборот, накапливающие мало каротиноидов, накапливают меньше биомассы, но синтезируют повышенные количества БР.

Наиболее перспективный штамм UM-17 показал способность к увеличению уровня накопления биомассы примерно в 2 раза при подпитке органическим субстратом по сравнению с вариантом без подпитки. В качестве подпитки наиболее целесообразно использовать триптон (гидролизат казеина) фирмы «Serva». Однако измерения содержания бактериородопсина в биомассе показало, что подпитка приводит к уменьшению его выхода. Штамм UM-17 до подпитки нарабатывает около 70-75 мг/л БР, после подпиток концентрация БР падает до 35–40 мг/л. Штамм ST-033 до подпитки нарабатывает около 45 мг/л БР, после подпитки его содержание падает до 20–25 мг/л. Наиболее вероятно, причиной падения содержания БР является внесение дополнительного количества компонентов среды или образование каких-то продуктов метаболизма или побочных реакций, стимулирующих распад БР и переключение метаболизма на синтез каротиноидов.

Можно предположить два варианта такого влияния накапливающихся продуктов:

- 1. Учитывая различия в поведении по-разному окрашенных клонов, экологические условия среды обитания галобактерий, а также физиологобиохимическую свойства роль каротиноидов как веществантиоксидантов, вещества-индукторы, имеющиеся или накапливающиеся в среде культивирования галобактерий и переключающие метаболизм ГБ на синтез каротиноидов, могут быть, в частности, продуктами перекисного окисления компонентов питательной среды. Эти продукты стимулируют синтез каротиноидов, выполняющих защитные функции в отношении роста и накопления биомассы. При этом каротиногенез у сиреневых клонов в определенной степени заблокирован, поэтому такие клоны более чувствительны к перекисным соединениям и накапливают меньше биомассы в процессе культивирования.
- 2. В процессе культивирования накапливаются продукты метаболизма ГБ ингибиторы роста ГБ и биосинтеза БР. Клоны, вырабатывающие преимущественно каротиноиды, накапливают гораздо меньше ингибиторов роста ГБ и больше ингибиторов синтеза БР, по сравнению с клонами, накапливающими БР. Однако, с этим, вторым предположением плохо согласуется факт уменьшения содержания БР в биомассе сиреневых клонов после подпитки ферментационной среды органическим субстратом.

4.2.3. Влияние интенсивности аэрации и уровня освещения

Как указывалось в обзоре литературы, значимыми факторами, стимулирующими образование пурпурных мембран и накопление бактериородопсина галобактериями, являются пониженное содержание кислорода в среде культивирования и освещенность среды [101, 144,170]. Поэтому важно было провести сравнительную оценку влияния интенсивности аэрации, содержания кислорода в среде культивирования и уровня освещенности среды на накопление биомассы ГБ и синтез БР исходными и выделенными штаммами.

Предварительные опыты в реакторе со штаммом UM-17 показали, что динамика потребления кислорода культурой вблизи критического уровня неустойчива. В этой области наблюдались резкие изменения уровня растворенного кислорода с минимального (1-2% от уровня насыщения) до максимального (80-90% от уровня насыщения) и наоборот уже при небольшом изменении в количестве подаваемого в среду воздуха или в скорости оборотов мешалки. Полученные данные свидетельствовали о том, что при удельной вводимой мощности падающего света на единицу объема 15-20 мВт/л на длине волны 555 нм, существенного понижения скорости прироста биомассы не наблюдалось при уменьшении среднего уровня содержания растворенного кислорода вплоть до 7%. Однако при более высоких уровнях растворенного кислорода (20-25% и 80-90%) при увеличении выхода биомассы удельное содержание БР уменьшалось, а пики каротиноидов в спектрах лизатов становились все более выраженными. Такие данные согласуются с режимами аэрации, рекомендованными в литературе [171], согласно которым концентрация растворенного кислорода должна поддерживаться около 20%.

Опыты, проведенные со штаммами UM-17 и ST-033 в колбах на качалке, показали, что как и следовало ожидать, с увеличением интенсивности аэрации конечный уровень накопления биомассы возрастает (рис. 57–59), однако наибольшее накопление БР наблюдается при умеренной аэрации.

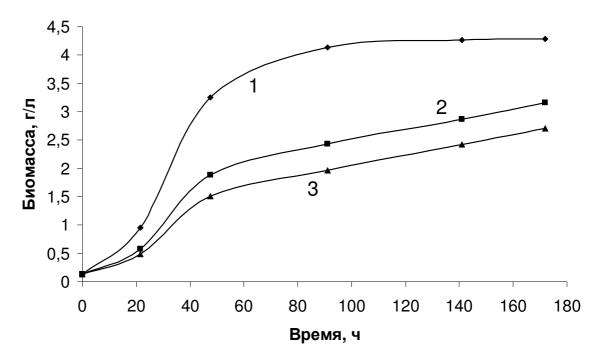


Рис. 57. Рост штамма UM-17 при разной интенсивности аэрации (интенсивность освещения 70 мВт/л, $N_{\text{об. меш.}}$ =150 об./мин.).

1-25 мл среды в колбах, 2-50 мл среды в колбах, 3-75 мл среды в колбах.

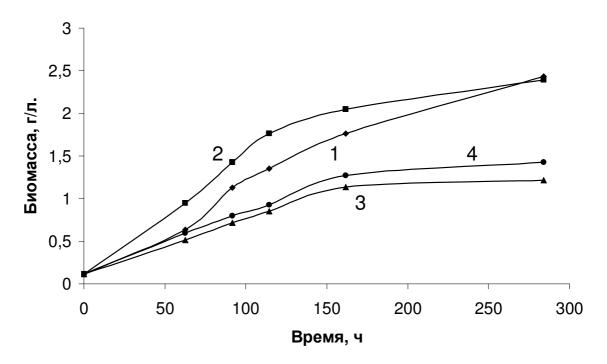


Рис. 58. Рост штамма ST-033 на свету и в темноте при разной интенсивности аэрации (среда без глицерина, интенсивность освещения 70 мВт/л, $N_{\text{об. меш.}}$ =100 об./мин.).

1 — на свету, 35 мл среды в колбах; 2 — в темноте, 35 мл среды в колбах; 3 — на свету, 70 мл среды в колбах; 4 — в темноте, 70 мл среды в колбах.

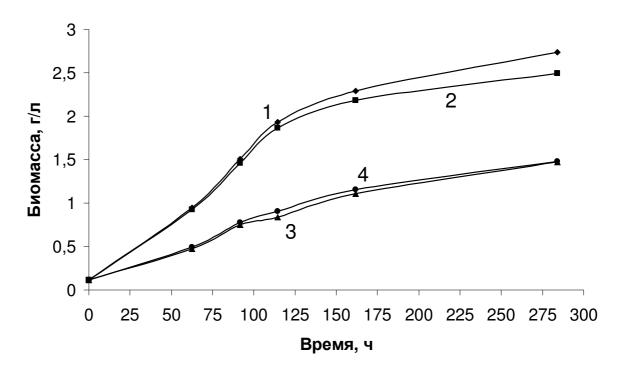


Рис. 59. Рост штамма ST-033 на свету и в темноте при разной интенсивности аэрации (интенсивность освещения 70 мВт/л, $N_{\text{об. меш.}}$ =100 об./мин.).

1 – на свету, 35 мл среды в колбах; 2 – в темноте, 35 мл среды в колбах; 3 – на свету, 70 мл среды в колбах; 4 – в темноте, 70 мл среды в колбах.

При 50 мл среды в колбе накапливалось около 70–75 мг БР на 1 л. При 75 мл – 55–60 мг/л, при 25 мл – не более 45 мг/л, при этом удельное содержание БР в биомассе практически одинаково при 50 и 75 мл среды в колбах и существенно ниже при наибольшей аэрации (25 мл среды в колбах).

Существенным результатом оказалось то, что при снижении интенсивности освещения вплоть до 13-14 мВт/л в опытах на колбах падения удельного содержания БР и накопления биомассы не наблюдалось. Дополнительное экранирование колб с целью дальнейшего снижения освещенности приводило к уменьшению удельного содержания БР.

Несколько неожиданной оказалась разница в накоплении биомассы на свету и в темноте. Вопреки ожиданиям, в ряде экспериментов (рис. 58, 60, 61) накопление биомассы в темноте существенно опережало накопление на свету.

Такие результаты можно объяснить либо ингибированием дыхания светом [124, 145], **либо стимулированием образования ингибиторов роста на свету.** Последнее предположение согласуется с высказанным в разделе 4.2.2. предпо-

ложением об образовании продуктов перекисного окисления компонентов среды, отрицательно влияющими на рост ГБ.

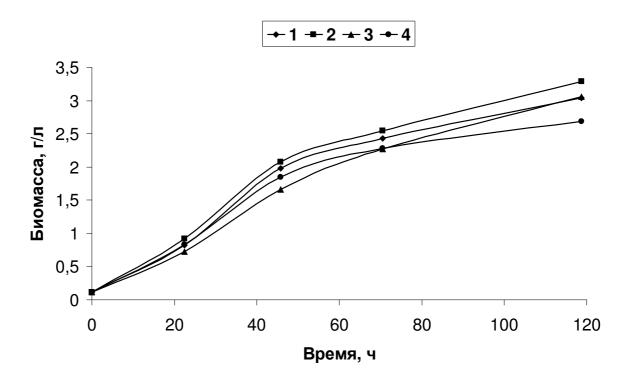


Рис. 60. Рост штамма ST-033 на свету и в темноте при внесении инокулята, выращенного на свету или в темноте (интенсивность освещения 70 мВт/л, $N_{o6.}$ меш. =150 об./мин., 50 мл среды в колбах). Для засева использовался инокулят, полученный после 4-го пассажа выращивания либо на свету, либо в темноте.

1 — подготовка инокулята на свету, рост на свету; 2 — подготовка инокулята на свету, рост в темноте; 3 — подготовка инокулята в темноте, рост на свету; 4 — подготовка инокулята в темноте, рост в темноте.

На свету скорость образования таких продуктов, например в результате процессов фотохимического окисления, может быть выше. В то же время, при выращивании ГБ на свету и использовании инокулята, полученного на свету, выход БР был наибольший, как и следовало ожидать согласно литературным данным [101]. При пересеве штамма UM-17 со света на свет содержание БР составило 73 мг/л, со света в темноту – 62 мг/л БР, с темноты на свет – 36 мг/л, с темноты в темноту – 29 мг/л. Цвет суспензии к концу культивирования при использовании инокулята, полученного в темноте, был более желтый, и спектр лизатов свидетельствовал о более высоком содержании каротиноидов относи-

тельно содержания бактериородопсина. Цвет суспензии при использовании инокулята, полученного на свету, был пурпурный.

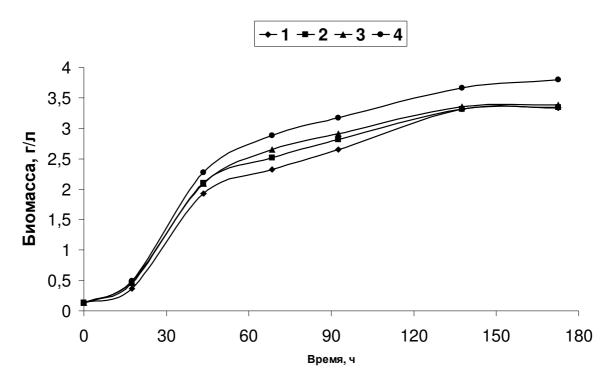


Рис. 61. Рост штамма UM-17 на свету и в темноте при внесении инокулята, выращенного на свету или в темноте (интенсивность освещения 70 мВт/л, $N_{\rm oб.}$ $_{\rm меш.}$ =150 об./мин.). Для засева использовался инокулят, полученный после 9-го пассажа выращивания либо на свету, либо в темноте.

1 – подготовка инокулята на свету, рост на свету; 2 – подготовка инокулята на свету, рост в темноте; 3 – подготовка инокулята в темноте, рост на свету; 4 – подготовка инокулята в темноте, рост в темноте.

Представленные на рис. 58–61 данные согласуются с предположением об ингибировании светом дыхания ГБ и стимулировании накопления БР у активных по синтезу БР штаммов.

Если же исходить из предположения об отрицательном влиянии света на рост биомассы вследствие более интенсивного образования ингибиторов роста ГБ на свету, то тогда следует сделать вывод о меньшем влиянии этих продуктов на синтез БР по сравнению с их влиянием на рост ГБ. В пользу предположения о большем накоплении ингибиторов биосинтеза на свету свидетельствуют и наблюдения о большей частоте образования оранжевых клонов штаммом ST-033 на свету, чем в темноте при высеве его на твердую среду. При пересевах и

выращивании штамма на твердой среде в темноте оранжевых клонов появляется крайне мало. Эти данные согласуются с ранее высказанным предположением о накоплении в среде культивирования веществ, в частности, продуктов перекисного окисления компонентов питательной среды, переключающих метаболизм ГБ на синтез каротиноидов. На свету такие продукты могут накапливаться более интенсивно в результате процессов фотохимического окисления, что приводит к повышению частоты расщепления сиреневых (пурпурных) клонов с образованием оранжевых колоний. В любом случае, независимо от механизмов воздействий света, кислорода и компонентов питательной среды на биосинтез у галобактерий, очевидно необходимо учитывать, что:

- 1) свет может непосредственно стимулировать синтез бактериородопсина;
- 2) свет может индуцировать образование продуктов фотохимического окисления части веществ, содержащихся в питательной среде, и этим опосредованно стимулировать синтез каротиноидов как компонентов антиоксидантных систем и репрессировать синтез бактериородопсина;
- 3) кислород благоприятно влияет на накопление биомассы, а при большом содержании в ферментационной среде, непосредственно репрессирует синтез БР;
- 4) кислород может индуцировать образование продуктов химического окисления части веществ, содержащихся в питательной среде, и этим опосредованно стимулировать синтез каротиноидов как компонентов антиоксидантных систем и репрессировать синтез бактериородопсина.

Совокупный результат сочетанного воздействия света и кислорода может определяться всеми четырьмя отмеченными воздействиями, преобладанием одних изменений над другими.

4.2.4. Состояние и доза посевного материала

Эксперименты показали, что скорость роста и уровень накопления биомассы в определенной степени зависят от состояния посевного материала. Очевидно, кроме роли света (о чем свидетельствуют данные, представленные в предыдущем подразделе), важны доза посевного материала и фаза роста, с которой отбирается инокулят.

Из данных, представленных на рис. 62, 63, следует, что оптимальным является внесение 4% инокулята. При таком засеве накапливается 70–75 мг/л БР, постферментационная среда имеет сиреневый (пурпурный) оттенок. При больших дозах засева насыщенность получаемой суспензии желтым цветом более выражена, выход БР меньше при практически одинаковом накоплении биомассы. Внесение инокулята с отделением клеток от культуральной жидкости или без отделения не влияет существенно на результаты культивирования. Обращает на себя внимание то, что при внесении 2% инокулята в конце культивирования накапливается существенно меньше биомассы, а среда имеет более насыщенный желтоватый оттенок. Этот факт свидетельствует в пользу высказанного в предыдущих разделах предположения о накоплении ингибиторов биосинтеза непосредственно из компонентов питательной среды. При малых дозах засева фаза активного роста продлевается и за большее время культивирования может накопиться существенно больше рост-угнетающих продуктов побочных реакций, в которых могут участвовать компоненты питательной среды.

