

Л. Е. ЛАЧИНЯН, М. А. ДАВТЯН

О ПУТЯХ УСВОЕНИЯ АЛАНИНА И ЛЕЙЦИНА У ДРОЖЖЕЙ РОДА CANDIDA

Вопросы усвоения отдельных аминокислот дрожжевыми организмами как единственных источников азота в зависимости от числа и позиции аминной группы, числа углеродных атомов и разветвленности углеродного скелета достаточно изучены.

Значительно меньше внимания было уделено вопросам усвоения аминокислот, внесенных в синтетическую среду без глюкозы и являющихся в этом случае одновременными источниками углерода и азота [4—6].

С целью выяснения первичных механизмов усвоения аминокислот дрожжами рода *Candida* нами, помимо изучения прироста биомассы, параллельно исследовался процесс освобождения аммиака при использовании аминокислот в качестве единственных источников азота и углерода.

Методы исследований. Объектом исследования служили представители рода *Candida* — *Candida guilliermondii* 71, *Candida guilliermondii membranaefaciens* 72, *Candida utilis* 106, *Candida tropicalis*, ДН-3, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР. Методика выращивания дрожжей описывалась в ранних статьях нашей лаборатории [1, 3].

В вариантах, в которых аланин и лейцин являлись одновременно источниками углерода и азота, основная среда (ОС) бралась без глюкозы, и внесенные в нее аланин (9,99 г) и лейцин (7,28 г) соответствовали такому же количеству углерода — элемента, который содержался в 10 г глюкозы (4 г). При этом количество аминного азота, внесенного в инкубационную среду, в 1,5—2 раза превышало азотные нормы стандартной среды. С целью оценки влияния высоких доз азота на приrost биомассы в ряде опытов использовалась ОС с внесением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве, превышающем стандартную норму в 2 (6,20 г) и 3 (9,30 г) раза.

Посевным материалом для всех вариантов служила культура, выращенная в жидкой синтетической среде и подвергнутая голодачню в 2% растворе глюкозы (48—52 часа) и дистиллированной воде (24 часа).

Посевной материал, рассчитанный на сухой вес дрожжей, вносился в количестве 8—12 мг для вариантов с повышенными нормами азота (50 мг) для 100 мл среды с усвоением аминокислот. Инкубация культур проводилась в колбах Эрленмейера в термокамере при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в условиях интенсивного аэрирования на круговой качалке (200 оборотов/мин).

Опыты первой серии (1, 2, 3 нормы азота) длились в течение 20—24 час., что соответствовало полному расходу глюкозы.

Опыты второй серии (усвоение аланина и лейцина) проводились в течение 18—20 час. для контрольных вариантов (NH_4 +глю, ала+глю, лей+глю), а для ва-

риантов ала, лей они продолжались до момента прекращения роста биомассы, о чем судили по данным фотометра в течение 48, иногда—72 час. В течение инкубации проводилась многократная нейтрализация сред с аланином 0,1 Н раствором H_2SO_4 и расчет нейтрализованного аммиака.

Глюкоза определялась микрометодом феррицианида, азот—микрометодом Кьельдаля, биомасса—взвешиванием сухих дрожжей, а также по экономическому коэффициенту

$$\frac{\text{синтезированная биомасса}}{\text{расщепленная глюкоза}} \times 100.$$

Экспериментальные данные и обсуждение. Экспериментальные данные по усвоению аланина и лейцина, внесенных в синтетическую среду в качестве единственных источников углерода и азота, представлены в табл. 1, 2.

Таблица 1

Усвоение аланина в качестве единственного источника углерода и азота

№ опыта	Вариант	Исходный азот среды, мг	Синтезированная биомасса	Азот всей биомассы	Азот среды после инкубации	Азот всей биомассы + азот среды	Углерод как усвоенной и дезаминированной	Экономический коэффициент по углероду глюкозы
Candida guilliermondii 71								
25	NH_4^+ + глю	66	328,4	20,23				40
	ала (48 г)	156	78,5	4,39	67,2	71,59	184	17
	ала (72 г)	156	109,9	6,15	74,2	80,35	210	21
26	NH_4^+ + глю	66	403,8	25,19	—			42
	ала (72 г)	156	116,3	6,29	73,08	79,37	205	21
	ала (72 г)	156	140,3	6,67	77,70	84,37	222	23
	ала (72 г)	156	135,6	6,26	78,54	84,80	218	22
27	NH_4^+ + глю	66	365,2	23,74				37
	ала (72)	156	212,4	11,29	78,4	89,69	230	37
28	NH_4^+ + глю	66	312,3	13,12				32
	ала + глю	66	405,2	17,50				42
			404,6	18,69				43
	ала	156	135,0	6,99	84,0	90,99	229	27
Candida tropicalis K3—10								
30	NH_4^+ + глю	66	359,8	18,70				35
	ала + глю	66	417,1	24,19				41
	ала	156	158,5	7,92	50,4	58,32	150	52
C. utilis 106								
32	NH_4^+ + глю	66	298,1	16,09				30
	ала + глю	66	336,2	20,50				35,6
	ала	156	123,1	6,15	90,1	96,25	387,2	25
C. guilliermondii membranaefaciens 72								
33	NH_4^+ + глю	66	344,0	21,26				36
	ала + глю	66	263,3	15,21				25
	ала	156	—	—				—

