

М. А. ТЕР-КАРАПЕТЯН, С. М. ИНДЖИҚЯՆ

ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ У ДРОЖЖЕЙ РОДА CANDIDA

8. Превращение аланина, валина и лейцина в запасном фонде дрожжевых клеток

Для понимания механизма взаимопревращения аминокислот в живой клетке и дальнейшего их включения в обменные процессы, в частности в синтез пептидов и белков, первостепенное значение имеет изучение состояния аминокислот, и особенно их распределение между макромолекулярными структурами и легко извлекаемой фракцией, называемой запасной или обменный фонд («metabolic pool»).

В запасном фонде дрожжевых клеток установлено наличие всех природных аминокислот, входящих в структуру белков [4, 13—16]; при этом выявлены большие расхождения между спирторастворимой и нерастворимой фракциями клеток, с преобладанием в первой глутаминовой кислоты, аргинина, лизина и др. [10—16, 18].

Установлено также, что специфические изменения в аминокислотном составе запасного фонда зависят как от природы и возраста культуры [11, 12, 19, 20], так и от источников азота и наличия витаминов группы В; особенно интересны в этом отношении данные, касающиеся ГАМК и глутамина [1, 6—8]. На образование аминокислот запасного фонда не меньшее влияние оказывают источники углерода [4, 11, 18] и степень аэрирования культуры [2, 3; Тер-Қарапетян, Чубарян, неопубликованные данные].

Весьма плодотворной для изучения процессов биосинтеза аминокислот и белков, в частности их первичных этапов, оказалась разработка режимов азотного голодания дрожжевых клеток, чем и объясняется широкое использование этого метода [7, 8, 11, 12, 18, 21].

Нами проводились систематические исследования ряда представителей рода *Candida* с целью выяснения роли аланина, валина, лейцина в процессах взаимопревращения и синтеза аминокислот запасного фонда.

Методика. Исследовались следующие культуры: *C. guilliermondii* № 71, *C. guilliermondii membranaefaciens* № 72, *C. tropicalis* ДН—3, *C. tropicalis* КЗ—10, *C. chevalieri* № 66, *C. arborea* № 64, методы выращивания которых описаны в предыдущих работах [1, 5, 6].

Исследования вновь синтезируемых аминокислот проводились в спиртовом экстракте биомассы в конце экспоненциальной фазы роста культуры, после высушивания при 70–80° (в большинстве опытов) и в свежем виде для изучения первичных этапов синтеза аминокислот. Экстрагирование проводилось с гидромодулем (V/P)-30 в течение 1 часа.

Первичные этапы синтеза аминокислот были изучены в кратковременных опытах продолжительностью в пределах 2–5 мин—2 часа в присутствии некоторых источников азота; исходная культура, при этом, подвергалась глубокому азотному голоданию в 2% глюкозе, так что в спирторастворимой фракции сохранялись в основном глутаминовая кислота и аланин. Доведение запасного фонда до минимума позволило определить вновь синтезируемые аминокислоты с наименьшей ошибкой без применения меченых субстратов.

Исходная голодающая культура, а также вариант с аммонием служили контролем.

Определение спирторастворимых аминокислот дрожжевой биомассы проводилось методом хроматографического анализа. Распределение аминокислот проводилось нисходящим способом в растворителе бутанол—уксусная кислота—вода, 4:1:1 или 4:1:5, путем четырехкратного или пятикратного распределения, с последующим проявлением 0,2% раствором нингидрина в ацетоне и элюирования пятен 0,1% раствором $CdCl_2$ и 60% метиловым спиртом с фотометрированием. Анализы проводились в нескольких повторностях (не менее 3–4), что позволило получить данные с отклонением не более ± 5 –7%.

Состав запасного фонда аминокислот в зависимости от источников азота

Установлено, что при выращивании голодающей культуры в синтетической среде, содержащей одну из вышеуказанных аминокислот, синтезируемый запасной фонд значительно изменяется в зависимости от природы культуры и источника азота. Наблюдаемые расхождения в запасном фонде носят как качественный, так и количественный характер (табл. 1).

