

М. А. ТЕР-КАРАПЕТЯН, А. А. ЭЛИАЗЯН

ОСОБЕННОСТИ ПРОНИКНОВЕНИЯ И НАКОПЛЕНИЯ D-КСИЛОЗЫ И L-АРАБИНОЗЫ В ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТКАХ

Транспорт метаболитов через оболочку клеток считается первоначальным и важным этапом обмена веществ. Мембранный транспорт углеводов изучается с точки зрения зависимости проникновения и уровня накопления в клетках от структурных особенностей сахаров, от способности дрожжей усваивать или сбраживать разные сахара, от ряда физико-химических и биологических факторов, участвующих в процессе проникновения.

Исследованиями последних лет установлено, что транспорт сахароз происходит независимо от их сбраживаемости и усваиваемости и не требует предварительного фосфорилирования [3—5, 8—11].

На основании этих работ выдвинута гипотеза о наличии в мембране подвижного переносчика (carrier) с высокой специфичностью по отношению к структурным и оптическим изомерам сахаров [6]. Имеются также некоторые факты, указывающие на то, что накопление различных сахаров в дрожжевых клетках определенно зависит от их видовых и внутривидовых особенностей [7]. Однако этот вопрос еще систематически не исследован. С некоторой подробностью изучено влияние ряда факторов внешней среды (рН, концентрация субстрата, температура и др.) на проницаемость дрожжей к сахарам. При этом выявление узких оптимальных зон подкрепляет гипотезу о биологической природе транспортных систем (активный перенос), тем не менее эти факты не отрицают участия и физико-химических факторов (диффузия и др.) в процессах проницаемости (пассивный перенос).

В исследованиях последних лет основное внимание было сосредоточено на сахарах не сбраживаемых и не усваиваемых испытуемыми дрожжами, однако не меньшего внимания заслуживает и изучение особенностей проникновения и накопления усваиваемых сахаров. Вопрос этот представляет особый интерес в отношении пентоз, так как их медленное включение в метаболические пути дает возможность исследователю подробно изучить и выявить механизм первичных этапов проникновения и усвоения.

В настоящей работе приведены результаты исследований по проникновению и накоплению D-ксилозы и L-арабинозы у трех представителей дрожжей рода *Candida*—*C. guilliermondii* № 71, хорошо усваивающей обе пентозы, *C. tropicalis* K3-10, хорошо усваивающей только ксилозу, а не арабинозу и *C. chevalieri* № 66, который не усваивает ни ту, ни другую из этих пентоз.

Сравнительное изучение проницаемости дрожжей к пентозам даст возможность выяснить, во-первых, в какой степени скорость проникновения и уровень накопления пентоз в клетках зависит от их усваиваемости, во-вторых, в какой степени медленный темп роста дрожжей в присутствии пентоз зависит от динамики их проникновения.

Методика. Посевной материал приготавливался путем выращивания дрожжей в синтетической минеральной среде следующего состава: D-глюкоза—10 г, KH_2PO_4 —1,23 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —3,12 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,625 г, NaCl —0,125 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —0,125 г, биотин—8 мкг на один литр водопроводной воды.

Полученная биомасса использовалась после голодания по нижеуказанной технике. Опыты по проницаемости проводились с суспензией дрожжей (в порядке 50—90 мг сухого вещества в 1 мл) в смеси фосфатного буфера М/10 и раствора NaCl М/15 (V/V 4 : 1), содержащего 1% из соответствующей пентозы. рН суспензии—5,5, температура при инкубировании—30°C. Пробы, взятые в разные интервалы в течение 1—12 час., быстро центрифугировались, промывались охлажденным раствором NaCl М/15 [3]. Отмытые клетки экстрагировались 80% этанолом при $t^\circ=70$ —80°C в течение 40 мин. Экстракт отделялся от дрожжевых клеток и подвергался анализу методом хроматографии на бумаге. После проявления раствором анилинфталата пятна пентоз элюировались и определялись фотометрически [1].