Т а б л и ц а 2

Усвоение лейцина в качестве единственного источника
углерода и азота

№ опыта	Вариант	Исходный азот среды, мг	Синтезированная биомасса	Азот всей биомассы
C. guilliermondii 71				
27	NH ₄ ⁺ + глю лей	66	392,6	
		77	—	
28	NH ₄ ⁺ + глю лей+глю лей	66	377,4	29,65
		66	144,2	18,65
		77	—	
31	NH ₄ ⁺ + глю лей+глю лей	66	292,9	18,15
		66	139,4	7,94
		77	—	
C. utilis 106				
32	NH ₄ ⁺ + глю лей+глю лей	66	298,1	18,36
		66	202,5	12,96
		77	—	
C. guilliermondii membranaefaciens 72				
33	NH ₄ ⁺ + глю лей+глю лей	66	356,0	22,07
		66	193,6	15,61
		77	—	

В этих опытах варианты глю + NH₄⁺ служили контрольными. Варианты ала + глю, лей + глю также представляли собой своеобразный контроль, как хорошо изученные. Как показывают экспериментальные данные, максимальный выход биомассы наблюдается в вариантах ала + глю для всех изучаемых штаммов, за исключением *Candida guilliermondii membranaefaciens* 72, что подтверждает данные Инджикян [1]. Это можно объяснить тем, что, по-видимому, аланин является не только источником азота, но и дополнительным источником углерода. Если это предположение соответствует действительности, то при наличии в изучаемых дрожжах ферментных систем дезаминирования аланина, при использовании последнего в качестве единственного источника углерода и азота, наблюдался бы заметный рост биомассы. Однако опыты показывают, что аланин, внесенный без глюкозы, усваивается очень трудно, что выражается в медленных темпах роста и низких показателях биомассы. В первые же часы после латентного периода роста в присутствии аланина чувствуется сильный запах NH₃, наблюдается резкое изменение рН среды в щелочную сторону (рН 7; 8; 9) вследствие интенсивного высвобождения свободного аммиака из аланина. Только после нейтрализации среды 0,1 Н раствором до исходной рН 5,2 начинается рост биомассы. Таким образом, выделившийся из аланина аммиак, смещая рН среды в щелочную сторону, подавляет процессы синтеза биомассы, и только после нейтрализации аммиака создаются условия для роста биомассы.

При этом в процесс синтеза биомассы включается только около 4% от общего количества азота аланина, а остальное количество его остается либо в виде сульфата аммония, образовавшегося при нейтрализации среды в течение инкубации, либо в виде аминокислоты, не подвергнутой дезаминированию.

Однако при оценке полученных данных следует обратить особое внимание на то, что по сравнению с вариантом глю + NH_4^+ в вариантах с аланином соотношение азота к углероду в 2 раза выше, чем в первом. Возникает сомнение, возможно ли, чтоб избыточное количество азота отрицательно влияло на рост биомассы. Для выяснения этого вопроса нами изучалось влияние высоких доз его, превышающих стандартную норму в 2 и 3 раза.

Данные нашей лаборатории, накопленные за последние десять лет, позволяют сделать вывод о том, что в условиях одной углеродной нормы (1 г глюкозы) и одной азотной нормы (66 мг азота — элемента) получаемая биомасса накапливает не более 26—27 мг азота, что составляет около 40% от внесенного в среду.

В условиях азотного избытка при одной углеродной норме синтез биомассы, экономический коэффициент, общий азот в биомассе имеют следующие значения, приведенные в табл. 3.