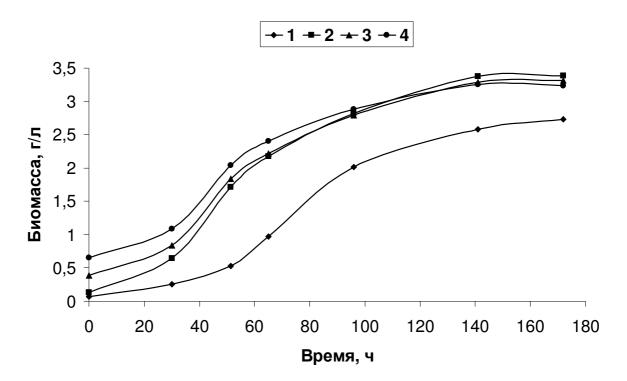


Рис. 62. Сравнительная характеристика роста штамма UM-17 при внесении разного количества инокулята вместе с культуральной жидкостью.

1-2% посевного материала, 2-4%, 3-12%, 4-20%.

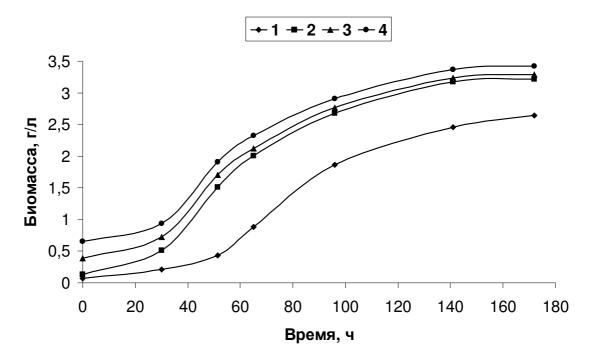


Рис. 63. Сравнительная характеристика роста штамма UM-17 при внесении разного количества инокулята с предварительным отделением клеток от культуральной жидкости центрифугированием.

1-2% посевного материала, 2-4%, 3-12%, 4-20%.

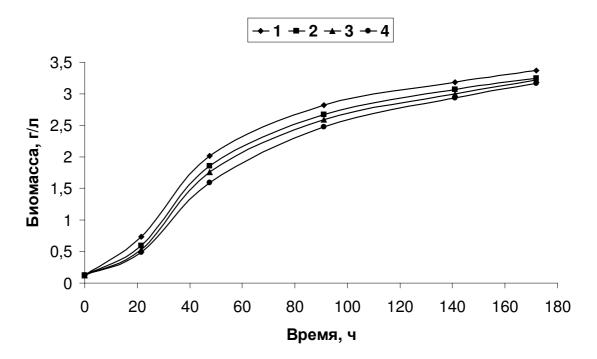


Рис. 64. Сравнительная характеристика роста штамма UM-17 при внесении инокулята с различных фаз роста.

1 — возраст инокулята 40 ч, 2 — 90 ч, 3 — 120 ч, 4 — 170 ч. Во всех вариантах вносилось 4% инокулята.

С увеличением возраста посевного материала наблюдалось лишь незначительное уменьшение скорости и конечного уровня накопления биомассы (рис. 64), при этом достоверные отличия в уровне накопления БР выявлены не были.

4.2.5. Культивирование с добавлением отработанной культуральной жидкости

Как уже отмечалось, с учетом выявленных пределов роста при подпитке субстратом и результатов экспериментов, проведенных при различных условиях культивирования, в среде могут накапливаться ингибиторы роста ГБ и биосинтеза БР. Такие ингибиторы могут быть продуктами либо побочных абиотических реакций, в которые вступают исходные компоненты среды, либо внеклеточными продуктами жизнедеятельности галобактерий.

Известно, что многие микроорганизмы по мере роста, накопления биомассы, потребления субстрата, при изменении условий окружающей среды синтезируют различные метаболиты, являющиеся ингибиторами роста и биосинтеза [172, 173]. Исходя из литературных данных и накопленного практического опыта культивирования микроорганизмов, следовало в первую очередь предполагать, что ингибирование роста ГБ и накопления БР обусловлено образованием внеклеточных метаболитов – продуктов жизнедеятельности галобактерий.

Меру воздействия возможных метаболитов, ингибирующих рост галобактерий и синтез ими бактериородопсина, иллюстрируют результаты опытов с внесением определенной доли отработанной культуральной жидкости (ОКЖ) в исходную среду культивирования (рис. 65–67).

Видно, что для штамма UM-17 существенное торможение роста наблюдается, лишь когда содержание ОКЖ в исходной питательной среде составляет более 60% общего объема среды культивирования (рис. 65). Однако снижение в уровне накопления БР начинается уже при внесении ОКЖ в объеме 1/5 от общего объема питательной среды (рис. 66). Спектры лизатов этих вариантов экспериментов, полученные для штамма UM-17, демонстрируют, что с увеличением доли внесенной ОКЖ увеличивается содержание каротиноидов по отношению к содержанию БР (рис. 20).

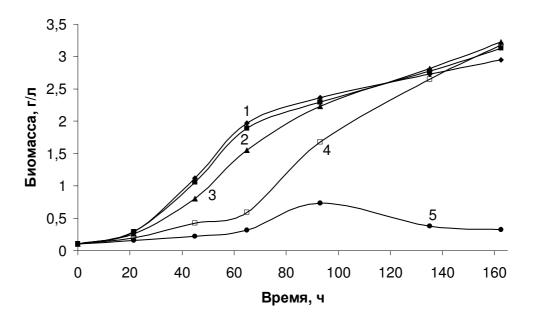


Рис. 65. Динамика накопления биомассы штамма UM-17 при внесении отработанной культуральной жидкости в исходную питательную среду.

1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Во всех вариантах среды содержали одно и то же количество органического субстрата.

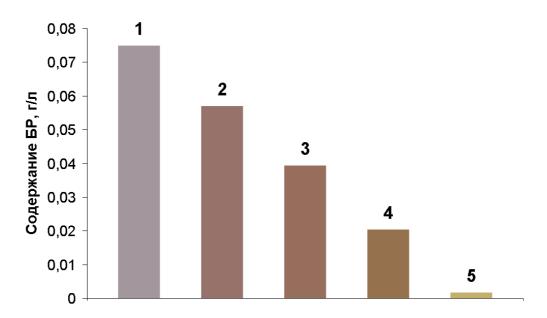


Рис. 66. Цвет суспензии и уровень накопления БР штаммом UM-17 при культивировании с внесением отработанной культуральной жидкости в исходную питательную среду.

1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Во всех вариантах среды содержали одно и то же количество органического субстрата.



Рис. 67. Спектры лизатов биомассы штамма UM-17 при культивировании с внесением отработанной культуральной жидкости в исходную питательную среду.

1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Во всех вариантах среды содержали одно и то же количество органического субстрата.

Выработка каротиноидов определяет изменения в цвете суспензии вариантов – конечный цвет суспензии меняется с увеличением доли ОКЖ в исходной среде от сиреневого до ржаво-желтого (рис. 66, 67). Результаты культивирования штамма ST-033 с добавлением ОКЖ были аналогичны результатам, полученным со штаммом UM-17.

Таким образом, результаты опытов с внесением ОКЖ свидетельствуют, что хотя в постферментационной среде и содержатся ингибиторы роста ГБ, но существенное торможение роста наблюдается лишь при возврате очень высокой доли ОКЖ – более 60% от объема среды, т.е. ингибирование роста ГБ, обусловленное накоплением продуктов жизнедеятельности ГБ, выражено лишь в незначительной степени. Более чувствителен к ингибиторам, содержащимся в ОКЖ, синтез бактериородопсина. Учитывая, однако, что в ОКЖ могут содержаться и продукты, образующиеся абиотически из исходных компо-

нентов среды, предположение о роли метаболитов биологического происхождения, как единственного фактора ингибирования роста ГБ и синтеза БР, представляется не совсем убедительным.

4.2.6. Исследование эффекта старения среды

Предположение, что основными ингибиторами роста ГБ и синтеза БР могут быть продукты, образующиеся при протекании побочных абиотических реакций с участием компонентов питательной среды, получило наиболее убедительное подтверждение в опытах с изучением эффекта старения среды. Такое «старение» может быть обусловлено образованием продуктов химического и/или фотохимического окисления из органических компонентов питательной среды при хранении ее. Эти продукты могут ингибировать рост и биосинтез.

Было обращено внимание, что уже при культивировании на 2-х суточной среде, заготовленной впрок и хранящейся при комнатной температуре и дневном освещении, наблюдались существенно худшие рост галобактерий и накопление БР. Аналогичные, но более интенсивные процессы старения среды могут протекать и в ходе культивирования галобактерий (5–7 суток культивирования при температуре 37–38 °C и аэрации). Как подчеркивалось в обзоре литературы, такие соединения как липиды, которые могут входить в состав примесей используемых органических субстратов, могут подвергаться процессам перекисного окисления [13]. В эти реакции могут вступать и другие классы соединений. Образовавшиеся вещества могут оказывать токсическое действие на липиды мембран ГБ, другие структуры, вызывать у ГБ состояние окислительного стресса и индуцировать синтез веществ-антиоксидантов, участвующих в ответе бактерий на стресс-факторы. В частности, у галобактерий такими веществамиантиоксидантами могут выступать каротиноиды [133-135], относящиеся к классу липидов. Имеются сообщения [135-137], что каротиноиды в определенных условиях приобретают прооксидантные свойства. При взаимодействии их как антиоксидантов с активными формами кислорода в реакциях окисления – дезактивации могут образовываться токсичные соединения.

С целью выяснения роли фактора «старения» среды были проведены опыты, в которых стерильная среда перед засевом инокулятом находилась на ка-

чалке без засева 2, 4, 6 суток при аэрации и освещении – с последующим выращиванием штамма UM-17. Результаты опытов представлены на рис. 68.

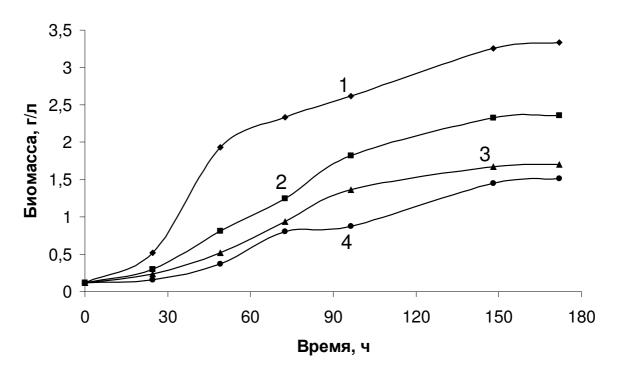


Рис. 68. Влияние «возраста» питательной среды на накопление биомассы штаммом UM-17.

1-c внесением инокулята в свежеприготовленную среду, 2-2 сут. аэрации и освещения стерильной среды до засева, 3-4 сут. аэрации и освещения среды до засева, 4-6 сут. аэрации и освещения среды до засева.

Как видно из представленных данных, уровень накопления биомассы закономерно падал с увеличением «возраста» среды перед засевом. К концу культивирования активного по синтезу БР штамма UM-17 на среде с предварительной аэрацией и освещением ее в течение 6 сут. накопление биомассы составило лишь около 50% по сравнению с использованием свежеприготовленной среды (рис. 68). Содержание БР после 160 ч культивирования составило: для свежеприготовленной среды – 72 мг/л, при использовании двухсуточной питательной среды – 37 мг/л, четырехсуточной – 22 мг/л, шестисуточной – 14 мг/л. Суспензия клеток в варианте со свежей средой имела насыщенный сиреневый цвет. По мере увеличения возраста среды наблюдалось все более и более существенное изменение цвета суспензии с увеличением доли ржаво-желтых оттенков и убыванием сиреневого, что свидетельствовало о возрастании количества кароти-

ноидов. При этом эффект изменения цвета не был обусловлен изменением цвета исходной среды при старении: среда при аэрации и освещении без засева своих цветовых свойств не изменяла в течение, по крайней мере, 12 сут. после нахождения при 37 $^{\circ}$ C и аэрации при $N_{\text{об. меш.}} = 150$ об./мин.

Штамм ST-033, менее активный в отношении синтеза БР и накапливающий больше каротиноидов в аналогичных опытах, оказался менее чувствительным к «старению» среды по сравнению со штаммом UM-17. Дополнительные опыты показали, что эффект ингибирования более выражен при выдерживании среды на свету по сравнению с выдерживанием в темноте. Насыщенность сиреневого и оранжево-желтого цветов в вариантах на свету была больше, чем в вариантах в темноте.

Такая сильная зависимость конечных результатов от возраста среды, особенно для более активного по синтезу БР штамма UM-17, свидетельствует, что старение среды, проявляющееся в абиотическом накоплении ингибиторов биосинтеза, является одним из ключевых факторов, влияющих на рост биомассы ГБ и синтез БР.

Наиболее вероятно, что в питательной среде протекают процессы химического и фотохимического окисления ее компонентов, приводящие к ингибированию роста галобактерий, синтеза ими БР и к индукции синтеза каротиноидов. На свету эти процессы более интенсивны, поскольку наряду с химическим окислением компонентов среды, происходит и фотохимическое окисление их. Чем больше возраст среды, тем больше образующихся токсичных продуктов, меньше уровень накопления биомассы и БР, отчетливее и раньше проявляются пики каротиноидов в спектрах лизатов. Можно предположить, что продукты химического и фотохимического окисления, приводящие к образованию перекисных и радикальных частиц [14, 100], участвуют в регуляции синтеза каротиноидов и БР на внутриклеточном уровне, стимулируя в первую очередь синтез каротиноидов (желто-ржавый оттенок) и репрессируя синтез БР, а также стимулируя расщепление исходного клона на субклоны разного цвета. О возможности такого расщепления и образования мутантов под действием продуктов перекисного окисления аминокислот и других органических соединений свидетельствуют и данные литературы [174].

Накопление ингибиторов роста и биосинтеза – продуктов химических и фотохимических реакций, очевидно, происходит и по ходу культивиро-

вания параллельно с накоплением биомассы. Совместное действие продуктов абиотических и биотических процессов — ингибиторов метаболизма — приводит к замедлению и торможению роста галобактерий, накопления ими бактериородопсина.

4.2.7. Влияние пероксида водорода и мягкого УФ-излучения

Вывод о возможном участии перекисных частиц в регуляции синтеза каротиноидов и БР, стимулировании ими синтеза каротиноидов и репрессии синтеза БР, основан не только на данных литературы, приведенных для других микроорганизмов [14, 100], но и был подтвержден в прямых опытах с внесением H_2O_2 в среду культивирования галобактерий или с облучением суспензии галобактерий мягким ультрафиолетом (УФА-диапазона).

