ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ. ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXII, № 6, 1969

УДК 577.1 : 576.8 : 097

С. П. ОГАНЕСЯН

ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ У ДРОЖЖЕЙ РОДА CANDIDA

6. ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОНИКНОВЕНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ДРОЖЖЕВОЙ КЛЕТКЕ*

В наших предыдущих работах было установлено, что проникновение аминокислот в дрожжевые клетки осуществляется посредством транспортных систем, действие которых контролируется как физико-химическими условиями внешней и внутренней среды, так и ферментоподобными катализаторами; при этом каждый из этих факторов действует в разных звеньях мембранного транспорта [1, 3].

Установленные факты подкрепляют теорию «облегченной диффузии» (или «опосредствованного транспорта») [9, 15]. Для выяснения механизма «облегченной диффузии» особый интерес представляет подробное изучение влияния таких физических факторов, как температура, pH, осмотическое давление и др. Необходимость таких исследований диктуется противоречивостью данных, полученных под влиянием физических факторов на темпы проникновения и накопления аминокислот в клетках разных видов микроорганизмов.

Температурный коэффициент проникновения глутаминовой кислоты у Str. faecalis равен 2,4, у Staph. aureus—2,7—2,8 [11], α-амино-изомасляной кислоты у Str. hydrogenans он достигает 3,7 [16], что характерно для энзиматических реакций. Наоборот, коэффициент проникновения лизина у Str. faecalis равен 1,4 [11], выхода глицина из клеток коры головного мозга—1,2, что указывает на диффузионную природу действующего механизма [7].

Такие же противоречия найдены и во влиянии pH инкубационной среды у Str. faecalis: скорость проникновения лизина очень низка при pH=4,5, а начиная с 5,5, она постепенно возрастает до pH=9,5, близкой к изоэлектрической точке (pHi=9,3) [8]. Скорость проникновения глутаминовой кислоты достигает острого максимума при pH=6,5, далекой от ее изоэлектрической точки (pHi=3,22) [11]. Подобные данные получены у молочнокислых бактерий в отношении проникновения глутаминовой кислоты.

Степень ионизации не кажется также решающим фактором, определяющим скорость проникновения глицина (pHi=5,97) и гистидина (pHi=7,59) в эритроциты, аргинина, метионина, треонина, глутаминовой кислоты в клетки Saccharomyces cerevisiae [17]. Оптимальная зона про-

* Сообщение 6-ое.

никновения всех этих аминокислот отдалена от соответствующих изоэлектрических точек. Мало изучено влияние ионной силы инкубационной среды на явления проникновения аминокислот и на изменения внутриклеточного осмотического давления.

В опытах, где накопление лизина у Str. faecalis и Staph. aureus сопровождается заметным накоплением фосфора [10], или когда при накоплении глицина в клетках карциномы Эрлиха имеет место набухание последних [4], замечается тенденция к повышению внутриклеточного осмотического давления, компенсируемого изменением объема или выделением из клеток некоторого количества калия, сопряженным с поглощением натрия.

По немногочисленным исследованиям, проведенным на микроорганизмах, в частности на грамм+ бактериях, создается впечатление, что бактериальная клетка устойчива к изменениям осмотического давления внешней среды [11, 6, 14].

Настоящая работа посвящена изучению влияния температуры, pH, осмотического давления среды на процессы проникновения и накопления аминокислот у дрожжевых организмов рода Candida с использованием в качестве субстрата α- и ω-аминокислот нормального ряда.

Методика. Объектом исследования служили дрожжи рода Candida — C. guilliermondii (штамм 71), C. guilliermondii membranaefaciens (штамм 72).

В качестве субстратов использовались DL-аминокислоты (Ак)-аланин (ала), валин (вал), лейцин (лей), α-аминомасляная кислота (α-АМК), γ-аминомасляная кислота (γ-АМК), α,γ-аминомасляная кислота (α,γ-АМК).

Происхождение исследуемых штаммов, состав синтетических сред, техника подготовки культур к опытам, техника голодания и постановки опытов описаны в наших предыдущих работах [1, 2].