Экспериментальная часть

Влияние степени голодания клеток на проникновение пентоз. Биомасса испытуемых дрожжей использовалась в конце цикла роста или непосредственно, или после голодания. Голодание проводилось путем инкубирования в 2%-м растворе глюкозы до ее полного расхода (40—44 час.) и последующей выдержкой в воде с аэрированием суспензии в течение 15 час. при 30°C; при этих условиях получают клетки с низким содержанием азота (2,5—3% от абсолютно сухих дрожжей) и запасных углеводов.

Результаты опытов, продолжительностью до 5 час. (рис. 1), показывают, что скорость проникновения и накопления ксилозы в клетках намного выше у голодавших клеток. Медленное накопление ксилозы у неголодавших клеток объясняется наличием в них углеводных запасов (гликоген и т. п.), что до некоторой степени задерживает включение ксилозы в реакции распада и усвоения.

Проникновение пентоз у пентозоусваивающей культуры *C. guilliermondii*. Результаты опытов (табл. 1, рис. 2) показывают, что проникновение и накопление ксилозы и арабинозы в клетках отличаются как по скорости, так и по уровню.

Значительное накопление ксилозы наблюдается уже к 1 час. инкубирования и достигает максимального значения в интервале 1—3 час., затем по мере ее включения в процессы обмена уровень ксилозы резко

1 ч. 3 2 4 5
неголодавшая культура

1 2 3 4 5
голодавшая культура

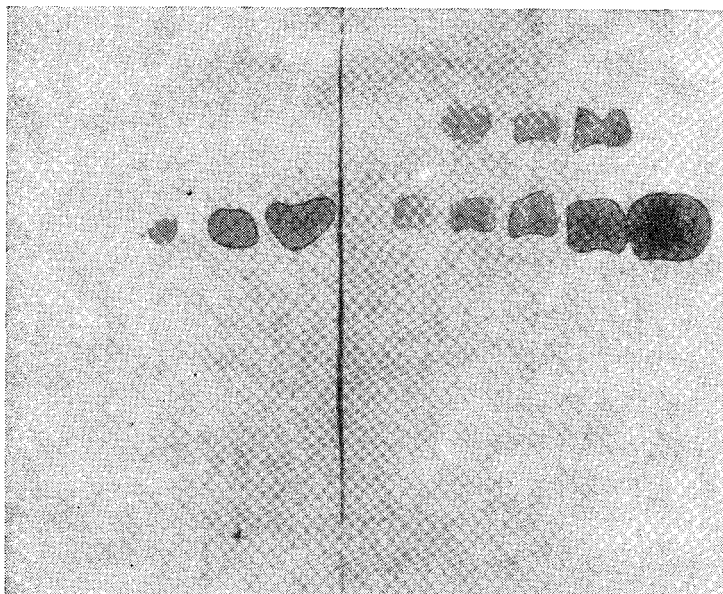


Рис. 1. Динамика проникновения D-ксилозы в неголодавшие и голодавшие клетки *C. guilliermondii*.

Таблица 1

Динамика накопления D-ксилозы и L-арабинозы в клетках *C. guilliermondii*.

Количество инкубированных дрожжей: I опыт — 87 мг, II опыт — 67 мг

Продолжительность инкубирования час.	Накопление в клетках пентозы в мг на 100 мг сухих веществ дрожжей			
	ксилоза		арабиноза	
	I опыт	II опыт	I опыт	II опыт
1/2	1,12	—	0,12	—
1	1,81	1,80	0,26	0
2	1,72	—	0,30	—
3	1,60	1,73	0,38	0,14
4	1,38	—	—	—
5	1,12	0,60	0,60	0,48
6	0,91	—	0,69	—
7	0,68	0,12	0,70	0,60
8	0,44	—	0,77	—
12	—	—	—	0,14

падает. Накопление арабинозы начинается в интервале 1—3 час. после начала инкубирования, максимальный уровень ее достигает к 5—7 час.

