РАЗДЕЛ XIII. БИОЛОГИЯ

Петрухина Д.И., Лыков И.Н.

Исследование жизнеспособности *Kluyveromyces marxianus* после низкотемпературного хранения

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
(Россия, Калуга)

doi 10.18411/scc-30-09-2017-24

idsp 000001:scc-30-09-2017-24

Аннотация

Исследовано влияние низкой температуры (-20°C) на жизнеспособность клеток *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 при хранении концентрированной дрожжевой биомассы в течение двух месяцев. Оценку жизнеспособности клеток до и после хранения осуществляли окрашиванием метиленовым синим с последующим подсчетом живых и мертвых клеток в счетной камере. Установлен высокий процент живых клеток *Kluyveromyces marxianus* после хранения при температуре -20°C у культур, полученных из биореактора в сравнении с культурами, выращенными на плотной питательной среде.

Ключевые слова: *Kluyveromyces marxianus*, низкотемпературное хранение, молочная сыворотка, биоэтанол

Abstract

Influence of low temperature (-20°C) on *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 viability under two month concentrated yeast biomass storage is investigated. Cell viability estimation before and after storage is done via staining with methylene blue followed by counting living and dead cells in a counting chamber. *Kluyveromyces marxianus* grown in the bioreactor under storage condition below -20°C showed higher living cell count than the control grown on agar plates.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, low temperature storage, whey, bio-ethanol

Введение

Штамм *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 относится к дрожжевым микроорганизмам, которые способны сбраживать лактозу молочной сыворотки, являющейся основным побочным продуктом процесса переработки молочного сырья (Храмцов, 2011). Молочная сыворотка в настоящее время практически не находит применения. Частично молочную сыворотку используют в качестве корма для скота, а основное количество молочной сыворотки сливают в канализацию. Из-за высокой химической и биологической потребности в кислороде (50 г/л и 80 г/л соответственно) очистка такой сточной воды требует значительных финансовых затрат (Ozmihi, Kargi, 2007). В то же время высокое содержание углеводов, особенно лактозы, позволяет использовать молочную сыворотку в качестве ценного сырья для производства биоэтанола.

Для обеспечения бесперебойного функционирования анаэробной ферментации при получении этанола необходимо постоянное наличие биомассы *Kluyveromyces marxianus*, которая после низкотемпературного хранения имела бы высокий процент жизнеспособных клеток.

Материалы и методы

В работе использовали дрожжи *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ).

Для выращивания биомассы дрожжей в аэробном биореакторе использовали кислую молочную сыворотку с pH= 4,40-4,46, содержащую: лактозу 150-151 г/л, L-лактат 24,5-26,5 г/л, этанол 0,1 г/л, аммонийный азот 0,25-0,32 г/л, ортофосфатный фосфор 1,99-2,10 г/л. В сыворотку дополнительно добавляли 4 мл/л раствора, содержащего 0,84 г/л $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,70 г/л H_3BO_3 , 0,79 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,45 г/л $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,53 г/л KI, 15,0 г/л NH_4Cl , 2,0 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20,1 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22,7 мг/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,1 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4,9 мг/л $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

В эксперименте использовали одолитровый аэробный биореактор, снабженный датчиками pO_2 , pH, температуры, а также контроллером для регулирования потока подаваемого в реактор воздуха, очищенного от воды и углекислого газа. Скорость аэрация составляла 50 нл/ч. Значение pH поддерживали в диапазоне 4-6 за счет автоматической подачи насосом из резервуаров двумолярного раствора гидроксида калия или одномолярного раствора серной кислоты. Для удержания испаряемой воды применяли обратный холодильник из стекла длиной 40 см. Объем питательной среды в биореакторе составлял 600 мл, а скорость перемешивания – 1200 оборотов в минуту.

Биомассу дрожжей, выросшей в биореакторе, переносили в стерильных условиях в пробирки типа Эппендорф и суспендировали в 2 мл буферного раствора. Для приготовления буферного раствора в 1 л деионизированной воды растворяли: 0,16 г/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,198 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8,19 г/л NaCl. Суспензию дрожжевой биомассы центрифугировали в течение 3 минут при 6000 оборотах в минуту, удаляли супернатант и промывали осадок 1 мл буферного раствора. Затем отбирали 100 мкл суспензии, прибавляли 10 мкл красителя метиленового синего и тщательного перемешивали. Проводили подсчет живых и мертвых клеток под микроскопом в счетной камере Горяева. Остаток пробы центрифугировали течение 3 мин при 6000 оборотов в минуту, удаляли супернатант и замораживали при температуре -20°C . После размораживания вновь проводили определение количества живых и мертвых клеток.