Влияние температуры изучалось в шкале от 10—50°C, pH среды—в шкале 1,9—11. Осмотическое давление создавалось при помощи NaCl в пределах 0,05M—2M и фосфатным буфером M/15. При этом инкубационная смесь (10 мл) составлялась из 1,6 мл раствора NaCl и 8,4 мл M/15 фосфатного буфера pH=5,5. Пробы для температуры брались в трехминутные сроки инкубации и 30-минутные для pH и осмотического давления; биомасса же (31—37 мг в одной пробе) определялась из жидкой среды путем центрифугирования и подвергалась экстрагированию 96% спиртом в течение часа с гидромодулем (V спирт/р биомасса) =30.

Способы определения скорости (V) проникновения, уровня накопления (H) и степени концентрирования аминокислот (конц. кл./конц. ср.) описаны в наших предыдущих работах [1, 3].

Q_{10} определялся по формуле $\frac{K_{t+10}}{K_t}$ [13], где K является константой скорости проникновения при температуре T°C, пересчитанной исходя из гипотезы, по которой кинетика для транспорта имеет мономолекулярный характер.

Экспериментальная часть

1. Влияние температуры на проникновение валина и аланина в клетки C. guilliermondii

В условиях трехминутной инкубации изучены темпы проникновения α-аланина и DL-валина в шкале температуры от 10 до 50°С (табл. 1 и рис. 1).

Таблица 1

Влияние температуры на проникновение аминокислот у C. guilliermondii

Концентрация субстрата в среде 45 мМ, дрожжи в одной колбе 87 мг (сухого вещества), продолжительность инкубации—3 минуты, объем инкубационной смеси —10 мл

№ и дата опыта	Температура, С	Ала—40 мг			Вал—56 мг		
		мкМ/1 мг/мин ×10³	Н мкМ/100 мг сухих дрожжей	конц. кл. / конц. ср.	мкМ/1 мг/мин×10³	Н мкМ/100 мг сухих дрожжей	конц. кл. / конц. ср.
Оп. 68 13.IV—1967	10	5,0	1,7	0,09	7,0	2,2	0,11
	20	7,0	2,3	0,10	11,0	3,4	0,18
	25	8,0	2,6	0,14	13,0	4,0	0,20
	30	11,0	3,4	0,19	16,0	4,9	0,25
	37	7,0	2,1	0,10	12,0	3,7	0.19
	40	7,0	2,1	0,10	5,0	1,6	0,08
	45	2,0	0,8	0,04	1,2	0,3	0,01
	50	0,6	0,2	0,01	0,8	0,2	0,01

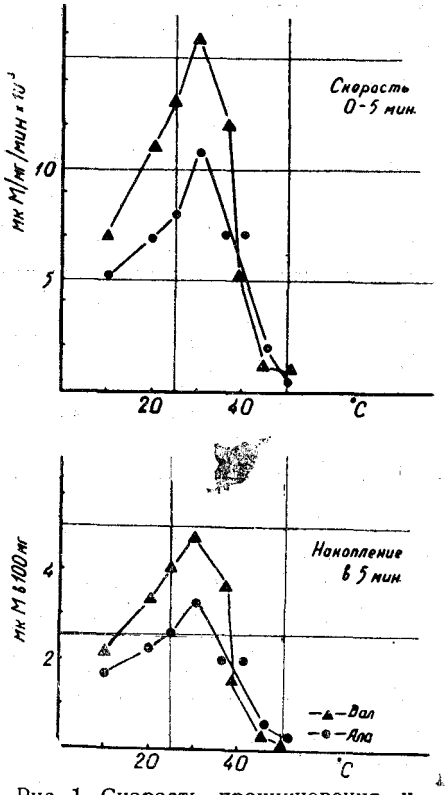

Рис. 1. Скорость проникновения и уровень накопления аланина и валина у Candida guilliermondii в зависимости от температуры.