Скорость накопления пентоз в клетках, подсчитанная в мкг в интервале максимального проникновения в течение 1 час. в 1 мг сухого ве-

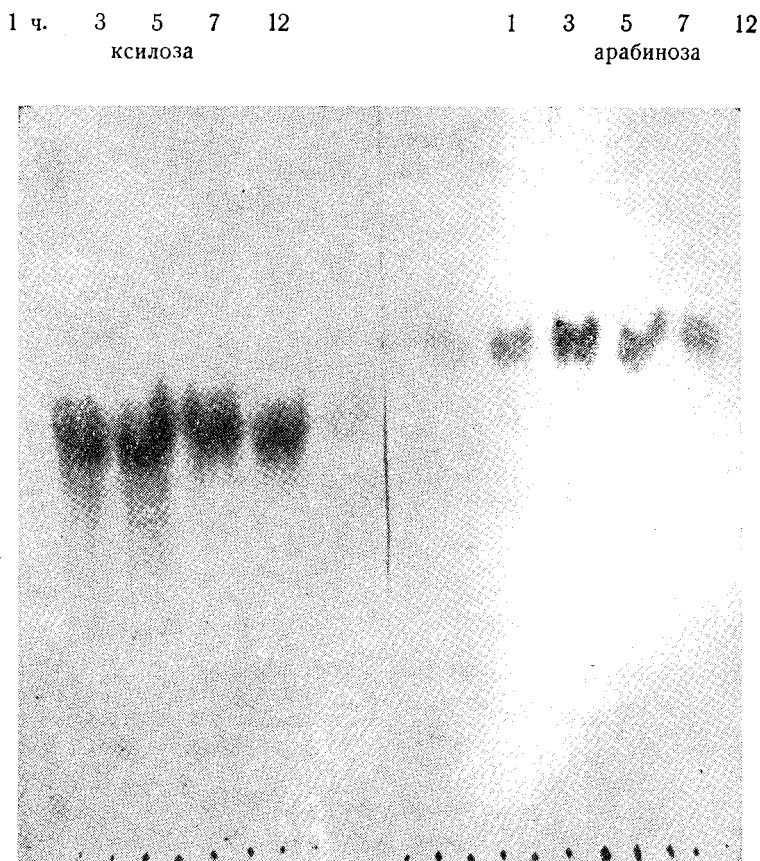


Рис. 2. Динамика проникновения пентоз в клетки *C. guilliermondii*.

щества дрожжей, равна для ксилозы 3,0 мкг, арабинозы—0,6 мкг, т. е. в 5 раз меньше.

Максимальный уровень накопления пентоз в клетках, подсчитанный в мг в 100 мг сухой дрожжевой массы, равен для ксилозы 1,8 мг, арабинозы—0,6—0,7 мг, т. е. около 2,5—3 раза меньше.

Изучение состояния биомассы дрожжей в течение опытов показало, что количество биомассы в начале инкубирования мало меняется, а после определенного промежутка времени (около 3 час. в присутствии ксилозы, 5 час. в присутствии арабинозы) биомасса постепенно нарастает, что совпадает со снижением концентрации пентоз в клетках (рис. 3). Таким образом, в начале инкубирования, когда еще не наступило интенсивное включение исследуемых сахаров в процессы обмена, уровень их накопления фактически соответствует степени проникновения, в то время как после интенсивного роста биомассы уровень накопления соответствует разнице между количествами проникшей и включившейся пентозы. По всей вероятности, одной из основных причин медленного роста дрожжей в присутствии ксилозы и арабинозы является низкая скорость их проникновения в клетки.

Проникновение пентоз у пентозонеусваивающих культур. Приведенные на рис. 4 данные показывают, что обе исследуемые пентозы проникают и накапливаются в клетках *C. chevalieri* в такой же степени, как у культуры *C. guilliermondii*.