Из полученных данных наиболее наглядными являются следующие: в процессе выращивания дрожжей все аминокислоты, служащие источником азота, найдены в запасном фонде в больших количествах. На начальных этапах они даже преобладают над вновь синтезируемыми аминокислотами.

По влиянию на накопление суммы аминокислот запасного фонда источники азота располагаются в следующем убывающем порядке:

Культуры	Сумма всех аминокислот запасного фонда	Сумма аминокислот запасного фонда без учета аминокислоты субстрата
<i>C. guilliermondii</i>	— NH_4^+ > вал > ала > лей	NH_4^+ > вал > ала > лей
<i>C. guillierm. membr.</i>	— NH_4^+ > вал > лей > ала	NH_4^+ > вал > лей > ала
<i>C. chevalieri</i>	— NH_4^+ > лей > ала > вал	NH_4^+ > лей > ала > вал
<i>C. arborea</i>	— NH_4^+ > ала > вал > лей	NH_4^+ > ала > вал > лей
<i>C. tropicalis</i> ДН—3	— Лей > вал > ала > NH_4^+	Вал > лей > NH_4^+ > ала
<i>C. tropicalis</i> КЗ—10	— Лей > вал > ала > NH_4^+	Лей > вал > ала > NH_4^+

Таблица 1

Влияние различных источников азота на состав спирторастворимых аминокислот, в мкг в 100 мг сухих дрожжей

Варианты	Орнитин	Лизин	Аспарагин	Аргинин+глутамин	Аспарагиновая кислота	Серин	Глицин	Глутаминовая кислота	Треонин	α -аланин	Тирозин	ГАМК	Валин/метионин	Фенилаланин	Лейцин/изолейцин	Сумма аминокислот
<i>C. guilliermondii</i>																
Исх	—	30	—	27	38	40	24	43	27	128	49	63	73	44	117	703
NH ₄ ⁺	—	336	198	359	153	180	187	142	279	739	161	400	430	278	712	4524
α -ала	51	231	138	410	60	136	116	222	146	1330	183	130	178	87	268	3686
β -ала	36	248	72	194	56	119	96	282	137	962	169	115	190	95	291	5062
Лей	27	115	87	86	60	84	86	238	126	631	150	75	186	78	454	2483
Вал	—	157	87	136	79	141	120	125	177	627	126	259	1472	185	405	4100
<i>C. tropicalis</i> ДН-3																
Исх	—	74	—	71	50	88	74	—	50	158	—	37	192	191	224	1207
NH ₄ ⁺	166	154	—	1050	91	135	105	233	155	853	—	203	392	232	346	4115
α -ала	222	133	—	1050	78	139	108	247	150	1076	—	89	430	273	399	4394
β -ала	156	130	—	924	64	132	95	202	122	949	—	289	456	273	420	4212
Лей	256	189	—	651	118	210	127	274	192	945	—	139	1044	273	1312	5732
Вал	147	189	—	659	109	209	120	233	218	930	—	146	1504	408	812	5684
<i>C. tropicalis</i> К3-10																
Исх	—	134	—	176	—	123	60	—	113	349	—	185	366	—	526	2032
NH ₄ ⁺	56	89	—	765	—	76	71	219	68	595	—	399	146	—	161	2645
α -ала	92	101	—	898	—	99	87	288	120	1143	—	286	212	—	231	3557
β -ала	61	88	—	713	—	81	88	284	100	914	—	414	163	—	168	3074
Лей	208	198	—	744	—	284	238	541	293	1455	—	249	862	—	776	5848
Вал	62	106	—	534	—	101	83	296	128	850	—	283	1257	—	293	3993
<i>C. chevalieri</i>																
Исх	—	84	—	94	234	40	37	61	48	143	56	26	340	—	160	1319
NH ₄ ⁺	—	204	—	324	232	100	92	78	128	456	110	228	783	—	382	3117
α -ала	65	151	—	282	142	70	95	167	101	303	99	55	409	—	190	2628
β -ала	81	166	—	346	408	81	99	98	153	789	165	71	457	—	209	3123
Лей	87	121	—	92	102	70	112	268	92	611	77	151	324	—	664	2781
Вал	53	106	—	123	161	52	75	99	130	285	64	83	1095	—	111	2437
<i>C. arborea</i>																
Исх	—	12	—	42	—	19	20	—	14	54	—	29	23	—	23	236
NH ₄ ⁺	52	316	—	928	56	138	227	269	139	904	199	546	609	—	564	4943
α -ала	93	297	—	726	96	119	219	287	159	1224	157	488	493	—	270	4629
β -ала	92	319	—	780	85	114	247	305	129	1267	157	546	444	—	252	4737
Лей	62	66	—	137	34	37	121	71	52	440	82	300	251	—	392	2045
Вал	126	240	—	331	65	67	162	83	70	757	100	444	1537	—	184	4166
<i>C. guilliermondii</i> membranaefaciens																
Исх	—	38	—	—	49	34	58	—	—	86	—	22	64	—	63	414
NH ₄ ⁺	—	380	—	477	250	258	243	108	382	1351	—	173	637	—	1734	5993
α -ала	72	99	—	378	159	68	99	130	175	2418	—	27	167	—	189	3981
β -ала	117	72	—	276	130	65	66	96	101	841	—	28	86	—	158	2036
Лей	—	228	—	232	200	179	181	96	216	916	—	99	650	—	1962	4959
Вал	—	235	—	186	179	190	148	77	235	863	—	86	2425	—	855	5479