В опытах с внесением H_2O_2 предварительно была найдена критическая концентрация пероксида водорода, не приводящая к инактивации клеток Γ Б, а именно 0,4–0,6 г H_2O_2 на 1 л среды.

На рис. 69 представлены результаты опыта с внесением 0.5 г/л H_2O_2 в среду культивирования на разных фазах роста штамма UM-17. Внесение такого количества пероксида в момент засева привело к гибели клеток ГБ (данные не представлены на рис. 69), при внесении в момент активного роста (варианты 1, 2 на рис. 69) гибели популяции не наблюдалось, напротив, конечный уровень накопления биомассы возрастал. Внесение H_2O_2 на поздней стадии роста привело к гибели популяции (вариант 3 на рис. 69).

В варианте 1 накапливалось 27 мг/л БР, варианте 2 – 39 мг/л БР, в контроле без внесения H_2O_2 накапливалось 77 мг/л БР. Цвета суспензии клеток в вариантах 1 и 2 – оранжевые, в спектрах лизатов присутствуют пики каротиноидов. Цвет суспензии в контрольном варианте – сиреневый. Интересно, что в вариантах, где наблюдалась гибель клеток, через 5–6 ч после внесения H_2O_2 в спектрах лизатов полностью пропадали пики каротиноидов, и проявлялся лишь один пик БР. В вариантах с гибелью клеток пероксид водорода не разлагался полностью (на стенках кюветы пробирки с отобранным образцом суспензии образовывались пузырьки кислорода). В вариантах со стимулированием накопления биомассы Γ Б H_2O_2 разлагался полностью на протяжении 7–8 ч культивирования, о чем свидетельствовало исчезновение пены в колбах.

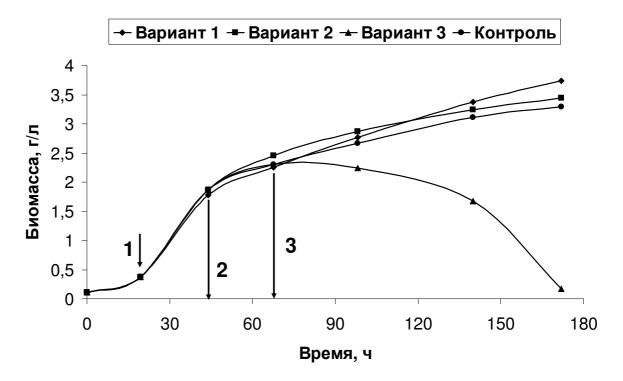


Рис. 69. Влияние H_2O_2 на рост галобактерий.

1, 2, 3 – добавление 0,5 г/л H_2O_2 соответственно в вариантах 1, 2, 3 на 18 ч, 44 ч, 69 ч культивирования.

Следующие данные (рис. 70–73) наглядно демонстрируют влияние облучения мягким УФ при разных дозах и в фазах роста на накопление биомассы ГБ (штамм UM-17). Вариант 1 на графиках – облучение 1 мин., вариант 2 – 5 мин., вариант 3 – 10 мин.

На представленных на рис. 70–73 результатах видно отличие между облученными вариантами и контролем: при облучении конечный уровень накопления биомассы выше, чем в контроле без облучения. При облучении суспензии во время засева различия наибольшие (рис. 70). Эти различия тем меньше, чем позже была облучена суспензия галобактерий.

При облучении культуры во время засева (рис. 70) наблюдаются наибольшие различия и в выработке БР. В контроле накапливалось 77 мг/л БР, в варианте 1-72 мг/л БР, варианте 2-65 мг/л БР, варианте 3-59 мг/л БР. С увеличением продолжительности облучения цвет суспензии ГБ в конце культивирования приобретает все более выраженный оранжевый оттенок, а в спектрах лизатов пики каротиноидов становятся все более явными.

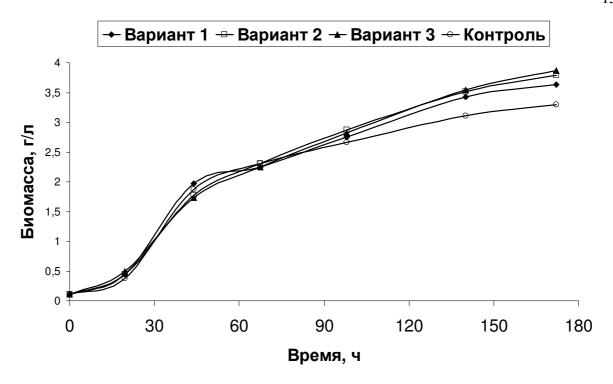


Рис. 70. Влияние разных доз мягкого УФ на рост штамма UM-17 при облучении во время засева.

1, 5, 10 мин. облучения соответствуют вариантам 1, 2, 3.

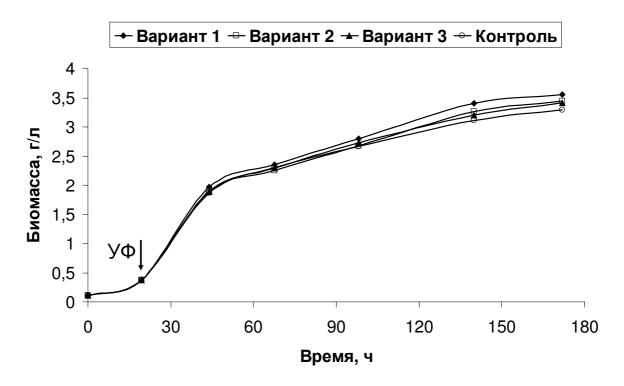


Рис. 71. Влияние разных доз мягкого УФ на рост штамма UM-17 при облучении на 19 ч культивирования.

1, 5, 10 мин. облучения соответствуют вариантам 1, 2, 3.

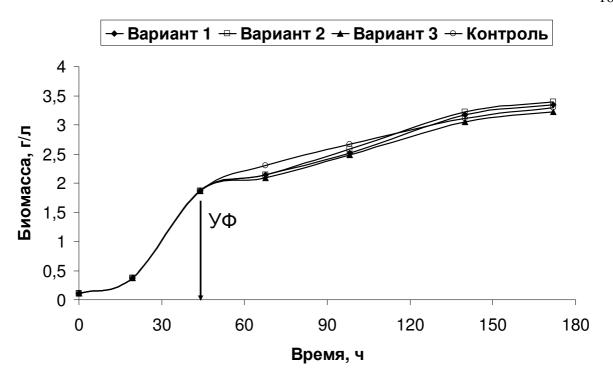


Рис. 72. Влияние разных доз мягкого УФ на рост штамма UM-17 при облучении на 44 ч культивирования.

1, 5, 10 мин. облучения соответствуют вариантам 1, 2, 3.

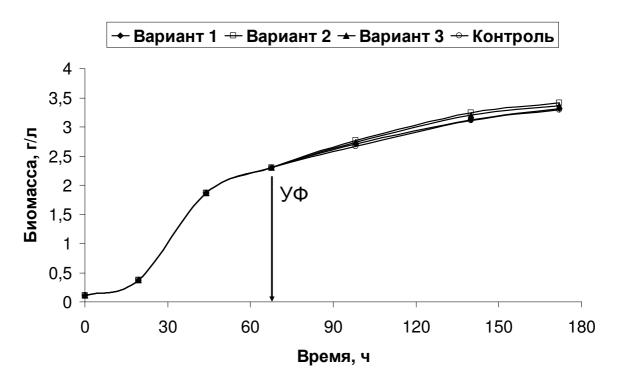


Рис. 73. Влияние разных доз мягкого УФ на рост штамма UM-17 при облучении на 68 ч культивирования.

1, 5, 10 мин. облучения соответствуют вариантам 1, 2, 3.

В случае облучения на 68 ч культивирования (рис. 73) в варианте 1 накапливалось 75 мг/л БР, варианте 2-75 мг/л БР, варианте 3-73 мг/л БР, т.е. накопление было практически одинаково, различия не превышали ошибки измерения БР.

Таким образом, непосредственное воздействие сублетальных доз пероксида водорода или УФА излучения стимулирует синтез каротиноидов и накопление биомассы галобактерий и репрессирует синтез бактериородопсина.

Взаимосвязь между накоплением биомассы, каротиноидов, бактериородопсина можно объяснить исходя из экологической стратегии регуляции метаболизма у галобактерий.

Непосредственно на поверхности воды или твердых субстратов содержание кислорода высокое, освещенность видимым светом и ультрафиолетом Солнца высокая. В таких условиях активируется аэробное дыхание, окислительное фосфорилирование, выход биомассы повышается, образуется повышенное количество активных форм кислорода (перекисей и др.), а с этим активируется и синтез каротиноидов, выполняющих антиоксидантные, защитные функции в отношении накопления биомассы, бактериородопсин не нужен. В толще воды или биопленок наблюдается дефицит кислорода, ультрафиолетовое излучение сильно ослаблено, видимого света достаточно. В этих условиях аэробное дыхание и окислительное фосфорилирование репрессировано, каротиноиды не нужны, но нужен бактериородопсин, позволяющий клеткам получать дополнительную энергию в результате светозависимой генерации трансмембранного градиента протонов в условиях дефицита кислорода.

Как показали результаты исследований, представленные в предыдущих подразделах данной главы, по значимости влияния на рост галобактерий и накопление бактериородопсина экологические и биологические факторы могут быть ранжированы следующим образом (в порядке убыли значимости):

особенности штамма > интенсивность аэрации \approx продукты перекисного окисления компонентов среды > состав триптонов или пептонов, входящих в питательную среду > уровень освещения \approx доза посевного материала > ингибиторы метаболизма, накапливающиеся в процессе жизнедеятельности галобактерий > фаза роста посевного материала \approx состав дрожжевых экстрактов, входящих в питательную среду.

В условиях изменения экологических условий перекисные частицы и радикалы могут выполнять определенную сигнальную, регуляторную функцию, свидетельствующую о смене условий в окружающей среде.

Для получения бактериородопсина в промышленных объемах необходимо культивирование с достаточно интенсивным подводом кислорода и освещением среды. Однако такой режим приводит к повышению скорости образования ингибиторов роста биомассы ГБ и накопления БР.

Выявленные закономерности позволяют предположить, что для разработки технологически рациональных способов культивирования галобактерий целесообразно использовать такие приемы, которые снижают содержание продуктов фотохимического и химического окисления (в частности, перекисей, активных форм кислорода) в среде культивирования галобактерий, нивелируют, подавляют воздействие этих факторов окислительного стресса, т.е. разработать способы культивирования галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса.

4.3. Разработка способов культивирования в условиях контролируемого окислительного стресса

Основываясь на полученных данных о негативном воздействии ингибиторов биосинтеза, образующихся по ходу культивирования в результате абиотических и биотических процессов, были апробированы методы культивирования, нивелирующие отрицательные воздействия ингибиторов. Использовались следующие подходы:

- 1 **подготовка посевного материала** (с целью возможного уменьшения степени репрессии синтеза БР продуктами, содержащимися в посевном материале и воздействующими на клетки галобактерий уже на стадии выращивания посевного материала);
- 2 **культивирование при дефиците кислорода** (для уменьшения количества ингибиторов, образующихся при химическом окислении органических компонентов питательной среды);
- 3 **культивирование с доливом** (по ходу культивирования постепенно доливается определенный объем свежеприготовленной среды, при этом совокупное количество образующихся токсичных продуктов должно быть меньше);
 - 4 внесение антиоксидантов;
- 5 **подбор условий освещения** (стимулирование выработки БР при одновременном уменьшении фотохимического воздействия на среду);
 - 6 селективное извлечение ингибиторов сорбентом в процессе роста.

Во всех этих случаях эксперименты проводились со штаммом UM-17 как в колбах, так и в биореакторе.

4.3.1. Подготовка посевного материала

Очевидно, клетки галобактерий, выращиваемые в качестве посевного материала, также могут подвергаться воздействию продуктов химического или фотохимического окисления компонентов питательной среды. В результате в таких клетках индуцирован синтез каротиноидов и репрессирован синтез бактериородопсина.

В разделе 4.1 была описана модифицированная методика отбора колоний с добавлением гранул активного угля в твердую питательную среду, использованная в том числе и при получении штамма UM-17. Было отмечено, что на среде с углем расщепление клонов, образующих сиреневые колонии, на субклоны с разной цветовой окраской, в большинстве своем не наблюдалось.

Учитывая стимулирующее влияние продуктов перекисного окисления на синтез каротиноидов и появление оранжевых клонов, а также тот факт, что такие продукты могут поглощаться из питательной среды добавляемыми сорбентами, в частности, активированным углем, целенаправленно была проведена серия экспериментов с выращиванием и предобработкой посевного материала с добавлением активированного угля в среду культивирования (жидкую или твердую).

Использовался активированный уголь марки АГ-3, хорошо сорбирующий органические компоненты среды.

Первоначально апробировалось культивирование с внесением в жидкую среду адсорбента в марлевом или полотняном мешочке (для предотвращения разрушения гранул угля). Однако эксперименты показали, что такой способ внесения угля не только стимулирует, но и тормозит рост галобактерий. Возможно это обусловлено адсорбцией клеток галобактерий на поверхности угля и, как следствие, неблагоприятными условиями для роста клеток, в частности, дефицитом кислорода в микрозонах контакта. Однако при этом суспензия клеток приобретала сиреневую окраску, а на спектре лизата исчезали пики каротиноидов.

Более убедительные положительные результаты были получены при внесении угля, инкапсулированного в агаризованную минеральную основу (без добавления органических компонентов питания). Проведение культивирования по такому варианту аналогично процессу гемосорбции, применяемому в медицине для очистки крови от токсичных веществ [175, 176]. Инкапсулирование в гемосорбции предотвращает разрушение форменных элементов крови, например эритроцитов.

По варианту культивирования с использованием инкапсулированного угля подготовка посевного материала проводилась следующим образом. В колбы объемом 100 мл вносилось от 0,2 до 1,5 г гранулированного активированного угля. Затем в колбы добавлялось по 25 мл среды, содержащий минеральную основу среды с агаром (2,5-5%) для фиксации угля на дне колб, после чего содержимое колб стерилизовалось 30 мин. при 0,5 ати и охлаждалось до застывания агара; уголь оказывался хорошо зафиксированным внизу колб. Питательная среда (5 г/л триптона фирмы Serva или Hispanlab, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина и минеральные компоненты) стерилизовалась отдельно в тех же условиях, после охлаждения заливалась в количестве 50 мл в колбу с углем и агаром и засевалась клетками галобактерий в количестве 4% суспензии клеток от объема жидкой среды в колбах. Засеянные колбы ставились на качалку.

В табл. 5 приведены результаты экспериментов с внесением в колбы разного количества угля.