У музейной культуры *C. tropicalis* КЗ-10, хорошо усваивающей

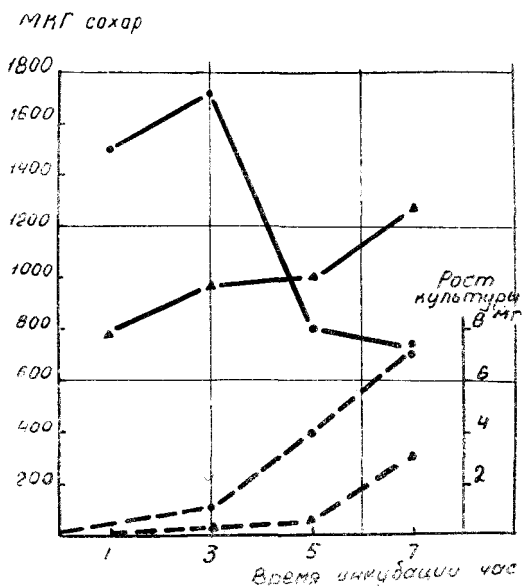


Рис. 3. Динамика проникновения пентоз и накопления биомассы у *C. guilliermondii*.

Исх. 1 ч. 2 3 4
D-ксилоза

1 2 3 4
L-арабиноза

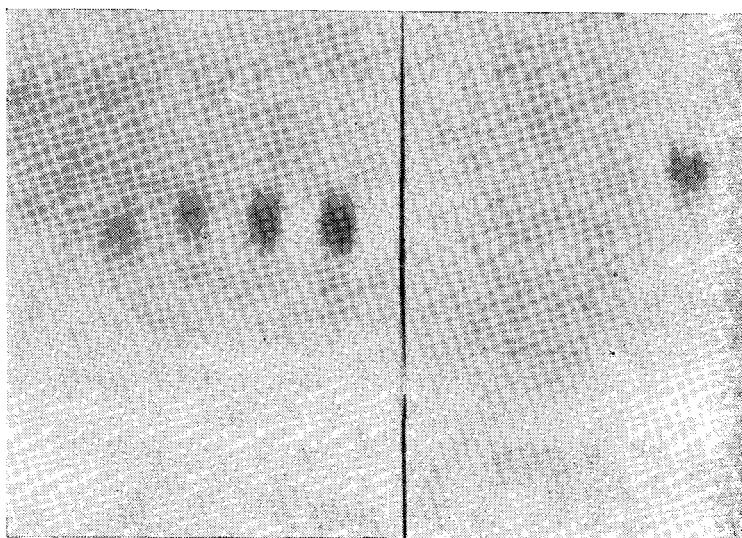


Рис. 4. Динамика проникновения пентоз в клетки *C. chevalieri*.

Д-ксилозу, неусваиваемая арабиноза* проникает довольно интенсивно и накапливается на высоком уровне (табл. 2), превышающем даже уровень ксилозы у *C. guilliermondii*.

Таблица 2

Динамика накопления L-арабинозы в клетках *C. tropicalis* КЗ-10.

Количество инкубированных дрожжей 54 мг

Время инкубирования в час.	30 мин.	1	2	3	4	5	6	7
Арабиноза в мг на 100 мг сухих веществ дрожжей	—	—	—	2,27	3,33	3,61	5,0	4,9

Проникновение пентоз, по полученным данным, не находится в прямой зависимости от их усваиваемости. Такие факты установлены также и в ранних исследованиях, проведенных на дрожжах рода *Saccharomyces* [3].

Влияние монойодуксусной кислоты на проникновение пентоз. Объектом исследования служила культура *C. tropicalis* КЗ-10, а субстратом L-арабиноза. Данные, приведенные на рис. 5, показывают, что йодуксусная кислота в концентрации 10^{-3} М полностью угнетает проникновение арабинозы в течение 3-х час. инкубирования. Такой факт указывает на возможное участие дыхательных процессов в проникновении арабинозы в дрожжевые клетки, что подкрепляет гипотезу об активном переносе сахаров.

Обсуждение результатов. Проводимые с дрожжами рода *Candida* исследования выявили ряд особенностей проникновения и накопления пентоз.

С методической точки зрения важным является выявление влияния голодания клеток на степень накопления пентоз в дрожжевых клетках [9]. Однако полученные на *Sacch. cerevisiae* раса XII данные по существу противоречат вышеприведенным (рис. 1), так как в отличие от *C. guilliermondii* и *Sacch. cerevisiae* при голодании уменьшается внутриклеточное «пространство» ксилозы.