Таким образом, у большинства культур NH_4^+ способствует наибольшему накоплению аминокислот в запасном фонде.

Вызывают интерес данные по накоплению ГАМК в зависимости от источника азота. Установлено, что наиболее интенсивное накопление ее происходит в присутствии NH_4^+ у *C. guilliermondii*, *C. guilliermondii membranaefaciens*, *C. chevalieri*, *C. arborea* и *C. tropicalis*. ГАМК накапливается в больших количествах в присутствии как NH_4^+ так и применяемых в качестве источников азота аминокислот. Несколько различаются в этом отношении между собой оба штамма последнего вида.

Из-за специфичности действия отдельных источников азота в запасном фонде создается разное соотношение аминокислот в их общей сумме.

Полученные данные указывают, как это было подчеркнуто ранее [7, 8], на особую роль ГАМК, как промежуточного метаболита, в путях взаимопревращения аминокислот у дрожжевых организмов и значение ее для характеристики отдельных видов и штаммов.

Аргинин + глутамин синтезируется в наибольших количествах в присутствии NH_4^+ и аланина у всех культур. С другой стороны, наглядна положительная роль NH_4^+ в синтезе валина и лейцина, особенно у *C. guilliermondii membranaefaciens*.

Первичные этапы синтеза аминокислот

Данные приведены на рис. 1 а, б.

Изучение первичных этапов синтеза аминокислот запасного фонда выявило значительные расхождения в динамике их синтеза в зависимости от источника азота, а также отсутствие прямой зависимости между интенсивностью синтеза аминокислот и их накоплением. Обычно синтез запасного фонда быстрее происходит при усвоении NH_4^+ , чем аминокислот, хотя последние интенсивно накапливаются в клетке. В присутствии аминокислот уровень глутамина даже при длительной инкубации не достигает уровня, наблюдаемого в присутствии NH_4^+ .

Начальная фаза синтеза аминокислот запасного фонда у всех культур протекает по трем типам.

У *C. guilliermondii* и *C. guilliermondii membranaefaciens* первым синтезируемым соединением является глутамин, образуемый уже через 2—5 мин после начала инкубации в присутствии NH_4^+ . Вероятно, он синтезируется за счет имеющегося в запасном фонде глутамата и проникнувшего NH_4^+ .

У *C. guilliermondii* на других субстратах в первую очередь синтезируется глутаминовая кислота и аланин, значительно позже—глутамин.