Видно, что в этих условиях конечные уровни накопления биомассы и бактериородопсина существенно выше уровней, достигаемых в стандартных условиях культивирования без внесения угля, и повышаются с увеличением количества внесенного угля. Внесение угля в количестве более 1,0–1,5 г на колбу (20–30 г/л) уже не приводило к существенному росту уровня накопления биомассы и БР. Суспензия клеток в конце культивирования с углем имела насыщенный сиреневый цвет.

Таблина 5

| Количество угля (г) на л | Биомасса (г/л) на163 час | БР (мг/л) на 163 час | |
|--------------------------|--------------------------|----------------------|--|
| культуральной жидкости | культивирования | культивирования | |
| 0 | 3,1-3,3 | 70-75 | |
| 4 | 4,44 | 97 | |
| 12 | 4,95 | 110 | |
| 20 | 5,1 | 119 | |
| 28 | 5,12 | 125 | |
| 30 | 5,15 | 125-130 | |

Исходя из результатов этих опытов, для получения максимального выхода БР количество инкапсулированного угля в колбе должно составлять 1,0-1,5 г на колбу (20-30 г/л).

Типичная кривая роста биомассы при внесении в колбу 1,5 г угля с инкапсулированием его в агаризованную среду представлена на рис. 74.

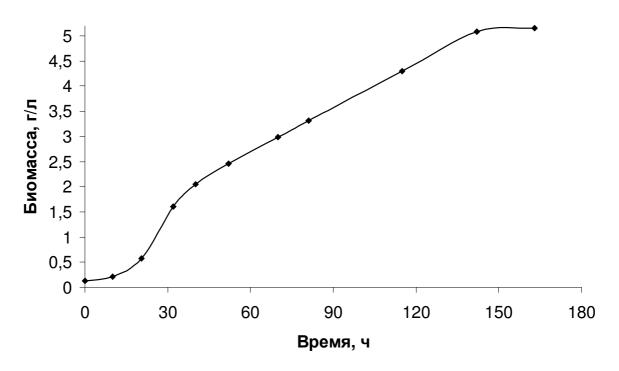


Рис. 74. Накопление биомассы ГБ при культивировании с инкапсулированным адсорбентом (активированный уголь АГ-3).

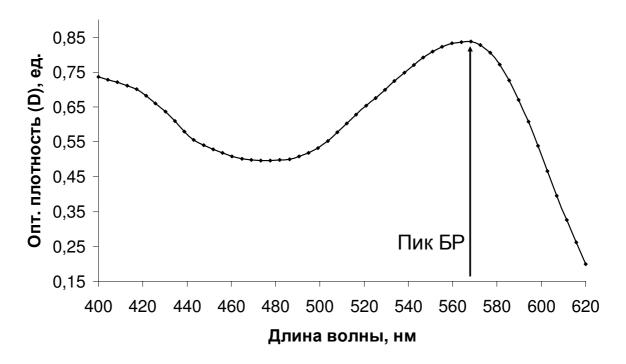


Рис. 75. Типичный спектр лизата биомассы штамма UM-17, выращиваемого на среде с инкапсулированным углем.

Очень важно, что при использовании сорбента в спектре лизата биомассы галобактерий практически полностью отсутствуют пики каротиноидов и проявляется только ярко выраженный пик БР (рис. 75), что в дальнейшем позволяет существенно облегчить выделение БР из биомассы, очистку его от каротиноидов и обеспечить получение относительно недорогих препаратов БР.

Полученный таким образом посевной материал сохраняет повышенную способность накапливать бактериородопсин на среде без угля на протяжении последующих двух пересевов, однако его активность постепенно падает. При первом пассаже после выращивания на агаризованной среде с углем выход БР составляет около 100 мг/л БР (засевной материал – 125 мг/л) при уровне накопления биомассы 3,8-3,9 г/л, втором пассаже – 80–85 мг/л БР, третьем – практически соответствует типичным значениям, наблюдаемым без использования угля (75–77 мг БР на 1 л среды).

Повышенную биосинтетическую активность галобактерий в этих опытах можно было бы объяснить удалением части ингибиторов метаболизма из жидкой части среды в агаризованную среду, в которую клетки ГБ не проникают, и, как следствие, дерепрессией синтеза БР. Это приводит к повышению содержания биомассы и БР в жидкой части питательной среды. Результаты, представленные в табл. 2, и сохранение повышенной биосинтетической активности клеток галобактерий на протяжении первых двух пассажей при культивировании на среде без угля указывает на значимость непосредственно угля как селективного материала, извлекающего ингибиторы синтеза БР из среды культивирования.

Таким образом, при использовании посевного материала штамма UM-17, выращенного на среде с углем в периодических условиях, конечный уровень накопления биомассы повышается на 50–65%, существенно повышается удельная скорость роста, значение которой достигает 0,92 ч⁻¹, а накопления БР – на 65–85% при примерно одинаковой продолжительности культивирования и уменьшении содержания каротиноидов в биомассе.

4.3.2. Культивирование при дефиците кислорода

Полученные результаты о неблагоприятном влиянии продуктов химического/ фотохимического окисления на синтез БР позволяют предположить, что повышение уровня накопления БР галобактериями при умеренном дефиците кислорода в среде может быть обусловлено не только индукцией синтеза БР и сборки пурпурных мембран в этих условиях, но и уменьшением количества

абиотически образующихся продуктов – ингибиторов синтеза БР. Поэтому при использовании в качестве инокулята клеток ГБ, полученных с добавлением инкапсулированного угля, дальнейший процесс культивирования важно вести в режиме лимитирования роста кислородом.

На рис. 76 представлены результаты культивирования штамма UM-17 в биореакторе в условиях достаточного обеспечения среды кислородом (р O_2 не менее 25% от уровня насыщения). В этом случае инокулят готовился обычным способом, т.е. на среде без внесения активного угля. Содержание БР в инокуляте составляло не более 70-75 мг/л. На спектре хорошо проявлялись пики каротиноидов.

После первых 14 ч падения уровня растворенного кислорода до 25% от насыщения содержание его в ферментационной среде в дальнейшем поддерживалось на этом уровне, превышающем лимитирующие значения. На 63 ч был достигнут не только максимум накопления биомассы, но и максимум накопления БР – 42 мг/л. В спектре лизата практически отсутствовали пики каротиноидов, цвет суспензии был бледно-сиреневый.

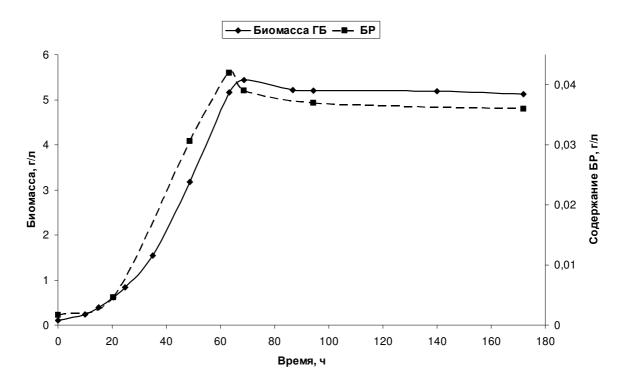


Рис. 76. Культивирование штамма UM-17 в периодических условиях без дефицита кислорода в среде.

Затем содержание БР стало падать и на 69 ч составило 39 мг/л, на 94 ч –37 мг/л. К концу культивирования содержание БР составило около 36 мг/л. Одновременно с падением БР на спектрах лизатов появлялись более ярко выражен-

ные пики каротиноидов и, соответственно, цвет суспензии в конце ферментации стал оранжево-красным. Спектр лизата конечной суспензии клеток практически повторял спектр лизата клеток инокулята.

Культивирование в тех же условиях, но с поддержанием уровня растворенного кислорода 80-90% приводили примерно к таким же уровням накопления биомассы, каротиноидов и бактериородопсина.

На рис. 77 представлены результаты культивирования штамма UM-17 в биореакторе в условиях лимитирования роста кислородом. В этом случае инокулят готовился с добавлением угля, инкапсулированного в агаризованную среду. Содержание БР в инокуляте составляло 120 мг/л по спектру лизата.

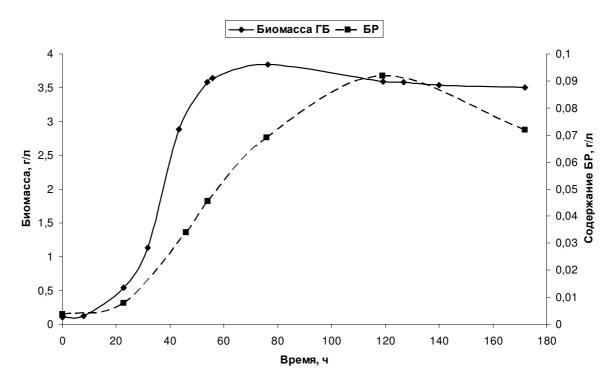


Рис. 77. Культивирование штамма UM-17 в периодических условиях при дефиците кислорода в среде.

После первых 11 ч падения содержание кислорода в ферментационной среде поддерживалось на уровне, не превышающем 5-10% путем регулирования оборотов мешалки и расхода воздуха. На 46 ч культивирования стала заметной сиреневая окраска суспензии, на 54 ч она еще более усилилась. Содержание БР к 46 ч составило 34 мг/л, к 54 – 46 мг/л, к 76 ч – 69 мг/л, максимальный выход БР – 92 мг/л был на 119 ч культивирования. К 172 ч культивирования его содержание упало до 72 мг/л. К концу ферментации, когда содержание БР стало падать, на спектрах лизатов стали все явственнее проявляться пики каротиноидов.

Таким образом, использование инокулята, подготовленного на среде с добавлением угля и в последующем выращиваемого в режиме с лимитированием по кислороду позволило повысить максимальный уровень накопления БР с 42 мг/л до 92 мг/л.

4.3.3. Культивирование в доливном режиме

При апробации доливного режима как способа уменьшения количества образующихся продуктов химического и фотохимического окисления из компонентов питательной среды осуществляли постепенный долив одной и той же порции свежей стерильной среды через одинаковые промежутки времени. Засев осуществлялся инокулятом, выращенным с применением инкапсулированного активированного угля, первоначальный объем культивирования равнялся объему последующего однократного долива, содержание кислорода в жидкости поддерживалось на уровне 7%.

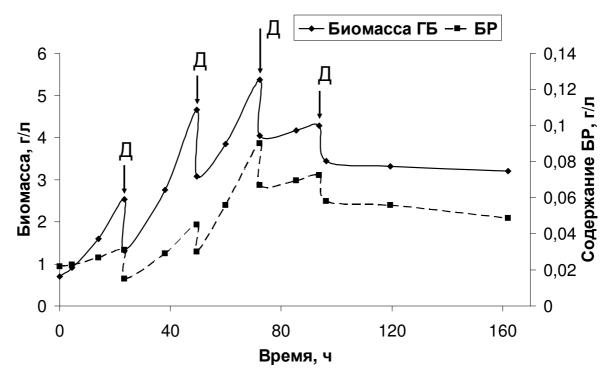


Рис. 78. Накопление биомассы и БР при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с доливом свежеприготовленной питательной среды. Д – долив среды.

Оценивая ростовые характеристики (рис. 78) можно говорить о постепенном снижении скорости роста с $0,054 \text{ ч}^{-1}$ до первого долива до $0,049 \text{ ч}^{-1}$ после 1-го долива и до $0,025 \text{ ч}^{-1}$ после 2-го. 3-ий долив приводит к еще большему за-

медлению, после 4-го содержание клеток начинает уменьшаться. В накоплении БР прослеживаются те же тенденции, что и в накоплении биомассы. При выбранном временном интервале между доливами целесообразно применять лишь 2 долива, в каждом из которых вносилось бы по 1/3 конечного объема культуральной жидкости.

Максимальный уровень БР после 2- го долива приходится на третьи сутки культивирования и составляет 90 мг/л, что характерно при применении инокулята, подготовленного на инкапсулированном адсорбенте. Однако по сравнению с вариантом культивирования в периодических условиях при том же режиме аэрации (рис. 78) галобактерии накапливают больше биомассы, с большим экономическим коэффициентом выхода от субстрата.

4.3.4. Культивирование с внесением антиоксидантов

Эксперименты были проведены в качалочных колбах. Антиоксиданты вносились при засеве в количествах от 0,5 до 2 г/л, варьирование их количества в этом диапазоне не приводило к заметным изменениям результатов, представленным в таблице 6.

Таблица 6

| Вещество | Прирост в уровне нако- | Влияние на выра- | Прирост в уро- |
|---------------------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| | пления бактериородоп- | ботку каротиноидов | не накопления |
| | сина, % к контролю | (сравнение с кон- | биомассы, % к |
| | | тролем) | контролю |
| Na ₂ SO ₃ | + 7-10% | по сравнению с кон- | Уровень кон- |
| | | тролем пики кароти- | троля |
| | | ноидов более выра- | |
| | | жены | |
| Цистеин | + 15-18% | полное исчезновение | Уровень кон- |
| | | пиков каротиноидов, | троля |
| | | отчетливое проявле- | |
| | | ние пика БР | |
| Токоферол | + 7-10% | уменьшение прояв- | + 28% |
| (витамин Е) | | ления пиков кароти- | |
| | | ноидов, пик БР бо- | |
| | | лее выражен | |
| Контроль | 70 мг/л | | 3,2 г/л |

4.3.5. Подбор условий освещения

В последнее время в качестве источников излучения все чаще используют светодиоды. Они обладают малым энергопотреблением, высоким КПД, светимостью и сроком службы. Кроме того, они излучают в узком диапазоне длин волн, что используется в экспериментальных работах с фототрофными микроорганизмами для изучения воздействия монохроматического света.

С целью изучения возможности оптимизации облучения галобактерий как варианта уменьшения скорости образования ингибиторов биосинтеза проводились тестовые опыты с использованием светодиодов разных длин волн: красного (λ =642 нм), светло-зеленого (λ =529 нм), зеленого (λ =513 нм), голубого (λ =465 нм)². Интенсивность падающего света при облучения светодиодами варьировалась в рамках от 69–70 мВт/л до 137–140 мВт/л. Эксперименты со светодиодной матрицей голубого света (λ =465 нм) показали наилучшие результаты среди вышеуказанного набора светодиодов, а также использованных в работе люминесцентных ламп. При освещении ферментационной среды светодиодной матрицей с λ =465 нм выход биомассы в периодическом режиме культивирования повышался на 10%, а БР – на 22% по сравнению с контрольными опытами при освещении лампами дневного света с интенсивностью облучения 69–70 мВт/л. Повышение интенсивности облучения до 137–140 мВт/л не приводило к заметным изменениям в выходе биомассы галобактерий и бактериородопсина.

Таким образом, облучение монохроматическим голубым светом светодиодной матрицы положительно влияет на выход биомассы и БР. Возможно, это обусловлено тем, что монохроматическое освещение определенной длины волны, а не широкого спектра, как у люминесцентных ламп, уменьшает скорости протекания процессов фотохимического окисления компонентов питательной среды.