Полученные данные на дрожжах рода *Candida* являются новыми фактами, еще раз подтвердившими окончательно не установившееся мнение о том, что прямой зависимости между свойством усвоения и уровнем накопления пентоз в дрожжевых клетках не существует. Для исследуемых культур *C. guilliermondii* и *C. chevalieri* они установили четкую специфичность скорости проникновения и уровня накопления Д-ксилозы и L-арабинозы: ксилоза проникает намного быстрее и по сравнению с арабинозой накапливается на более высоком уровне. В наших опытах накопление пентоз в клетках *C. guilliermondii*, усваивающей пентозы, не достигает состояния равновесия, сначала повышается, затем в процессе синтеза биомассы падает, так как проникающая пентоза полностью включается в биосинтетические процессы клетки. Несмотря

* Арабиноза усваивается данной культурой только после предварительного адаптирования [2].

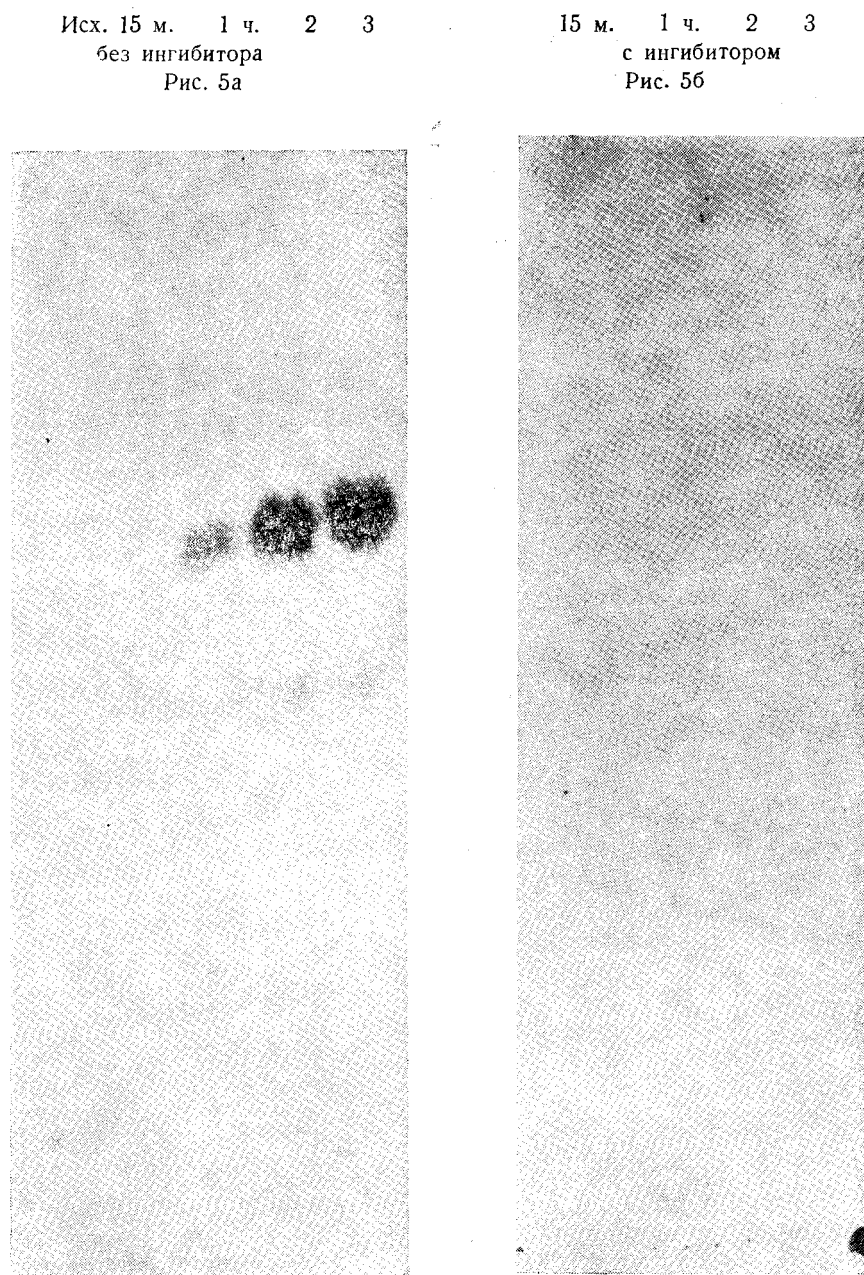


Рис. 5. Влияние ингибитора на проникновение L-арабинозы у неадаптированной культуры *C. tropicalis* K3—10.