Таблица 3

Выход биомассы и баланс азота в опытах с повышенным содержанием в синтетической среде для *Candida guilliermondii* 71

№ опыта	Синтезированная биомасса	Теоретический азот	Практический азот	Азот, мг %	Азот всей биомассы	Азот центрифугатов и биомассы	Сумма азота фугата и биомассы	Усвоенная глюкоза	Экономический коэффициент
16	333	66	65,8	6,44	21,44	44,8	66,24	931	35
17	310	66	65,8	6,44	19,96	49,0	68,96	972,8	31
18	306,5	66	65,8	5,88	19,00	38,20	57,20	929	38
19	300	66	65,8	6,16	19,39	44,8	64,19	962	40
16	431	132	131,6	6,16	26,54	117,6	144,11	932	45
17	350	132	130,2	5,88	20,58	119,0	139,58	972,6	35
18	407	132	130,6	5,20	21,16	129,0	150,16	958	41
19	362	132	131,6	5,28	18,75	112,0	130,75	950,4	37
16	340	198	189	5,60	19,04	169	188,04	931,4	35
17	334	198	204	5,60	18,70	186,2	204,90	972	32
18	307	198	196	4,76	14,61	186,8	201,40	969	30
19	358	198	196	4,34	15,53	178,0	193,53	950,8	35

Как видно из представленных данных, избыток $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ среды существенным образом не отражается на процессах синтеза биомассы и расщепления глюкозы. В некоторой степени снижается накопление общего азота в вариантах с тремя нормами NH_4^+ . Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс усвоения NH_4^+ в первую очередь обуславливается количеством глюкозы, являющейся с одной стороны

источником энергии, а с другой — углеродных осколков, получаемых в результате цикла Кребса и необходимых для биосинтеза аминокислот и белков.

Таким образом, полученные данные позволяют нам предположить, что при наличии сходных механизмов усвоение $\text{глю} + \text{NH}_4^+$ и аланина половина азота аланина не должна включаться в процессы синтеза биомассы.

Однако для утверждения вопроса существования единых механизмов усвоения аммония в присутствии глюкозы и аланина необходимо было произвести расчеты экономического коэффициента для всех изучаемых вариантов.

Для сравнения вариантов с глюкозой с вариантами с аланином углерод пирувата пересчитывался в соответственное количество глюкозы. При этом исходили из предположения о том, что образовавшийся пируват полностью используется дрожжами, а избыточное количество NH_3 выделяется.

Расчеты показали, что в большинстве случаев экономический коэффициент при использовании аланина в качестве единственного источника азота и углерода значительно ниже, чем в вариантах $\text{глю} + \text{NH}_4^+$.

Эти данные позволяют нам прийти к заключению, что, хотя значительная часть NH_3 , отщепившаяся из аланина, выделяется, тем не менее в клетке не создаются те оптимальные условия синтеза биомассы, которые имеют место в варианте $\text{глю} + \text{NH}_4^+$. Последнее является доказательством того, что включение аланина в процессы биосинтеза осуществляется иным, менее эффективным механизмом, чем в вариантах $\text{глю} + \text{NH}_4^+$.

Следовательно, можно заключить, что наблюдаемый более заметный прирост биомассы и более высокий экономический коэффициент в варианте $\text{ала} + \text{глю}$ по сравнению с вариантами $\text{глю} + \text{NH}_4^+$ нельзя объяснить эффективным включением углеродного скелета аланина в процессы синтеза биомассы.

Вероятнее всего в варианте $\text{ала} + \text{глю}$ наблюдаемый прирост ее происходит за счет прямого включения аланина как в запасной фонд, так и в структурные белки. Совокупность полученных нами данных доказывает, что, хотя аланин и подвергается интенсивному дезаминированию и часть избыточного аммиака выделяется, тем не менее ни образовавшийся пируват, ни аммиак, а также подвергнувшийся дезаминированию аланин без глюкозы не являются достаточно эффективными субстратами для обеспечения нормального синтеза биомассы. Так или иначе получается, что глюкоза имеет определенное преимущество по сравнению с пируватом. Трудно объяснить механизм этого преимущества, тем более, что согласно данным нашей лаборатории, пируват и глюкоза одинаково стимулируют поглощение O_2 и, стало быть, пируват в качестве энергетического субстрата не уступает глюкозе. Последняя не имеет преимуществ в отношении образования кетокислот-акцепторов трансаминирования.

Преимущество ее, по-видимому, заключается в том, что при окислении ее образуются субстраты и коферменты, необходимые для важнейших биохимических реакций, каковыми являются биосинтез нуклеиновых кислот (рибоза), жирные кислоты (НАДФ H_2) и др.