У *C. guilliermondii membranaefaciens* в присутствии α -аланина глутаминовая кислота синтезируется раньше глутамина—(соответственно через 15 мин, 30—120 мин). В присутствии ААМК и ГАМК и их смеси

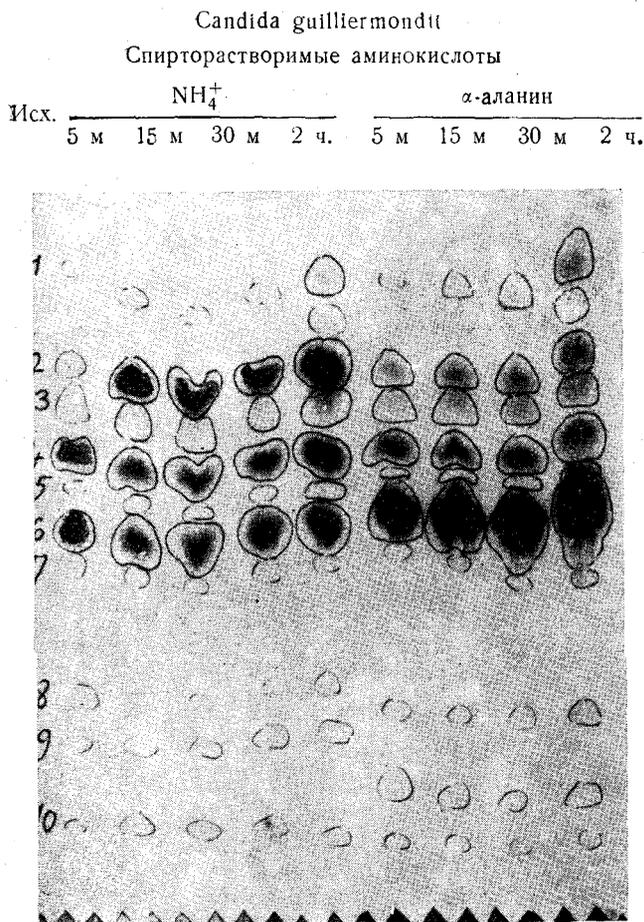


Рис. 1а. Первичные этапы синтеза глутамина у *C. guilliermondii* при наличии: а — NH_4 и α — алачина. Исх. — исходная культура.

глутаминовая кислота и аланин синтезируются раньше глутамина (через 15 мин). В присутствии ГАМК накопление глутаминовой кислоты начинается после 30 мин инкубации и достигает заметных количеств через 2 часа, а при наличии ААМК и ГАМК+ААМК даже спустя 2 часа после начала инкубации глутамин проявляется в незначительном количестве: по-видимому, ААМК тормозит образование глутамина [5].

У *C. chevalieri* в первые минуты инкубации в присутствии NH_4^+ накапливаются глутаминовая кислота и аланин. В данном случае трудно определить, какая из этих аминокислот синтезируется в первую очередь. Глутамин синтезируется несколько меньше и медленнее. В присутствии аланина синтез глутамина происходит не раньше, чем через 30 мин — 2 часа.

У *C. tropicalis* КЗ-10 раньше всех одновременно проявляются пятна глутаминовой кислоты и глутамина. В данном случае также трудно определить, которая из них синтезируется в первую очередь. Как видно из Биологический журнал Армении, XXIII, № 11—5