на имеющиеся в литературе [3] указания о том, что ингибиторы углеводного обмена не влияют на проникновение сахара, в вышеприведенных опытах монойодуксусная кислота полностью тормозила проникновение арабинозы.

В ы в о д ы

1. Прямой зависимости между усвоением и накоплением пентоз в дрожжевых клетках не обнаружено.

2. Скорость проникновения и уровень накопления D-ксилозы превышает таковой L-арабинозы как у пентозоусваивающей *C. guilliermondii*, так и неусваивающей *C. chevalieri*.

3. Моноидуксусная кислота полностью тормозит проникновение арабинозы в клетки *C. tropicalis* K3-10.

Армянский научно-исследовательский институт
животноводства и ветеринарии и
Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 9.VI 1966 г.

Ե. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ա. Ա. ԷԼԻԱԶՅԱՆ

**D-ՔՍԻԼՈՉԻ ԵՎ L-ԱՐԱԲԻՆՈՉԻ ՆԵՐԹԱՓԱՆՅՄԱՆ ՈՒ ԿՈՒՏԱԿՄԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱԶԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՇԱՔԱՐԱՍՆԿԵՐԻ ՄՈՏ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Պենտոզների ներթափանցման առանձնահատկություններն ուսումնասիրվել են ինչպես պենտոզ յուրացնող *C. guilliermondii*-ի, այնպես էլ պենտոզ չյուրացնող *C. chevalieri*-ի և միայն արաբինոզ չյուրացնող *C. tropicalis* K3-10-ի մոտ:

Պարզվել է, որ պենտոզները ինտենսիվ ներթափանցում են ինչպես պենտոզ յուրացնող, այնպես էլ չյուրացնող շաքարասնկային բջիջներից ներս:

Սակայն D-քսիլոզի ներթափանցման արագությունը և կուտակման մակարդակը շատ ավելի բարձր են, քան L-արաբինոզինը:

Այս փաստերը ցույց են տալիս, որ պենտոզների առկայությամբ նշված շաքարասնկերի դանդաղ աճի պատճառներից մեկը, ամենայն հավանականությամբ բխիլոզի և առավել ևս արաբինոզի դանդաղ ներթափանցումն է բջջից ներս:

L-արաբինոզի ներթափանցման արգելակումը յոդքացախաթթվով հայտանշում է շաքարների ակտիվ ներթափանցման մեջ շնչառական պրոցեսների մասնակցությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Зайцева Г. Н., Афанасьева Т. П. Биохимия, 22, 6, 1957.
2. Тер-Карапетян М. А., Элиазян А. А. ДАН АрмССР, 15, 3, 169, 1965.
3. Burger M., Hejnova L., Kleinzeller A. Biochem. J. 71, 2, 233, 1959.
4. Cirillo V. Bact. proceedings, 108, 1959.
5. Cirillo V. Ann. Rev. microbiol, 15, 197, 1961.
6. Cirillo V. Membrane transport and Metabolism symposium. Praha, 343, 1960.
7. Harris G., Thompson C. Biochim. Biophys. acta, 52, 1, 176, 1961.
8. Kotyk A. Membrane transport and Metabolism Symposium, Praha, 352, 1960.
9. Kotyk A., Kleinzeller A. Folia microbiol. 8, 3, 156, 1963.
10. Sols A. Biochim. Biophys. acta. 20, 1, 62, 1956.
11. Sols A., Fuentre G. Membrane transport and Metabolism Symposium Praha, 361, 1960.