Как показывают данные, характер действия температуры на проникновение обеих аминокислот одинаков. Определен острый оптимум при 30±1°С, с резким падением скорости транспорта через мембрану ниже и выше этой точки. По абсолютным значениям, скорость проникновения вал значительно превышает таковую ала, особенно в интервале положительного действия температур с 10 до 30°С; после оптимальной температурной точки значения скоростей проникновения вышеуказанных аминокислот сближаются.

Совпадение оптимальных точек не следует считать признаком того, что проникновение обеих аминокислот осуществляется обязательно посредством единой транспортной системы. Данные, полученные нами при изменении pH, осмотического давления и других факторов, свидетель-

ствуют об определенной самостоятельности транспортных систем, регулирующих проникновение отдельных Ак в клетки.

2. Влияние pH на проникновение аминокислот

Опыты были проведены с Candida guilliermondii с аминокислотами группы аланина-α-ала, вал, лей и с C. guill. membranaefacien с α-АМК, γ-АМК, αγ-АМК (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2

Влияние pH на проникновение и накопление аминокислот у дрожжей

Концентрация субстрата в среде 45 мМ, (α,γ-34 мМ), дрожжи в одной колбе 169 мг (оп. 77), 150 мг (оп. 35), 79 мг (оп. 63) (сухого вещества). Продолжительность инкубации —30 мин. Объем инкубационной смеси —10 мл.

№ и дата опытов	pH среды	H Ак мкМ в 100 мг сухих дрожжей	Конц. кл. / конц. ср.	H Ак мкМ в 100 мг сухих дрожжей	Конц. кл. / конц. ср.	H Ак мкМ в 100 мг сухих дрожжей	Конц. кл. / конц. ср.
Candida guilliermondii							
		Ала—40 мг		Вал—56 мг		Лей—60 мг	
оп. 77 18.X.1967	1,9—2,0	4,0	0,28	5,3	0,27	3,1	0,17
	3,0—3,2	4,3	0,30	5,6	0,30	3,8	0,20
	5,5—5,8	5,0	0,39	6,2	0,32	4,1	0,23
	6,7—7,2	4,6	0,30	5,6	0,30	4,1	0,22
	8,2	4,0	0,28	5,6	0,30	1,9	0,10
Candida guilliermondii membranaefaciens							
		α-АМК—46 мг		γ-АМК—46 мг		α,γ-АМК—40 мг	
оп. 35 27.II.67 оп. 63 14.II.66	2,0	5,1	0,27	0,46	0,02	3,0	0,20
	4,5	5,3	0,27	1,80	0,09	3,4	0,27
	5,5	4,9	0,20	1,40	0,08	3,2	0,26
	6,4	4,0	0,20	0,30	0,02	1,7	0,10
	8,2	3,3	0,20	0	0,02	1,26	0,19
	11,5	1,3		0	0	0,87	

Полученные данные показывают фактически одинаковые оптимальные точки проникновения аминокислот группы аланина, близкие к изоэлектрической pH (pHi=5,97—6,02).

В отношении аминомасляных кислот получается совершенно иная картина.

Все три АМК показывают близкий оптимум проникновения в интервале pH, от 2 до 5,5, γ-АМК показывает наглядный оптимум при pH=4,5.

Выше pH 4,5 темпы проникновения и накопления всех трех Ак резко падают, особенно для γ-АМК.

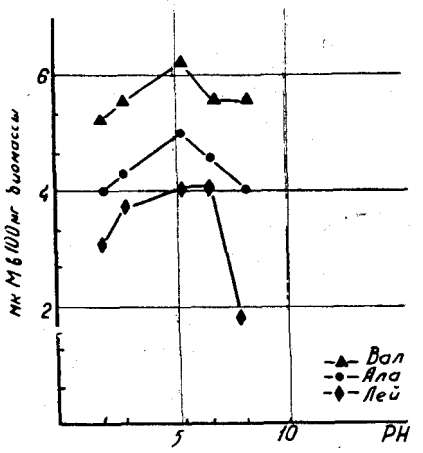

Рис. 2. Накопление α-аланина, валина, лейцина у Candida guilliermondii в зависимости от pH буфера.