4.3.6. Культивирование с селективным извлечением ингибиторов сорбентом в процессе роста

Вышеописанные опыты с апробированием методов культивирования, нивелирующих отрицательные воздействия ингибиторов биосинтеза, показали, что варианты культивирования без внесения сорбента позволяют лишь незна-

 $^{^2}$ Светодиодные матрицы были предоставлены и эксперименты проводились совместно с НТЦ-44 ГУП НПО «Астрофизика»

чительно повысить уровень накопления биомассы и бактериородопсина без существенного уменьшения содержания каротиноидов в биомассе галобактерий, накапливаемой к концу ферментации. При обработке же среды сорбентом лишь на стадии подготовки посевного материала в дальнейшем при последующих пересевах и размножении клеток наблюдается постепенное снижение активности в отношении синтеза БР.

В этой связи закономерное развитие метода с сорбентом заключалось в проведении всего цикла ферментации – от стадии подготовки посевного материала до стадии основной ферментации – с использованием сорбента (активированного угля) для извлечения образующихся ингибиторов биосинтеза.

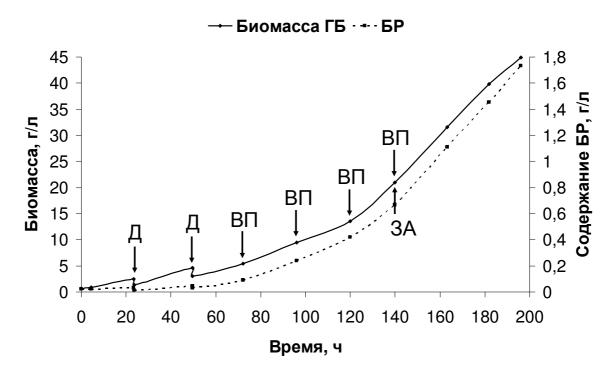


Рис. 79. Накопление биомассы при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с прокачкой ферментационной суспензии через выносной контур с емкостью с сорбентом для извлечения ингибиторов биосинтеза, доливом свежеприготовленной питательной среды в биореактор и внесением подпиток. Д – долив среды, ВП – внесение подпитки, ЗА – замена адсорбента.

На рис. 79 приведены результаты одного из экспериментов при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с прокачкой ферментационной суспензии через выносной контур с емкостью с сорбентом (уголь АГ-3, инкапсулированный в гранулы агаризованной среды) для извлечения ингибиторов биосинтеза.

По ходу ферментации уровень растворенного кислорода поддерживался ниже 15% от насыщения. Для повышения выхода биомассы ГБ и содержания

БР в реактор вносили свежеприготовленную субстратную подпитку, представляющую концентрированный раствор, содержащий триптон, дрожжевой экстракт и глицерин, а также после 140 ч культивирования обновили гранулы с инкапсулированным углем. Совокупный объем гранул агара с углем по отношению к объему среды в реакторе (с учетом долива) составил 1 часть на 7 частей среды.

Используя такой способ культивирования по истечении 8 сут. удалось достичь конечного уровня накопления биомассы 45 г/л (по сухому веществу) при суммарном содержании бактериородопсина 1700–1750 мг/л. В спектре лизата биомассы галобактерий, накопленной в конце ферментации, практически полностью отсутствовали пики каротиноидов и проявлялся только ярко выраженный пик БР (см. рис. 75).

Таким образом, обработка углем резко повышает производительность биореактора, выход биомассы и бактериородопсина. Выход БР по данному способу повышается до 1700–1750 мг/л за 8 сут. ферментации, в то время как в обычном периодическом режиме он составляет максимум 70–75 мг/л за 7 сут. ферментации. Реализация ферментационного процесса по такому высокоплотностному режиму снижает и количество жидких отходов – отработанной культуральной жидкости.

Однако самое главное преимущество способа культивирования с сорбентом – отсутствие большого количества каротиноидов, и следовательно, упрощение задачи выделения и очистки бактериородопсина – достаточно 1-ой отмывки (методом ультрацентрифугирования) от каротиноидов, в то время как в обычном варианте необходимо до 5 отмывок (операций ультрацентрифугирования), что резко снижает трудоемкость процесса выделения бактериородопсина и его потерю в ходе очистки.

Найденный способ резкого повышения продуктивности галобактерий послужил основой для разработки автоматизированной системы культивирования для наработки биомассы галобактерий и бактериородопсина.

4.4. Совершенствование автоматизированного комплекса для культивирования галобактерий и получения бактериородопсина

Замеченная корреляция цвета суспензии галобактерий с содержанием бактериородопсина (в лизате определяется спектрофотометрически) послужила основой для создания менее трудоемкой методики количественного определения бактериородопсина по сравнению со стандартной, до этого применяемой и

включающей многократное центрифугирование лизата клеток (см. материалы и методы). Назначение разработанной методики — непрерывный анализ содержания бактериородопсина в процессе культивирования, не прибегая к непосредственному выделению бактериородопсина, для контроля факторов, влияющих на выработку бактериородопсина клетками галобактерий и автоматизации управления процессом культивирования.

Разработка экспресс-методики определения содержания бактериородопсина в клетках галобактерий.

В основе экспресс-методики лежала идея получения изображения и цветовых характеристик суспензии галобактерий, отбираемой из биореактора или прокачиваемой через кювету с использованием стандартных сканеров. В работе изображение суспензии галобактерий получалось с помощью сканера Epson Perfection 1270: слой суспензии в стеклянной кювете толщиной 1 см сканировался ССD (Charge Coupled Device) матрицей сканера, изображение подвергалось дальнейшему анализу.

Для описания цвета использовалась аддитивная RGB модель [177, 178]: цвет в ней создается комбинацией трёх каналов, при смешении основных цветов – красного, зеленого и синего. Например, комбинацией синего (В) и красного (R), получается пурпурный (М), при смешении зеленого (G) и красного (R) – жёлтый (Y), при смешении зеленого (G) и синего (В) – циановый (С), а все три цветовые компонента в одинаковой пропорции дают белый цвет (W). Восьмиразрядное кодирование каждого канала (всего 24 бита) позволяет определять более 16,7 млн. цветов (режим называют True Color).

Координатная система аддитивной RGB модели имеет точку начала координат, соответствующую абсолютно черному цвету (цветовое излучение отсутствует), и три оси координат, соответствующих основным цветам. Любой цвет (X) может быть выражен в цветовом пространстве вектором, который описывается уравнением: \vec{X} =R \vec{R} +G \vec{G} +B \vec{B} , идентичным уравнению вектора в пространстве, рассматриваемому в векторной алгебре (R,G,B – координаты вектора). Направление вектора характеризует цветность, а его модуль выражает яркость. Так как величина излучения основных цветов является основой цветовой модели, ее максимальное значение принято считать за единицу (любой цвет можно привести к одной и той же интенсивности). В трехмерном цветовом пространстве можно построить плоскость единичных цветов, образованную треугольником цветности. Каждой точке плоскости единичных цветов соответ-

ствует след цветового вектора, пронизывающего ее в этой точке — цветность любого излучения может быть представлена единственной точкой внутри треугольника цветности, в вершинах которого находятся точки основных цветов. Положение точки любого цвета можно задать двумя координатами, а третья легко находится по другим вычитанием из единицы суммы долей двух цветов [178, 179].

Первоначальный этап работ по созданию экспресс-методики состоял в накоплении статистики по цветовым пробам, взятым в течение различных вариантов опытов. Цветовой пробе (эталону) ставилось в соответствие содержание бактериородопсина и биомассы галобактерий. Само изображение (разрешение – 300 dpi), состоящее из пикселей с несколько отличающимся цветом усреднялось в цвете с помощью размытия по Гауссу, аналогичного фильтру Gaussian Blur в Adobe Photoshop [180]. "Вес" цвета каждого пикселя в изображении оп-

ределяется функцией вида:
$$G(u,v) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-(u^2+v^2)/(2\sigma^2)}$$
, где радиус размы-

тия $r^2 = u^2 + v^2$, для каждого пикселя создается карта Гауссовского размытия, комбинацией всех карт получается новое отфильтрованное изображение. Результатом является то, что пиксели двух разных цветов приобретают оттенки, лежащие между исходными цветами — пиксель смешивается с окружающими по определенному закону, заданному функцией Гаусса. Подобные фильтры используют для обработки изображения в цифровом телевидении для подавления шумов [181]. Многократное применение этого фильтра с большим радиусом (r = 30) удовлетворительно усредняет цвет пикселей в изображении, которое сохраняется до завершения всего цикла исследований.

Цветовой охват сканера, монитора, принтера гораздо меньше цветового охвата человеческого глаза. Каждый конкретный сканер, монитор, принтер имеет свой диапазон воспроизводимых цветов. Чтобы точно определить реальный цвет посредством RGB значений, необходимо указать характеристики конкретного устройства, с помощью которого этот цвет воспроизводится. Начиная с операционной системы Windows 98, для управления цветом используется технология ICM 2.0 (Image Color Management), призванная удовлетворить все потребности в цветопередаче, для профессиональной работы с цветом она поддерживает стандарт профилей устройств ICC (International Color Consortium). Эти профили используются как переводная таблица для определения цветовых параметров конкретного принтера, сканера или любого другого аппарата. Многие high-end устройства (к которым относится и сканер Epson Perfection 1270) имеют встроенные профили для каждой конкретной модели. Основной целью

создания ІСС была именно разработка универсального стандарта описания цветовых параметров устройств. Однако до сих пор не существует идеальной системы управления цветом, одинаково пригодной для всех устройств, одинаково работающей на всех платформах и во всех программных средах. Именно поэтому цвет рисунков в настоящей диссертации может немного искажаться [182].

Различные источники света, такие как флуоресцентные лампы сканеров, имеют свои собственные спектральные характеристики. Внешний вид цвета очень сильно зависит от этих характеристик: при разных типах освещения очень часто один и тот же объект выглядит по-разному. Чтобы точно специфицировать цвет посредством трех значений, необходимо также указывать характеристики источника света, при котором цвет будет просматриваться.

С другой стороны, замеры спектральных данных не зависят ни от устройства, ни от освещения. Спектральные данные показывают состав света, отраженного от объекта, до того, как он интерпретируется наблюдателем или устройством. Различные источники света выглядят по-разному, когда их свет отражается от объекта, поскольку они содержат разное количество спектральной составляющей по каждой длине волны. Но соотношение поглощенного и отраженного объектом света всегда постоянно по каждой длине волны и не зависит от его размера. Спектральные данные – это и есть замеры этого соотношения [183, 184].

Таким образом, при замере спектральных данных фиксируются лишь стабильные характеристики поверхности объекта "в обход" тех двух компонентов цвета, которые изменяются в зависимости условий просмотра – источника света и наблюдателя или наблюдающего устройства. Чтобы точно специфицировать цвет, необходимы спектральные данные, в отличие от них RGB-описания являются предметом для "интерпретаций" со стороны наблюдателей и устройств. Именно поэтому методика цветового анализа привязана к аппаратному обеспечению и для каждого нового сканера необходимо перекалибровывать эталонные цветовые варианты.

Первоначально анализ накопленного массива данных с замером цвета проб дал неудовлетворительные результаты: в условиях стандартного выращивания галобактерий, проходившего с накоплением достаточно большого количества каротиноидов, невозможно было сопоставить цвету суспензии с определенной оптической плотностью (уровнем биомассы) какое-либо определенное содержание бактериородопсина. Получалась слишком большая область на цветовой диаграмме, отвечающая за одно и то же содержание бактериородопсина — одному и тому же уровню биомассы с определенным содержанием бактериоро-

допсина соответствовала целая область цветов для разных вариантов опытов. В основном, это происходило из-за смещения цвета в красную и желтую области, вызванного присутствием каротиноидов. Погрешность определения бактериородопсина по таким эталонным вариантам составляла 100% и выше за счет смещения цвета в красную и желтую области. Убрать мешающие оттенки, вносимые каротиноидами, количество которых варьировалось и было неизвестно, не представлялось возможным.

Ситуация принципиально изменилась в случае культивирования с внесением инкапсулированного активного угля. Практически полное устранение выработки каротиноидов в таком варианте ведения процесса позволило сузить цветовую область до минимума. Для проб с определенным содержанием биомассы и бактериородопсина численные значения R, G, B компонентов цвета колебались вокруг среднего с малым отклонением. Используя набор различных эталонов, полученных в опытах с инкапсулированным углем, удалось построить градиентную карту цвета (рис. 80): области эталонных вариантов сводились к цветовой точке, соответствующей определенному уровню биомассы и бактериородопсина усреднением по компонентам цвета. Полученная крупная сетка из цветовых точек сплайн-интерполяцией [185] по цветовым компонентам R, G, В и по двум осям – уровню биомассы и бактериородопсина разбивалась более мелко. Цветовые артефакты в полученной таким образом градиентной карте устранялись применением Гауссовского размытия при г = 3.

Градиентная карта цвета обладает меньшей точностью при малых оптических плотностях суспензии с погрешностью определения бактериородопсина при уровне биомассы до 1,2 г/л около 40%. С возрастанием уровня накопления биомассы точность анализа повышается: при содержании биомассы от 2 г/л до 3 г/л погрешность составляет около 35%, а при 5 г/л стабилизируется на уровне 7–8%, что скорее всего связано с уменьшением прозрачности среды с бактериями и снижением вклада цвета компонентов питательной среды в суммарный цвет суспензии.

Также следует отметить, что градиентная карта показывает несколько заниженное содержание бактериородопсина для определенного цвета и уровня биомассы, поскольку не учитывает некоторых потерь бактериородопсина, наблюдаемых при подготовке по стандартной методике (см. материалы и методы) эталонных вариантов для калибровки карты цвета. Однако принимая, что при выделении бактериородопсина стандартным методом потери его всегда примерно одинаковы, разработанный экспресс-способ дает возможность опреде-

лить выход бактериородопсина уже с учетом потерь стандартного метода выделения.

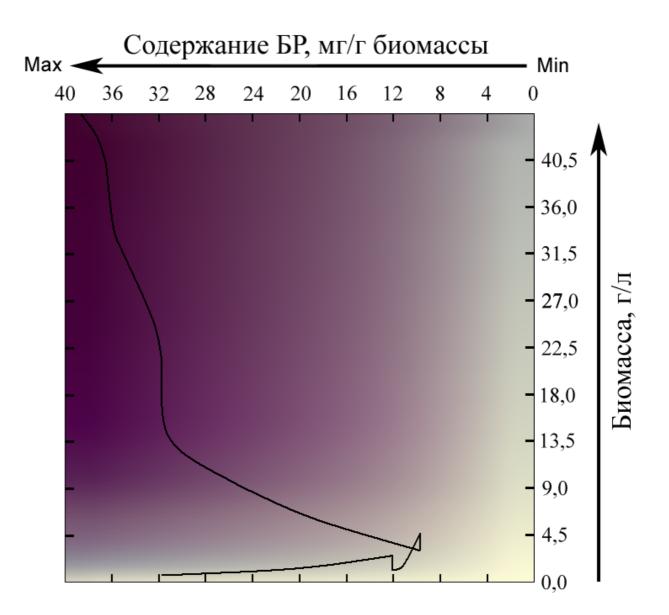


Рис. 80. Градиентная карта цвета для определения содержания БР (показана эволюция цвета реального культивирования с использованием адсорбента).