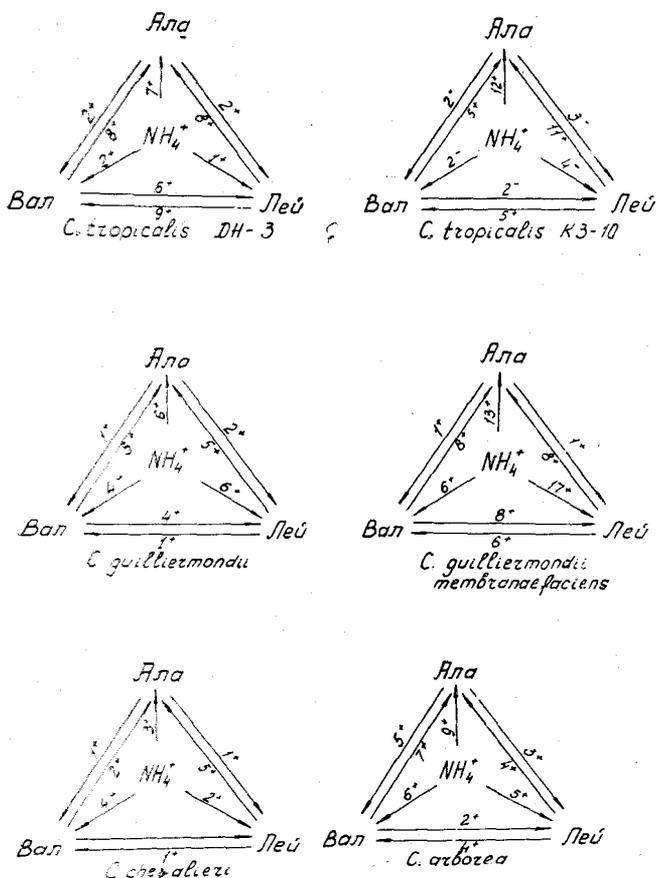


Рис. 2. Синтез и взаимопревращение аминокислот в запасном фонде при наличии NH_4^+ , α -аланина, валина и лейцина в цифровых обозначениях каждая единица равна порядку 100 мкг аминокислот).

способности накапливать суммы аминокислот запасного фонда в присутствии аммония, аланина, лейцина и валина, так и по интенсивности взаимопревращения аминокислот. Данные свидетельствуют о том, что в противоположность определенному единству в путях включения C-скелета аланина, валина, лейцина в синтез общего фонда аминокислот клеток [9], пути включения NH_2 -группы этих же аминокислот значительно расходятся как у одной и той же культуры, так и между отдельными представителями рода *Candida*.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии,
Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 23.X 1960 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Инджикян С. М. Ученые записки ЕГУ, 1, 119–131, 1969.
2. Кретович В. Л., Ауэрман Т. Л. Микробиология, 33, 3, 415, 1964.
3. Кретович В. Л., Краузе Е. Микробиология, 30, 5, 881, 1961.

4. Тер-Карапетян М. А. ДАН СССР, 122, 5, 870, 1958.
5. Тер-Карапетян М. А., Инджикян С. М. Докл. АН АрмССР, 43, 2, 117—123, 1966.
6. Тер-Карапетян М. А., Инджикян С. М., Чубарян С. В. Биолог. журнал Армении, 21, 1, 3—17, 1968.
7. Тер-Карапетян М. А., Макрова Е. Н. Изв. АН АрмССР, 17, 1, 27, 1964.
8. Тер-Карапетян М. А., Макарова Е. Н. ДАН АрмССР, 40, 2, 117, 1965.
9. Abelson P., Vogel H. J. Biol. Chem. 213, 355, 1955.
10. Freelands G., Gale E. Biochem. J. 41, 135, 1947.
11. Halvorson H., Fry W., Schwemmin P. J. Gen. Physiol. 38, 549, 1955.
12. Halvorson H., Spiegelman S. J. Bact. 65, 601, 1953.
13. Holden J. Amino Acid Pools, Symposium, Duarte, p. 73, 1961.
14. Lindan O., Work E. Biochem. J. 48, 337, 1951.
15. Miettinen J. K. Acta Chem. Scand. 5, 926, 1951.
16. Miettinen J. K. Ann. Acad. Sci. Fen. A11, Chemica, 58, 1954.
17. Sims A., Folkes B. Proc. Roy. Soc. B159, 472, 1964.
18. Spiegelman S., Halvorson H., Ben-Ishai R. Amino Acid Metabolism Symposium, 1955.
19. Taylor E. J. Gen. Microbiol. 1, 86, 1947.
20. Taylor E. J. Gen. Microbiol. 3, 211, 1949.
21. Virtanen A., Csaky T., Rautanen N. Bioch. Bioph. Acta 3, 208, 1949.