3. Влияние осмотического давления инкубационной среды на проникновение аминокислот группы аланина

Опыты проведены с C. guilliermondii, субстратами служили α-ала, вал, лей.

Изменение осмотического давления внешней среды осуществлялось путем изменения концентрации NaCl в инкубационной смеси от 0,05M до 2M.

Данные по изучению скорости проникновения в первые 5 мин и уровня накопления за 30 мин инкубации приведены в табл. 3 и на рис. 3.

Результаты показывают, что изменение осмотического давления инкубационной среды по-разному действует на скорость проникновения и уровень накопления исследуемых Ак в клетке.

Скорость проникновения ала и вал остается высокой и не варьирует в зоне 0,05—0,27M концентрации NaCl, выше которой до 2,00 M она постепенно снижается до 50—60%.

Уровень накопления варьирует меньше при изменении ионной силы среды. Он показывает маловыраженный максимум трех Ак при ионной силе, между 0,15—0,27 (лей—ближе к 0,50), а с обеих сторон этого максимума уровень накопления очень медленно снижается.

Обсуждение результатов и выводы. Изучение влияния осмотического давления на транспорт α-аланина и валина у C. guilliermondii показывает, что при постепенном повышении его скорость проникновения подавляется сильнее темпов накопления.

Малые изменения в степени концентрирования α-аланина, валина и лейцина у C. guilliermondii в шкале осмотического давления, охватывающей область от 0,05 до 2,00 M NaCl, подтверждают мнение о том, что микробная клетка весьма стойка к осмотическим воздействиям [6, 11]. Окончательное разрешение этого вопроса может быть осуществлено при

Таблица 3

Влияние осмотического давления на проникновение и накопление аминокислот у C. guilliermondii

Концентрация субстрата в среде 45 мМ, дрожжи в одной колбе 146 мг (оп. 36), 211 мг (оп. 22), 193 мг (оп. 37 сухого вещества), продолжительность инкубации 5, 30 мин, объем инкубационной смеси 10 мл

№ и дата опытов	Субстрат Ак, мг	Молярность NaCl	V (5′) мкМ/1 мг/мин $\times 10^3$	H (30′) Ак мкМ в 100 мг сухих дрожжей	Конц. кл. / конц. ср.
Оп. 36 16.III.1966	DL-Ала—40	0,05	9,0	4,4	0,24
		0,20	8,0	4,0	0,22
		0,27	9,0	4,5	0,25
		0,50	6,0	3,7	0,21
		0,80	6,0	4,0	0,22
		1,00	6,0	4,0	0,22
		2,00	5,00	3,7	0,21
Оп. 22 22.X.1965	DL-Вал—56	0,05	16,0	7,9	1,7
		0,20	16,0	8,0	1,8
		0,27	18,0	7,9	1,7
		0,50	15,0	7,9	1,7
		0,80	13,0	7,9	1,7
		1,00	12,0	6,0	1,3
		2,00	10,0	6,0	1,3
Оп. 36 23.III.1966 Оп. 37 16.III.1966	DL-Лей—60	0,05	—	3,0	0,16
		0,20	—	3,3	0,18
		0,27	—	3,0	0,16
		0,50	—	3,6	0,19
		0,80	—	2,8	0,15
		1,00	—	3,1	0,17
		2,00	—	2,2	0,12