Интеграция экспресс-методики в автоматизированный комплекс для поддержания оптимальных параметров культивирования.

На рис. 4 в разделе "Материалы и методы" изображены дополнительные элементы, необходимые для оптимального культивирования галобактерий с высоким выходом бактериородопсина: емкость с инкапсулированным адсорбентом и проточная кювета с блоком сканирования. Серия предварительных экспериментов на колбах (п. 4.3.1.) позволила получить данные об оптималь-

ном количестве активированного угля и длительности его использования. Однако при культивировании в реакторе с использованием инкапсулированного адсорбента и подпиткой субстратом ориентироваться только на длительность как критерий для принятия решения о замене отработанного адсорбента, представляется недостаточным. Разработанная экспресс-методика позволила не только определять содержание бактериородопсина по ходу культивирования, но и вследствие чрезвычайной чувствительности к накоплению галобактериями каротиноидов предложить ее как управляющий элемент для автоматизированного принятия решения о замене отработанного адсорбента.

На градиентной карте (рис. 80) показана линия изменения (эволюции) цвета суспензии в реальном процессе культивирования галобактерий с внесением инкапсулированного угля (рис. 79). В данном случае замена адсорбента происходила на 140 ч, при этом решение о замене угля было принято на основании использования разработанной экспресс-методики. Такая заблаговременная замена позволяет упредить выработку каротиноидов и поддерживать метаболизм галобактерий в состоянии синтеза бактериородопсина. В реальных условиях массового производства кривые эволюции цвета будут несколько различаться и находиться в определенном коридоре разброса в зависимости от вариаций в составе и количестве питательной среды, адсорбционных свойств активированного угля, питательной ценности компонентов, параметров стерилизации и т.д. Поэтому в управляющую систему закладывается область цветов для каждого момента времени, соответствующая оптимальному и минимально допустимому течению процесса с определенным допуском на точность экспресс-методики. Выход цвета из этой области, который происходит всегда в сторону уменьшения В составляющей цвета (и, соответственно возрастания R и/или G компонент), говорит о начале выработке галобактериями каротиноидов и, следовательно, о необходимости замены адсорбента.

Симуляционные эксперименты в лабораторных условиях позволили подобрать искомые цветовые области для разных времен и отработать управление процессом. Чтобы наглядно представить изменение цвета в ходе процесса кроме градиентной карты можно воспользоваться R-G диаграммой (рис. 81), третьей координатой здесь является время.

На диаграмме изображен тот же вариант разработанного процесса, который присутствует на градиентной карте (рис. 80) и рис. 79. Возможный небольшой дрейф в сторону точки белого цвета, который заложен в допустимую цветовую область для каждого времени, может говорить о недостатке компонентов питания и контролируется также по показаниям оптической плотности, которая сопоставлена каждой точке на диаграмме (см. градиентную карту). В то

же время течение процесса от данной точки в рамках угла, ограниченного стрелками (уменьшается В составляющая цвета), говорит о начале выработки каротиноидов и необходимости замены адсорбента, происходящей по выходу цвета из зоны допуска (на диаграмме не изображена, но заложена в систему управления).

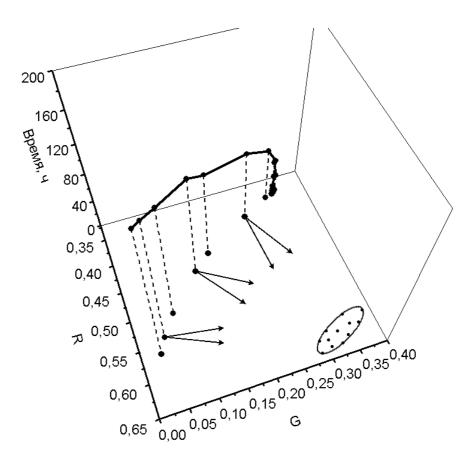


Рис. 81. Реальный процесс культивирования с использованием адсорбента в R-G координатах и изменение направленности биосинтеза в сторону накопления каротиноидов при отработке адсорбента.

Такая дополнительная система управления культивированием галобактерий разработана, как и основная система (см. раздел "Материалы и методы"), на базе LabView 7.0 [186].

Для реализации интерфейса между сканером и системой управления использовался специально написанный на MS Visual C++ 6.0 DLL (Dynamic Link Library) модуль [187], использующий TWAIN протокол, являющийся стандартом интерфейса прикладных программ (Application Program Interface, API) между устройствами ввода изображения (например, сканерами) и приложениями, управляющими этими устройствами.

4.5. Оценка технико-экономических показателей получения бактериородопсина по разработанному способу в сравнении с другими вариантами

По результатам полученных данных были выполнены оценочные расчеты затрат на получение БР по нами разработанному наиболее эффективному варианту культивирования галобактерий с использованием адсорбента и штамма UM-17 в сравнении со стандартным общепринятым методом периодического культивирования. Расчеты проводились для 4-х вариантов (см. приложение 2):

Вариант 1. Объем выпуска БР в год -250 г, реализация технологии по базовому варианту без проточных центрифуг и активированного угля. Время культивирования -7 сут., рабочий объем реактора -0.1 м³.

Вариант 2. Объем выпуска БР в год -2.5 кг, реализация технологии по базовому варианту без проточных центрифуг и активированного угля. Время культивирования -7 сут., рабочий объем реактора -1 м³.

Вариант 3. Объем выпуска БР в год -61,2 кг, реализация технологии с использованием адсорбента и проточных центрифуг (разработанный вариант). Время культивирования -8 сут., рабочий объем реактора -1 м³.

Вариант 4. Объем выпуска БР в год -612,5 кг, реализация технологии с использованием адсорбента и проточных центрифуг (разработанный вариант). Время культивирования -8 сут., рабочий объем реактора -10 м³.

Результаты оценочных расчетов приведены в табл. 6А.

Таблица 6А

| | Себестоимость, руб./г | | | |
|---|-----------------------|---------|---------|---------|
| Статьи калькуляции | Вариант | Вариант | Вариант | Вариант |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Сырье и материалы | 148 | 148 | 135 | 135 |
| Энергия для технологических целей | 324 | 94,5 | 54 | 41 |
| Зарплата персонала | 15552 | 2079 | 84 | 17 |
| Расходы на освоение производства, содержание оборудования | 648 | 594 | 49 | 41 |
| Общезаводские и прочие производственные расходы | 4860 | 648 | 27 | 11 |
| Внепроизводственные расходы | 4320 | 2700 | 540 | 54 |
| Полная себестоимость, руб./г | 25528 | 6169 | 835 | 299 |
| Полная себестоимость, долларов/г | 958 | 232 | 33 | 11 |

Оценка показала, что при одинаковом объеме ферментационного оборудования себестоимость по предлагаемому варианту можно снизить в 7,4 раза (ср. варианты 2 и 3), а при увеличении объема выпуска в 10 раз (вариант 4) – в 20,6 раз. При увеличении объема выпуска БР по разработанной технологии в 10 раз снижение себестоимости составляет около 2,8. При выпуске БР по варианту 4 (612,5 кг/год) себестоимость БР за 1 мг составит около 0,3 руб. По данным зарубежных фирм каталожная цена 1 мг БР составляет ~500-5000 руб. в зависимости от чистоты продукта и объемов выпуска. Исходя из зарубежных нормативов оплаты труда с оценкой затрат по базовому варианту выпуска опытных партий БР в количестве 25-250 г/год, себестоимость БР при выпуске за рубежом может составить около 10-50 долл. США за 1 мг, а норма прибыли – от 400 до 2000%. При таком же диапазоне нормы прибыли и выпуске по разработанной технологии опытных партий БР в количестве 0,6-60 кг/год ценовой диапазон 1 мг БР с учетом коэффициента масштабирования (2,8 при уменьшении объема выпуска в 10 раз) составит ~20-100 руб. за 1 мг бактериородопсина.

Таким образом, проведенные исследования выявили возможность существенного снижения себестоимости БР. Предварительная технико-экономическая оценка показала, что получение БР (в составе пурпурных мембран) по разработанной технологии позволит снизить стоимость его с 500–5000 руб. за 1 мг (в зависимости от чистоты продукта) до 20–100 руб. за 1 мг при выпуске БР в количестве 0,6-60 кг/год с перспективой снижения стоимости БР до 0,3-1 руб. за 1 мг при организации крупномасштабного производства.

ВЫВОДЫ

- 1. Разработано аппаратурное оформление и программное обеспечение «ВіоDrome 1.0» для управляемого культивирования микроорганизмов в биореакторах. Система внедрена в РХТУ им. Д.И. Менделеева для проведения научных исследований и учебного процесса, а также в ГУП НПО «Астрофизика», ВНИИ Молочной промышленности (г. Москва).
- 2. Разработана концепция «солнечного биореактора», в котором культивирование микроорганизмов осуществляется при одновременном освещении рабочей зоны светом видимого и ультрафиолетового диапазона. На примере культивирования дрожжей *С. tropicalis* и *S. cerevisiae* показано, что такой прием позволяет повысить выход биомассы с единицы субстрата на 10-20% без ухудшения производительности биореактора.
- 3. Предложено использование пероксида водорода или УФ-облучения для подготовки предадаптированного посевного материала *S. cerevisiae* с целью улучшения физиологических характеристик культуры. При выращивании посевного материала в аэробном или микроаэрофильном режимах пероксид водорода в пассажах лучше всего вносить в предстационарной фазе роста в дозе 0,3–0,6 г/л при концентрации биомассы дрожжей 2,2–2,4 г/л в условиях освещения суспензии фоновым видимым светом.
- 4. Показаны адаптационные изменения культуры *S. cerevisiae* в пассажах при внесении пероксида водорода или воздействии УФ, которые нивелируются через определенное время после прекращения адаптационной обработки.
- 5. Отработаны варианты анаэробной ферментации дрожжей *S. cerevisiae* с использованием предадаптированного к пероксиду посевного материала, приводящие к интенсификации спиртового брожения и сокращению времени сбраживания субстрата на 30%.
- 6. Подобрана питательная среда, режимы аэрации и освещения для культивирования галобактерий с целью получения бактериородопсина. Показана необходимость учета фактора «старения» питательной среды для обеспечения стабильности роста галобактерий и синтеза бактериородопсина.
- 7. Предложен режим культивирования галобактерий с доливом питательной среды и использованием инкапсулированного адсорбента для уменьшения концентрации накапливающихся в среде ингибиторов роста, в том числе, про-

дуктов абиотического окисления. Режим позволяет получать до 1700–1750 мг/л бактериородопсина за 8 сут. культивирования при одновременном повышении стабильности процесса и минимизации содержания каротиноидов.

8. Предложен метод оценки результативности культивирования галобактерий в отношении накопления бактериородопсина. Метод основан на количественной оценке цветовой гаммы бактериальной суспензии с использованием фотосканера, включает обработку результатов и регулирование на их основе течения процесса, для чего создано программное обеспечение, интегрированное в общий пакет BioDrome 1.0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Сафронов В.В. Интенсивная малоотходная систем биодеструкции загрязнений высококонцентрированных стоков. / Диссертация на соискание степени кандидата технических наук. М: РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2004 г.
- 2. Сорокодумов С.Н. Интенсификация процессов спиртообразования и утилизации отходов спиртового производства. / Диссертация на соискание степени кандидата технических наук. М: РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2005 г.
- 3. Davies J. M. S., Lowry C. V. and Davies K. J. A. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. Archives of biochemistry and biophysics, 1995, vol. 317, issue 1, p. 1-6.
- 4. Rosenfeld E., Beauvoit B., Blondin B., Salmon J.M. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: effect on fermentation kinetics. Applied and Environmental Microbiology, 2003, vol. 69, No. 1, p. 113–121.
- 5. Rau W. Photoregulation of carotenoid biosynthesis / Eds. J.W.Porter, S.L. Spurgeon. John Willey & Son, 1983, p. 123 157.
- 6. Uytingco M.S., Parida S., Wiencek J.M. Waste stream cleanup by enzymatically-catalyzed reaction in an organic solvent. Sci. Conf. Chem. Def. Res., Aberdeen, Md, 16-19 Nov., 1993: Abstr. Dig. / US Army Edgewood Res., Dev. and Eng. Cent., 1993, p. 61.
- 7. Büyüksönmez F., Hess T.F., Crawfold R.L., et al. Optimization of simultaneous chemical and biological mineralization of perchlorethylene. Appl. And Env. Microbiol., 1999, v. 65, No 6, p. 2784-2788.
- 8. Fiorenza S., Ward C.H. Microbial adaptation to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons. J. of Ind. Microbiol. and Biotechnol., 1997, vol. 18, No 2/3, p.140-151.
- 9. Verstraete W. Limited bioavailability of organic contaminants in the environment: policy implications. In: Bioavailability of organic xebobiotics in the Environment. Practical consequences for the Environment. NATO ASI Series, 1999, vol. 64, Kluwer Academic Publishers, p. 409-428.
- 10. Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н. и др. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов. /Под ред. Н.С. Егорова. М.: Высш. шк., 1989. 688 с.
- 11. Jamieson D. J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. Journal of Bacteriology, 1992, vol. 174, issue 20, p. 6678-6681.
- 12. Lewis J.C., Learmonth R.P., Attfield P.V., Watson K. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyce cerevisiae*. J. of Ind. Microbiol. and Biotechnol., 1997, 18, No 1, p.30-36.

- 13. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Под ред. В.К. Мазурика, М.Ф. Ломанова. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004. 488 с.
- 14. Соколовский В.Ю., Белозерская Т.А. Действие стрессоров на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa*. Успехи биологической химии, 2000, т. 40, с. 85-152.
- 14a. Dröge W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiological Reviews, Vol. 82, No. 1, 2002, pp. 47-95.
 - 15. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. М.: Медицина, 2003. 136 с.
- 16. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных: Учеб. пособие. М.: Высш. шк., 2004. 549 с.
- 17. Macario E. C., Macario A. J. L. // Frontiers in Biosci, 2000, vol. 5, No 4, p. 780-786.
- 18. Brock Biology of Microorganisms /Ed. M. T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker. Illinois: Illinois University Inc, 2002, ch. 14, p. 569.
- 19. Островский Д.Н. Окислительный стресс у бактерий. 53-е Баховское чтение. М.:ИНБИ РАН, 1997. 24с.
- 20. Богдановский Г.А. Химическая экология. М.: Изд-во МГУ, 1994. 237с.
- 21. Скурлатов Ю.И., Дука Г.Г., Мизити А. Введение в экологическую химию М.: Высш. шк., 1994. 400 с.
- 22. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. М.: Мир, 2006, 504 с.
- 23. Lee S.H., Carberry J.B. Biodegradation of PCP enchanced by chemical oxidation pretreatment. Water Environ. Res. 1992, 64, p. 682-690.
- 24. Ruggiero P. Abiotic transformations of organic xenobiotics in soils: a compounding factor in the assessment of bioavailability. In: Bioavailability of organic xebobiotics in the Environment. Practical consequences for the Environment. NATO ASI Series, 1999, vol. 64, Kluwer Academic Publishers, p.159-206.
 - 25. Синельников В.Е. Проблемы чистой воды. М.: Знание, 1978. 64 с.
- 26. Синельников В.Е. Механизм самоочищения водоемов. М.: Стройиздат, 1980. 112с.
- 27. Ruiz-Dueñas F.J., Guillén F., Camarero S. et al. Regulation of Peroxidase Transcript Levels in Liquid Cultures of the Ligninolytic Fungus Pleurotus eryngii. Applied and Environmental Microbiology, 1999, Vol. 65, No. 10, p. 4458-4463.
- 28. Wood J.M. Clorinated hydrocarbons: oxidation in the biosphere. Environ. Sci. Technol., 1982, vol. 16, No 5, p.291A-297A.
- 29. Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н. Микробный синтез на основе целлюлозы: Белок и другие ценные продукты. Минск: Наука и техника, 1988. 261 с.