Аналогичным образом исследовали клеточную суспензию, выращенную в чашках Петри с селективным агаром YGC с хлорамфениколом, для установления различий между поверхностными и погруженными культурами дрожжей.

Далее проводили масштабирование процесса. Для этого использовали 1 литр биомассы *Kluveromyces marxianus*, выращенной в биореакторе. Дрожжевую биомассу в стерильных условиях переносили в 25 флаконов (емк. 50 мл) с завинчивающейся крышкой по 40 мл в каждый. Флаконы центрифугировали в течение 3 мин при 6000 оборотах в минуту, удаляли супернатант, промывали стерильным буферным раствором, вновь центрифугировали и удаляли супернатант. Суспензию замораживали и хранили при -20°C .

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что суспендирование дрожжевой биомассы в буферном растворе более благоприятно сказывается на жизнеспособности *Kluveromyces marxianus*, выросшей на плотной питательной среде, чем суспендирование в деионизированной воде. И до замораживания и после процент живых клеток *Kluveromyces marxianus*, суспендированных в буферном растворе был выше (табл. 1).

Таблица 1

Жизнеспособных клеток Kluveromyces marxianus, выросших на плотной питательной среде, до и после замораживания

Время проверки	Суспензионная среда	Живые клетки, %	Мертвые клетки, %
До замораживания	Деионизированная вода	$56,8 \pm 2,9$	$43,2 \pm 2,6$
	Буферный раствор	$75,3 \pm 1,7$	$24,7 \pm 1,8$
После замораживания	Деионизированная вода	$56,6 \pm 0,9$	$43,4 \pm 0,9$
	Буферный раствор	$57,1 \pm 1,8$	$42,9 \pm 1,6$

Процедура замораживания и оттаивания влияла значительно меньше на клетки из суспензии, выращенной в биореакторе, после их последующей обработки буферным раствором (табл. 2).

Таблица 2

Жизнеспособность клеток Kluyveromyces marxianus из погруженной культуры биореактора до и после замораживания в объеме 1 мл

Время проверки	Суспензионная среда	Живые клетки, %	Мертвые клетки, %
До замораживания	Буферный раствор	99,1 ± 0,4	0,9 ± 0,07
После замораживания	Буферный раствор	99,3 ± 0,1	0,7 ± 0,05

Это можно объяснить тем, что после центрифугирования биомассы *Kluyveromyces marxianus*, выращенной в биореакторе, в ней присутствовали остатки компонентов питательной среды. Кроме того, промывка клеточной суспензии буферным раствором снижала лизис клеток из-за более низкого осмотического давления, в отличие от образцов клеток, выращенных на плотной среде.

Увеличение объема замороженной биомассы до 40 мл, приводило к снижению выживаемости клеток дрожжей (табл. 3).

Таблица 3

Жизнеспособность клеток Kluyveromyces marxianus из погруженной культуры до и после замораживания в объеме 40 мл

Время проверки	Суспензионная среда	Живые клетки, %	Мертвые клетки, %
До замораживания	Буферный раствор	90,1 ± 1,1	9,9 ± 0,1
После замораживания	Буферный раствор	67,5 ± 0,9	32,5 ± 0,06

Это связано, вероятно, с тем, что при малых объемах биомассы замораживание происходит быстрее с наименьшим повреждением дрожжевых клеток. В то же время замораживание биомассы большего объема требует большего времени, что способствует образованию более крупных кристаллов льда, повреждающих дрожжевые клетки.

Заключение

Полученный высокий процент живых клеток *Kluyveromyces marxianus* после обработки и хранения с температурой -20°C указывает на целесообразность предлагаемой процедуры для сохранения достаточной биомассы для осуществления второго этапа производства биоэтанола -анаэробной ферментации лактозы молочной сыворотки.

1. Храмцов, А.Г. Феномен молочной сыворотки: монография / А.Г.Храмцов. - СПб.: Профессия, 2011. - 804 с.
2. Ozmihci, S. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations / Serpil Ozmihci, Fikret Kargi, // Bioresource Technology, Volume 98, Issue 16, 2007, Pages 2978-2984, ISSN 0960-8524, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.005>.

Ларькина Н.И., Костюкова С.В.

Особенности межвидовой гибридизации на плазме *Nicotiana tabacum* Lin.♀

Всероссийский научно-исследовательский институт табака, махорки и табачных изделий (Россия, Краснодар)

doi 10.18411/scc-30-09-2017-25

idsp 000001:scc-30-09-2017-25

Межвидовая гибридизация – один из ведущих методов переделки наследственной природы растений. Она сыграла значительную роль в происхождении многих сельскохозяйственных культур и занимала важное место в селекции табака, способствуя созданию принципиально новых, ценных форм, так как некоторые