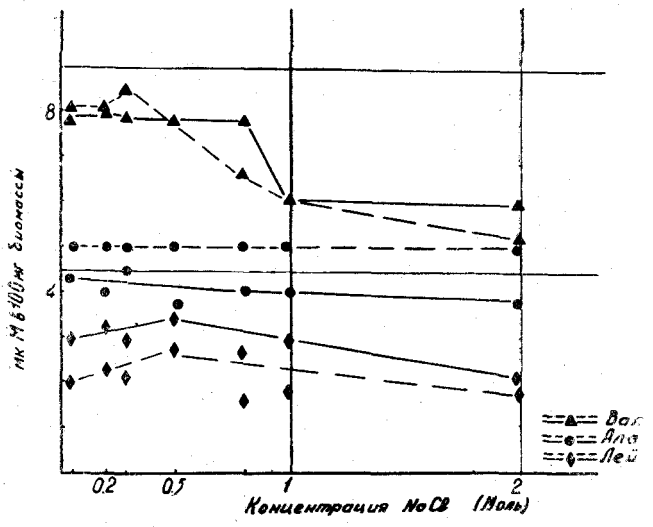

Рис. 3. Влияние осмотического давления на накопление аланина, валина и лейцина у Candida guilliermondii.

изучении не только скорости проникновения, но и темпов выхода аминокислот из клеток, а также обменом ионами и аминокислотами между протоплазмой и внешней средой в процессе накопления последних в клетках. Последнее явление хорошо иллюстрировано на примере клеток карциномы Эрлиха [7].

Приведенные данные 30-минутной инкубации отражают в некоторой степени влияние pH как на скорость проникновения, так и на уровень накопления аминокислот в клетках.

Накопление валина, лейцина, аланина у C. guilliermondii и γ-АМК у C. guill. membranaefaciens найдено в интервале pH, близком к изоэлектрической точке (pHi) соответствующих аминокислот; однако в отношении α-АМК, и в особенности для α,γ-АМК, последнее не наблюдается [8].

Эти факты свидетельствуют о том, что обратная коррелятивность между степенью ионизации и скоростью проникновения, установленная у Valonia в отношении к H_2CO_3 и H_2S [13], не распространяется на исследуемые аминокислоты. Отсутствие ее установлено также у Str. faecalis и L. arabinosus, в клетках которых оптимальная скорость проникновения глутамата наблюдается в зоне pH 6—7 [11, 12], а также клеток карциномы, в которых оптимум проникновения глицина лежит при pH 7,5—8,0 [4].

Обработка данных по влиянию температуры показывает, что Q_{10} равен в интервалах 0—10°—1,15, 10—20°—1,10, 20—30°—1,04. Это является признаком того, что в определенном звене процесса проникновения аминокислот вступает в силу диффузионный механизм.

Приведенные результаты являются новыми аргументами в пользу самостоятельности явлений проникновения и накопления аминокислот в живой клетке.

Согласно гипотезе «облегченной диффузии» [3], скорость переноса веществ с одной стороны мембраны на другую обусловлена в основном системами, обладающими специфическим свойством образовывать комплекс с субстратом с определенной скоростью диффузии (или деформации) этого комплекса, в то время как накопление зависит главным образом от возможности клеточных структур и других клеточных компонентов включать в себя данную аминокислоту.

Совокупность фактов, доказывающих осуществление мембранного транспорта при соучастии диффузионного и энзимоподобного механизмов, еще более подкрепляет концепцию «облегченной диффузии» или «опосредствованного» транспорта в той форме, какую указывал Даниелли [9], согласно которой транспорт осуществляется в условиях непрямой зависимости от клеточного метаболизма.

Работа была выполнена под руководством академика АН АрмССР М. А. Тер-Карапетяна.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 15.I 1969 г.

Ս. Պ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ CANDIDA ՑԵՂԻ ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՄՈՏ

6. ՄԻ ՔԱՆԻ ՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՄՈՐԱՍՆԿԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՆԵՐԹԱՓԱՆՑՄԱՆ ԵՎ ԿՈՒՏԱԿՄԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Մեր նպատակն է եղել ուսումնասիրել միջավայրի ֆիզիկական գործոնների՝ օսմոտիկ ճնշման, ջրածնային իոնների կոնցենտրացիայի (pH), ջերմաստիճանի ազդեցությունը Candida ցեղի խմորասնկային օրգանիզմներում α- և ω-ամինաթթուների ներթափանցման ու կուտակման վրա։