- 30. Hofrichter M., Scheibner K., Sack U., Fritsche W. Degradative capacities of white-rot and litter decaying fungi for persistent natural and xenobiotic compounds. In: Advances in Mashroom biology and production (R.D. Rai, B.L. Dhar, R.N. Verma eds) Proceedings of the Indian Mushroom Conference, 10-12 September 1997.
- 31. Janshekar H., Fiechter A. On the bacterial degradation of lignin. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1982, v.14, p. 147-150.
 - 32. Kirk K. Microbial degradation of lignin in soil. Arch. Microbiol., 1972.
- 33. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита. Соросовский образовательный журнал, 1999, №1, с.2-7.
- 34. Madeo F., Frohlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S.J., Wolf D.H., Frohlich K.-U. Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. –Journal of Cell Biology, 1999, vol. 145, issue 4, p. 757-767.
- 35. Singh RK, Verma NC. Effect of environmental stress on radiation response of Saccharomyces cerevisiae. Indian J Biochem Biophys, 1999 Oct; 36(5): 296-8.
- 36. Tyagi R., Srinivas G., Vyas D. et al. Differential effect of ultraviolet-B radiation on certain metabolic processes in a chromatically adapting Nostoc. Photochemistry and Photobiology, 1992, vol. 55, No 3, p. 401-407.
- 37. Girotti A.W., Lin F.B., Geiger P.G. Oxidative damage to eucaryotic membranes and potential repair systems. Abstracts of the 21st annual meeting of the American Society for Photobiology. Photochemistry and Photobiology, 1993, p. 47.
- 38. Hu M.-L., Tappel A.L. Potentiation of oxidative damage to proteins by ultraviolet-A and protection by antioxidants. Photochemistry and Photobiology, 1992, vol. 56, No 3, p. 357-363.
- 39. Fraikin G. Different mechanisms of yeast cell photoinactivation for UV-A and visible radiation. Abstracts of the 20th annual meeting of the American Society for Photobiology. Photochemistry and Photobiology, 1992, vol. 55, p. 49.
 - 40. Хочачка А., Сомеро Д. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988, 586 с.
- 41. Gressel I.B., Rau W. // Enciclopedia Plant Physiol., 1983, vol. 16, p. 604-639.
 - 42. Osherov N., May G. // FEMS Microboil. Lett, 2001. vol. 199, p. 153-160.
- 43. Pfyffer G.E./ Pfyffer B. U., Rast D. M.//Sydowia.1996. vol. 39, p. 160-201; Ballio A., Vit-torio V., Russel S. T. // Arch. Biochem. Biophys. 1964. vol. 107, p. 177-183; Hollsworth J., Magan N. // Microbiology, 1994, vol. 140, p. 2705-2713.
- 44. Gekko K., Kuwana Y., Sasaki T., Makino S.// Agric. Biol. Chem. 1991, vol. 55, No 6, p. 1663-1664.
 - 45. Феофилова Е.П. // Микробиология, 1992, т. 61, No 2, с. 387-391.
- 46. Neves M. J., Jorge J.A., Francois J. M., Terenzi H. // FEBS Lett, 1991, vol. 283, No 1, p.19-22.

- 47. Pharr D. M., Stoop J. M. H., Williamson M. E., Stufler M. O., Massei M. O., Conniking M. A. // Hort. Sci, 1995, vol. 30, No 6, p. 1182-1187.
 - 48. Ellis S. W., Grindle M., Lewis D.H. // Mycol. Res, 1991, vol. 95, p. 457-464.
 - 49. Dotsch G. A., Rast D. // Phytochemie, 1972, Bd. 11, S. 2677-2681.
- 50. Noventa-Jordai M. A., Lourdes M., Polireli T., Bonini M., Jorge J., Terenzi H. // FEBS Lett, 1996, vol. 378, p. 32-36.
- 51. Рапопорт А. И., Пузыревская О. М., Саубенова М.Г. // Микробиология, 1998, т. 57, No 2. c. 329-331.
- 52. Yakovlev A.Ya., Borovskii G.V., Voivikov V.K., Grabetrych O.I., Podezinova T.P., Antipina A.I. // Abst. Int. Symp. Plant under environmental stress. Moscow. Russia, 2001, p. 317.
- 53. Кулаева О.Н. // Энциклопедия «Современное естествознание» М.: магистр-пресс, 2000, т. 2, с. 271-279.
 - 54. Abee T., Wouters J.A. // Int. J. Food Microbiol, 1999, vol. 50, No 1-2, p. 65-91.
 - 55. Trent J.D. // Ferms Microboil. Rev, 1996, vol. 18, No 2-3, p. 249-258.
- 56. Sanders J.W., Venema G., Kok J. // FERM Rev, 1999, vol. 23, No 4, p. 483-501.
- 57. Gottersman S., Wickner S., Maurizi M.R. // Genes Dev, 1997, vol. 11, No 7, p. 815-823.
- 58. Yaglom J.A., Gabai V.L., Meriin A.B., Mosser D.D. and Sherman M.Y. The function of Hsp72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase. Activation can be dissociated from it's role in prevention of protein damage. The Journal of Biological Chemistry, 1999, vol. 274(29), p. 20223-20228.
 - 59. Graumann P., Marahiel M. // FEBS Lett, 1994, vol. 338, No 1, p. 157-160.
- 60. Goldstien J., Pollin N.S., Inouye M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, No 1, p. 283-287.
- 61. Mizushima T., Kataoka K., Ogata Y., Inoue R., Sekimizu K. // Mol. Microboil, 1997, vol. 23, No 2, p. 283-287.
 - 62. Csonka l.N. // Bacteriol. Rev, 1989, vol. 53, No 1, p. 121-147.
- 63. Litius G., Holmberg N., Bulow L. // Biotechnology, 1996, vol. 14, No 1, p. 177-180.
 - 64. Blomberg A. // FEMS Lett, 2000, vol. 182, No 1, p. 121-147.
- 65.Krantz, M., Nordlander, B., Valadi, H., Johansson, M., Gustafsson, L., Hohmann, S. Anaerobicity prepares Saccharomyces cerevisiae cells for faster adaptation to osmotic shock.. Eukaryotic Cell, 2004, vol. 3, issue 6, p. 1381-1390.
- 66.Piper P.W., Talreja K., Panaretou B., Moradas-Ferreira P., Byrne K., Praekelt U.M., Meacock P., Recnacq M. and Boucherie H. Induction of major heat-shock proteins of Saccharomyces cerevisiae, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. Microbiology, 1994, vol 140, p. 3031-3038.

- 67. Holmes J.D., Smith P.R., Evans-Gowing R. et al. Bacterial photoprotection through extracellular cadmium sulfide crystallites. Photochemistry and Photobiology, 1995, vol. 62, No 6, p. 1022-1026.
- 68. Elkins G.J., Hassett D.J., Stewart P.S., Schweizer H.P., McDermott T.R. Protective role of catalase in Pseudomonas aeruginosa biofilm resistance to hydrogen peroxide. Appl. and Environ. Microbiol., 1999, vol. 65, No.10, p. 4594-4600.
- 69. Izawa S., Inoue Y., Kimura A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic Saccharamyces cerevisiae. J. Biochem., 1996, vol. 320, p. 61-67.
- 70. Jamieson D.J., Rivers S.L., Stephen D.W.S. Analysis of Saccharamyces cerevisiae proteins induced by peroxide and superoxide stress. Microbiology, 1994, vol. 140, p. 3277-3283.
- 71. Hassan H.M., Fridovich I. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 1978, vol. 253, p. 6445-6450.
- 72. Winquist L., Rannug U., Rannug A., Ramel C. Protection from toxic and mutagenic effects of H_2O_2 by catalase induction in Salmonella typhimurium. Mutat.Res., 1984, vol. 141, p. 145-147.
- 73.Benaroudj, N., Lee, D.H., Goldberg, A.L. Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Pro-teins from Damage by Oxygen Radicals. Journal of Biological Chemistry, 2001, vol. 276, issue 26, p. 24261-24267.
- 74. Herdeiro, R.S., Pereira, M.D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A. Trehalose protects Saccharomyces cerevisiae from lipid peroxidation during oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta General Subjects, 2006, vol. 1760, issue 3, p. 340-346.
- 75. Островский Д.Н. Окислительный стресс у бактерии.53-е Баховское чтение. М.: ИНБИ РАН, 1997. 24 с.
- 76. Щипанова И.Н., Харатьян Е.Ф., Сибельдина Л.А., Огрель О.Д., Островский Д.Н. // Биохимия, 1992 т. 57, No 6, с. 862-872.
- 77. Steels, E.L., Learmonth, R.P., Watson, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. Microbiology, 1994, vol. 140, issue 3, p. 569-576.
- 78. Hengee-Aronis R. Survival of hunger and stress: the role of rpoS in Escherichia coli // Cell, 1993, vol. 72, p. 165-168.
- 79. Karyl I. Minard and Lee McAlister-Henn Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. Free Radical Biology and Medicine, 2001, vol. 31, issue 6, p. 832-843.
- 80. Storz G., Baird P.T., Toledano M.B. et. al. Regulation of hydrogen peroxide-inducible genes in bacteria. Abstracts of the 21st annual meeting of the American Society for Photobiology. Photochemistry and Photobiology, 1993, p. 47.
 - 81. Zheng M., Aslund F., Storz G. // Science, vol. 338, No 5357, p. 1718-1721.

- 82. Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L., Marinho, H.S. Decreased cellular permeability to H2O2 protects Saccharomyces cerevisiae cells in stationary phase against oxidative stress. FEBS Letters, 2004, vol. 578, issue 1-2, p. 152-155.
- 83. Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B., Labarre, J. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of biological chemistry, 1998, vol. 273, issue 35, p. 22480-22489.
- 84. Goncharuk V.V., Milyukin M.V. Evaluation of contamination level of Dnieper river basin by organic and inorganic toxicants. In: Bioavailability of organic xebobiotics in the Environment. Practical consequences for the Environment. NATO ASI Series, 1999, vol. 64, Kluwer Academic Publishers, p. 35-56.
- 85. Rahman Md. S., Bose B., Chatterjee S.N. On the induction of protective responses in Salmonella typhimurium strain TA1535/pSK1002 by UVA (365 nm). Photochemistry and Photobiology, 1995, vol. 61, No 5, p. 471-478.
 - 85а. В.К. Плакунов. Основы энзимологии. М., "Логос", 2001 –128с.
- 86. Kim Sang-Tae, Sancar A. Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. Photochemistry and Photobiology, 1993, vol. 57, No 5, p. 895-904.
- 86a. Takao M., Oikawa A., Eker A.P.M., Yasui A. Expression of Anacystis nidulans photolyase gene in Escherichia coli; functional complementation and modified action spectrum of photoreactivation. Photochemistry and Photobiology, 1989, vol. 50, No. 5, p. 633-637.
- 87. Eker A.P.M., Yajima H., Yasui A. DNA photolyase from the fungus Neurospora crassa. Purification, characterization and comparison with other photolyases. Photochemistry and Photobiology, 1994, vol. 60, No 2, p. 125-133.
- 87a. Eker A.P.M., Dekker R.H., Berends W. Photoreactivating enzyme from Streptomyces griseus IV. On the nature of the chromophoric cofactor in Streptomyces griseus photoreactivating enzyme. Photochemistry and Photobiology, 1981, vol. 33, No. 1, p. 65-72.
- 88. Uchida N., Mitani H., Shima A. Multiple effects of fluorescent light on repair of ultraviolet-induced DNA lesions in cultured goldfish cells. Photochemistry and Photobiology, 1995, vol. 61, No 1, p. 79-83.
- 89. Sancar A., Tang M.-S. Nucleotide excision repair. Photochemistry and Photobiology, 1993, vol. 57, No 5, p. 905-921.
- 90. Lu, F., Wang, Y., Bai, D., Du, L. Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress. Process biochemistry, 2005, vol. 40, issue 11, p. 3614-3618.
- 91. Hartke A., Boushe S., Laplace J-M., Benachour A., Boutibonnes PH., Auffray Ya // Arch. Microbiol, 1995, vol. 163, No 2, p. 329-336.

- 92. Воробьева Л.И., Чердынцева Т. А. Абилев С.К.// Микробиология, 1995, т. 4, No 1, с. 187-192.
- 93. Mitani H., Shima A. Induction of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase in cultured fish cells by fluorescent light and oxygen stress. Photochemistry and Photobiology, 1995, vol. 61, No 4, p. 373-377.
- 94. Fukui A., Laskowski W. Modifying factors of the cellular concentration of photolyase molecules in Saccharomyces cerevisiae cells I. Effects of temperature and light. Photochemistry and Photobiology, 1984, vol. 39, No. 5, p. 613-617.
- 95. Fukui A., Laskowski W. Modifying factors of the cellular concentration of photolyase molecules in Saccharomyces cerevisiae cells II. Effects of preillumination with light flashes. Photochemistry and Photobiology, 1984, vol. 40, No. 2, p. 227-230.
- 96. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. Киев: Наук думка, 1991. 328 с.
- 97. Авакянц С.П., Шакарова Ф.И. Биохимические и микробиологические методы исследования дрожжей и вина. М.: Наука, 1971. с. 35-39.
- 98.Schroeder W.A., Johnson E.A. // J. Gen. Microbiol, 1993, vol. 139, p. 907-909.
- 99. Schroeder W.A., Johnson E.A. Singlet oxygen and peroxyl radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. Journal of Biological Chemistry, 1995. vol. 270, No. 31, p. 18374-18379.
- 100. Jae-Cheol Jeong, In-Young Lee, Seon-Won Kim & Young-Hoon Park Stimulation of β -carotene synthesis by hydrogen peroxide in Blakeslea trispora. Biotechnology Letters, 1999 21: 683-686. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- 101. El-Sayed W.S.M.; Takaichi S.; Saida H.; Kamekura M.; Abu-Shady M.; Seki H.; Kuwabara T. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in Halobacterium salinarum, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. Plant and Cell Physiology, 2002, vol. 43, No. 4, p. 379-383.
- 102. Scott J.P., Ollis D.F. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendations. Environ. Prog. 1995, 14, p. 88-103.
- 103. Bioavalability of organic xenobiotics in the Environment. Practical consequences for the Environment.// Ed. Ph. Baveye, J.-C. Block, V.V. Goncharuk. Proceedings of the Meeting on Bioavalability of Organic Xenobiotics in the Environment. Prague, 18-29 August, 1997. NATO Advanced Study Institute, Series 2: Environment vol. 64, Kluwer Academic Publishers, 1999. 503 pp.
- 104. Nagamune T., Kurata H., Hirata M. et al. Photosensitive phenomena of nitrile hydratase of *Rhodococcus* sp. N-771. Photochemistry and Photobiology, 1990, vol. 51, No. 1, p. 87-90.