Հետազոտվել է օսմոտիկ ճնշման ազդեցությունը α-ալանինի, վալինի, լեյցինի ջերմաստիճանի ազդեցությունը DL-վալինի և α-ալանինի ներթափանցման ու կուտակման վրա C. guilliermondii-ի մոտ, pH-ի ազդեցությունը C. guilliermondii-ի բջիջներում α-ալանինի, վալինի, լեյցինի, C. guill. membranaefacens-ի մոտ α-ամինակարագաթթվի, γ-ամինակարագաթթվի, α,γ-ամինակարագաթթվի ներթափանցման ու կուտակման վրա։

Մեր հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ C. guilliermondii-ի մոտ α-ալանինի, վալինի և լեյցինի քանակությունները քիչ են փոփոխվում օսմոտիկ ճնշման հետազոտված ցուցանակում (0,05—2,00 մոլ. NaCl), մի փաստ, որը հաստատում է միկրոբային բջջի դիմադրողականությունը օսմոտիկ ճընշման փոփոխությունների նկատմամբ (աղ. 3, նկ. 3)։

Այդ երևույթը չի կարելի բացատրել միայն ներթափանցման արագությամբ, այլ պետք է հաշվի առնել նաև ամինաթթուների ելքը բջիջներից դուրս, իոնների ու ամինաթթուների փոխանակությունը պրոտոպլազմայի և արտաքին միջավայրի միջև։

Ալանինի, վալինի, լեյցինի և γ-ամինակարագաթթվի կուտակման մակարդակի pH-ը համընկնում է նրանց իզոէլեկտրիկ կետի հետ, իսկ α-, γ-ամինակարագաթթուները՝ շեղվում (աղ. 2, նկ. 2)։

Ջերմաստիճանային գործակիցը (Q_{10}—0—10°=1,15, 10—20°=1,10, 20—30°=1,04 ցույց է տալիս, որ որոշ օղակներում ամինաթթուների ներթափանցումը հակվում է դեպի դիֆուզիոն մեխանիզմը (աղ. 1, նկ. 1)։

Հետևաբար, ստացված փաստերն էլ ավելի են հաստատում «հեշտացված դիֆուզիայի» կամ «միջնորդված տրանսպորտի» տեսությունն այն ձևով, որ մատնանշել է Դանիելին, ըստ որի ներթափանցումն անուղղակի կախման մեջ է գտնվում բջջային մետաբոլիզմից։

ЛИТЕРАТУРА

1. Гизе А. Физиология клетки, М., 1959.
2. Тер-Карапетян М. А., Оганесян С. П., Тер-Карапетян А. М. Биол. журн. Арм. 21, 11, 1968.
3. Тер-Карапетян М. А., Оганесян С. П. Биол. журн. Арм., 22, 3, 1969.

4. Christensen H., Riggs T., Fischer H., Palatine J. J. biol. chem. 198, 1, 1952.
5. Christensen H., Riggs T., Ray E. J. biol. chem 194, 1 1952.
6. Christensen H. Membrane transport and Metabolism Prague p. 503, 1960.
7. Christensen H. Amino acid Metabolism, 1955.
8. Cohn E., Edsall J. Amer. chem. Soc. monogr. series, New-York, 1943.
9. Danielli J. F. Symp. Soc. Exptl. biol. VIII, 502, 1954.
10. Davies R., Folkes J. P., Gale E. F. Bigger Biochem. J. 54, 430, 1953.
11. Gale E. F. Adv. Prot. chem. VIII, 287, 1953.
12. Holden T., Holman J. J. biol. chem. 234, 865, 1959.
13. Höber R. Physical chemistry of Cells and Tissues Philad. USA, 1945.
14. Park C. R. Membrane transport and Metabolism p. 19, Prague, 1960.
15. Rosenberg Th. Symp. soc. Exptl. biol. VIII, 25, 1954.
16. Ring K., Heinz. Biochem. Z. 5, 344, 1966.
17. Surdin J., Shy W., Size J., Bordes A. M. Robichon-Szulmayster H. D. Biochim. Biophys. acta 107, 3, 1965.