- 105. Гурвич А.Г. Принципы аналитической биологии и теории клеточных полей, М., " Наука ", 1990.
- 106. Popp F.A. Koharent electromagnetische Felder in biologischen Systemen, "Laser + Electro-Optik", 1980, 12, No 3, s. 28 32.
- 107. Казначеев В.П., Михайлова Л.П. Сверхслабые излучения в межклеточных взаимодействиях Н. " Наука ", 1981. с.144.
- 108. Казначеев В.П., Михайлова Л.П. Биоинформационная функция естественных электромагнитных полей, Н. " Наука ", 1985, с.182.
- 109. Лазеры в клинической медицине, под редакцией проф.Плетнева С.Д., М. "Медицина", 1981, с.399.
- 110. Webb S.J., Nutrition, Coherent Oscillations and Solitary Waves. The Control of in vivo Events in Time and Space and Relationship to Disease, "IRCS Med Sci "11/1983,p. 483-488.
- 111. Голант М.Б., О проблеме резонансного действия когерентных электромагнитных излучений миллиметрового диапазона волн на живые организмы, "Биофизика", 1989, т. XXXIY, N 2, с. 339-348.
- 112. Голант М.Б., "Резонансное действие когерентных элект-ромагнитных излучений миллиметрового диапазона волн на живые организмы, "Биофизика "1989, т XXXIY, вып. 6, с. 1004 1014.
- 113. Девятков Н.Д., Гельвич Э.А., Голант М.Б., Реброва Т.Б., Севастьянова Л.А., Радиофизические аспекты использования в медицине энергетических и информационных воздействий электромагнтиных колебаний, "Электроника СВЧ ", 1981, вып.9 (333), с. 43-50.
- 114. Attfield P.V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. Nature Biotechnology, 1997, vol. 15, issue 13, p. 1351-1357.
- 115. Северина Л.О., Пименов Н.В., Плакунов В.К.// Микробиология. 1985, 54, вып. 1, 5-10.
- 116. Гусев М.В., Гохлернер Г.Б.// Вестник МГУ, серия 16 "Биология". 1983, 11, No 1, c. 29-34.
- 117. Северина Л.О., Пименов Н.В., Плакунов В.К.// Микробиология. 1985, 54, вып. 2, 197-202.
- 118. Скулачев В.П.// Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации. Пущино, 1985, 7-14.
- 119. Абдулаев Н.Г., Киселев А.В., Овчинников Ю.А. и др.// Биологические мембраны. 1985, 2, N 5, 453-459.
- 120. Лобырева Л.Б., Фельдман Р.С., Плакунов В.К.// Микробиология. 1987, No 56, вып. 1, с. 16-20.
- 121. Лобырева Л.Б., Фельдман Р.С., Плакунов В.К.// Микробиология. 1987, No 56, вып. 2, с. 189-193.

- 122. Синещеков В.А., Литвин Ф.Ф. // Биофизика. 1987, XXXII, вып. 3, с. 540-553.
- 123. Тарасов А.Л., Звягинцева И.С. Лысенко А.М. // Микробиология. 1987, 56, вып. 6. с. 342-398.
- 124. Oesterhelt D., Krippahl G.// Febs letters. North-Holland Publishing Company Amsterdam. October 1973, vol. 36, No 1, p. 72-76.
- 125. Mukohata Y., Sugiyama Y. Isolation of the white membrane of crystalline bacterio-opsin from Halobacterium halobium R1mW lacking carotenoid. Methods in Enzymology, 1982, vol. 88, p. 407-411.
- 126. Bayley S.T., Morton R.A. // Strategies of microbial life in extreme environments, ed. M. Shilo. Berlin, 1979, p. 109-124.
- 127. Belozersky A.M., Spirin A.S. // The nucleic acids, ed. M. Chargraff, J.N. Davidson. 1960, vol 3, p. 147.
 - 128. Boring J., Kushner D.J., Gibbons N.E. // Can. J. Microbiol., 1963, vol. 9, p.143.
- 129. Baryshev V.A., Glagolev A.N., Skulachev V.P. // Nature, 1981, vol. 292, p. 338-340.
- 130. Brown K.J., Gibbons N.E. The effect of magnesium, potassium and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. Canad.J.Microblol., 1955, vol. 1, p. 486-494.
- 131. Hartmann R., Sickenger H.-D., Oesterhelt D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, vol. 77, p. 3821-3825.
 - 132. Stoeckenius W., Rowen R. // J. Cell. Biol., 1967, vol. 34, p. 365-392.
- 133. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука, 1988. 241 с.
- 134. Sies H., Stahl W. and Sundquist A.R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, vol 669, Issue 1, p. 7-20.
- 135. Krinsky N. I. The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998, vol. 854, p. 443-447.
- 136. Krinsky N.I. // Free radicals, oxidative stress, and antioxidants / Ed. T. Ozben. N. Y.: Plenum Press, 1998. p. 323-332.
- 137. Hurst J.S., Jin G.–F., Saini M., Awasthi Y.C., van Kuijk F.J. G. M. Toxicity of carotenoid oxidative breakdown products to cultured human retinal pigmented epithelial cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2004, 45, p. 1297-B108.
- 138. Danon A., Stoeckenius W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, vol. 71, p. 1234-1238.
 - 139. Oesterhelt D. and Stoeckenius W. Nature New. Biol., 1971, 223, p. 149-152.
- 140. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. In: Meth-

- ods In enzymology (ed. S. Fleisher, L.Packer, D.W.Ecta), NY-L-Melbourne, Acad.Press, 1974, v. XXXI, Biomembranes, Part A, p.667-678.
- 141. Миронова Е.В. Биосинтетическое получение аналогов бактериородопсина. / Диссертация на соискание степени кандидата химических наук. М: МГАТХТ им. М.В. Ломоносова, 2002 г.
- 142. Gibbons N.E. // Proc. 2nd Int. Sympos. Food. Microbiol. H.M. Stat. Office, London, 1958, 69.
 - 143. Kushwaha S.C., Kates M. // Can. J. Biochem., 1976, vol. 54, p. 824-829.
- 144. Sumper M., Reitmeier W., Oesterhelt D. Biosynthesis of the Purple Membrane of Halobacteria. Angew. Chemie, Intern. Ed. Engl., 1976, vol. 15, p. 187-194.
 - 145. Hartmann R., Oesterhelt D.// Eur. Biochem, 1977, vol 77, p. 325-335.
- 146. Скулачев В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. М. 1989.
- 147. Luecke H., Richter H.T., Lanyi J.K. Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. Science, 1998, vol. 280, No 5371, p. 1934-1937.
- 147a. Haupts U., Tittor J., Oesterhelt D. Closing on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct, 1999, vol. 28, p. 367–399.
 - 148. Harold F. M.// Bacteriol. Rev. 1972, vol. 36, p. 172.
- 149. Onishi H., McCance M.E., Gibbons N.E. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria. Canad. J. Microbiol., 1965, vol 11, p. 365-373.
 - 150. Sumper M.// Method in enzimology. 1982, vol. 88, part 1, p. 391-395.
 - 151. Kushwaha S.C., Kates M. // Can. J. Biochem. 1974, vol. 54, p. 824-839.
- 152. Larsen, H. Biochemical aspects of extreme halophilism," Advances in Microbial Physiology, vol. 1, p. 97-132.
- 153. Dundas I.D., Srinivasan V.R., Halvorsson, H.O. A chemically defined medium for Halobacterium Salinarium strain 1. Canadian Journal of Microbiology, 1963, 9, p. 619-625.
- 154. Rogers P.J., Morris C.A. Regulation of bacteriorhodopsin synthesis by growth rate in continuous culture of Halobacterium halobium. Arch. Microbiol., 1978, vol. 119, p. 323-325.
- 155. Gochnauer M.B., Kushner, D.J. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. Canad. J. Microbiol., 1969, 15, p. 1157-1165.
- 156. Weber H.J., Sarma S., Leighton T. The Halobacterium group: Microbiological methods. Method in enzymol.; 1982, vol.88, p.369-373.
- 157. Grey V.L., Fitt P.S. An improved synthetic growth medium for Halobacterium cutirubrum. Can.J.Microbiol., 1976, vol. 22, No 3, p. 440-442.
- 158. Shehgal S.N., Gibbons N.E. Effect of some metal ions on the growth of Halobacterium cutirubrum. Can. J. Microbiol., 1960, vol. 6, p. 165-169.

- 159. Oesterhelt D., Meentam, Schuhman L. Reversible dissociation of the purple complex. Eur.J.Biochem., 1973, 40, p.453-463.
 - 160. Lanyi J.K. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1460, p. 1-3.
- 161. Renugopalakrishnan V., Strzelczyk A., Li Pingzou, Mokhnatyuk A.A., Gursahani Sachin H., Nagaraju Mahesh, Prabhakaran M., Arjomandi H., Lakka Shoba L. Retroengineering bacteriorhodopsins: Design of smart proteins by bionanotechnology. International Journal of Quantum Chemistry, 2003, vol. 95 (4-5), p. 627-631.
- 162. Birge R.R. Photophysics and Molecular Electronic Applications of the Rhodopsins. Annual Review of Physical Chemistry, 1990, vol. 41, p. 683 -733.
- 163. Wu P., Kimball D.R. and B.R, Nakashima M., and DeCristofano B. Enhancement of photoinduced anisotropy and all-optical switching in Bacteriorhodopsin films. Appl. Phys. Lett., 2002, vol. 81, p. 3888–3890.
- 164. Seitz A. and Hampp N. Kinetic optimization of bacteriorhodopsin films for holographic interferometry. J. Phys. Chem, 2000, vol. 104, p. 7183–7192.
- 165. Skladnev D.A., Egorova T.A. Stable isotopes labeled bacteriorhodopsin for computers. Тезисы VII Международной конференции по ретинальсодержащим белкам. Зихрон Яков (Израиль), 1997, с. 207.
- 166. Mironova E.V., Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Demina O.V., Skladnev D.A., Khitrina L.V., Grebennikov E.P., Adamov G.E., Khodonov A.A. Preparation of bacteriorhodopsin analogs with modified polypeptide and chromophoric parts. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2002: Fundamentals & Applications", 2002, RF, Moscow, c. 115-116.
- 167. Г.Е. Адамов, Л.Н.Гнатюк, И.С. Голдобин, Е.П. Гребенников, А.Г.Девятков, Д.А. Складнев "Материалы на основе бактериородопсина как основа реверсивных сред для динамической голографии", Материалы IX Международной научно-технической конференции "Высокие технологии в промышленности России (материалы и устройства электронной техники", 2003, с. 114-119.
- 168. Г.Е. Адамов, Л.Н. Гнатюк, И.С. Голдобин, Е.П. Гребенников, А.Г. Девятков, А.А. Ходонов, Д.А. Складнев "Исследование фотохромных свойств суспензий и пленок бактериородопсиов с модифицированной хромофорной частью для использования в устройствах оптической обработки информации", Материалы I Межрегионального семинара "Нанотехнологии и фотонные кристаллы", 2003, с. 166-177.
- 169. Oesterhelt D. and Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fraction into red and purple membrane. Methods Enzymology. 31, p. 667–678 (1974).
- 170. Gropp F., Betlach M. C. The bat gene of Halobacterium halobium encodes a trans-acting oxygen inducibility factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., June 1994, vol. 91, p. 5475-5479.

- 171. Sang Yup Lee, Ho Nam Chang, Young Soon Um, and Soon Ho Hong Bacteriorhodopsin production by cell recycle culture of Halobacterium halobium. Biotechnology Letters, August 1998, vol. 20, No 8, p. 763–765.
- 172. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток: Пер. с англ. М.: Мир, 1978.
 - 173. Шлегель Г. Общая микробиология: Пер. с нем. М.: Мир, 1987. 567 с.
 - 174. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978, 464 с.
- 175. Удаление токсичных продуктов из организма методом гемосорбции в клинике и эксперименте. Труды 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова. М.: 1974, т. 31, вып. 1.
 - 176. Швайкова М.Д Токсикологическая химия. М.: Медицина, 1975.
- 177. Артюшин Л.Ф. Основы воспроизведения цвета в фотографии, кино и полиграфии. М.: Искусство, 1970. 548 с.
- 178. Фейнман Р., Лейтон Р., Сэндс М. Фейнмановские лекции по физике. Вып. 3: Излучение. Волны. Кванты: Пер. с англ. / Под ред. Смородинского Я.А. Изд. 4-е, испр. М.: Едиториал УРСС, 2004. 240 с.
- 179. Симонович С.В., Евсеев Г.А., Мураховский В.И., Бобровский С.И. Информатика базовый курс. СПб.: Питер, 2001. 640 с.
- 180. Петровский А.И. Photoshop 6. Трюки в дизайне изображений. СПб: Майор, 2001. 176 с.
- 181. Schutten R.J., de Haan G., van Roermund A.H. M. Noise filtering for television receivers with reduced memory. Proc. of the Int. Workshop on HDTV and the Evolution of Television, Taipei, Taiwan, Nov. 1995, p. 6A15--6A22.
- 182. Рыбаков М. Фотошопинг. Как управиться с цветом. Upgrade Special. Цифровая фотография, февраль 2005, #14 (2), с. 56-65.
- 183. Stone M.C., Cowan W.B., and Beatty J.C., Color gamut mapping and the printing of digital color images. ACM TOG, Oct. 1988, 3 (7), p. 249-292.
- 184. Tumblin J., Rushmeier H. Tone reproduction for realistic images, IEEE Computer Graphics & Applications, November 1993, 13 (6), p. 42-48.
- 185. Ракитин В.И., Первушин В.Е. Практическое руководство по методам вычислений с приложением программ для персональных компьютеров: Учеб. пособие. М. Высш. шк., 1998. 383 с.
- 186. Загидуллин Р.Ш. LabView в исследованиях и разработках. М.: Горячая линия-Телеком, 2005. 352 с.
- 187. Круглински Д., Уингоу С., Шеферд Дж. Программирование на Microsoft Visual С++ для профессионалов. СПб.: Питер, 2001. 864 с.