Лейцин в сочетании с глюкозой приводит к росту биомассы значительно слабее, чем в контрольном варианте с NH_4^+ . Лейцин, внесенный в среду в качестве единственного источника углерода и азота, совершенно не усваивается, pH среды остается без изменения. Очевидно, для исследуемых штаммов лейцин не может служить источником углерода и азота. Это свидетельствует о том, что у исследуемых дрожжей отсутствуют ферменты прямого дезаминирования лейцина, а имеются трансаминазы, обеспечивающие переаминирование лейцина с кетокислотами, образованными в результате цикла Кребса. Действительно, данные Джанибековой [2], полученные по бесклеточным препаратам этих же культур, показали наличие довольно сильной лейцин-2-оксиглутарат аминотрансферазной системы и слабой аланин-2-оксиглутарат аминотрансферазной системы (за исключением *S. utilis* и *S. chevalieri*). Затрудняет объяснение также факт менее активного роста биомассы в варианте лей+глю по сравнению с глю+ NH_4 и тем более с вариантом ала+глю. Это явление можно объяснить двояко: либо для оптимального роста биомассы необходимо некоторое количество свободного аммиака, которое не образуется из лейцина ни путем прямого дезаминирования, ни путем трансдезаминирования его (вследствие чрезвычайно высоких концентраций глюкозы и соответствующих кетокислот); либо лейцин или продукты его обмена оказывают отрицательное влияние на процессы синтеза. Для выяснения этих вопросов необходимы дальнейшие исследования.

Совокупность полученных данных позволяет прийти к заключению, что решающим моментом в усвоении аминокислот, служащих единственным источником углерода и азота, является способность дрожжевой клетки к прямому дезаминированию, а при использовании аминокислот в качестве единственного источника азота в присутствии глюкозы—способность клетки как к переаминированию, так и к дезаминированию, т. е. первоначальные представления о том, что для нормального роста биомассы необходимым является лишь высвобождение аминной группы из аминокислоты независимо от механизма, являются недостаточными. Оптимальные условия для усвоения аминокислот создаются одновременным присутствием ферментативных систем как переаминирования, так и прямого дезаминирования аминокислот.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 19.VI 1972 г.

Լ. Ե. ԼԱՉԻՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

CANDIDA ՑԵՂԻ ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՄՈՏ ԱԼԱՆԻՆԻ ԵՎ ԼԵՅՑԻՆԻ
ՅՈՒՐԱՑՄԱՆ ՈՒՂԻՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Candida ցեղի խմորատնկային օրգանիզմները նկատելի չափով ավելի վատ են յուրացնում ալանինը, որը ազոտի և ածխածնի միակ աղբյուրն է: Վերջինս արտահայտվում է սինթեզված բիոզանգվածի, տնտեսական գործակցի և յուրացված ազոտի ցուցանիշներով:

Գլյուկոզայի բացակայության ժամանակ միջավայրին տրված ալանինը պարունակում է 2,5 անգամ ավելի ազոտ, քան սովորական նորմայի՝ ալանին + գլյուկոզայի, կամ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ի դեպքում (66 մգ):

Այդ իսկ պատճառով մեր կատարած փորձերը վկայում են, որ ավելցուկային $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ը գլյուկոզայի առկայության ժամանակ էական ազդեցություն չի ունենում սինթեզված բիոզանգվածի, տնտեսական գործակցի և յուրացված ազոտի վրա:

Ենթադրվում է, որ բիոզանգվածի լիարժեք սինթեզի համար պահանջվում է գլյուկոզայի առկայությունը միջավայրում, որովհետև վերջինիս բացակայության ժամանակ միայն ամինաթթվի դեզամինացումը դեռևս յուրացման բավարար պայման չէ:

Կարծում ենք, որ միայն գլյուկոզայի առկայության ժամանակ տեղի է ունենում ալանինի ինչպես տրանսամինացման, այնպես էլ դեզամինացման պրոցեսները:

Գլյուկոզայի առկայությամբ լեյցինը ենթարկվում է միայն տրանսամինացման, իսկ բացակայության դեպքում նա բացարձակ չի յուրացվում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Инджикян С. М. Ученые записки ЕГУ, 1, 119—131, 1969.
2. Тер-Карпетян М. А., Джанибекова В. Г. ДАН АрмССР, 48, 3, 164, 1969.
3. Тер-Карпетян М. А., Инджикян С. М. ДАН АрмССР, 48, 2, 104—114, 1969.
4. Abadle F. Annales de l'institute Pasteur, 113, 1, 1967.
5. Meyer H. and Benzimam M. Bull. of the Reseach. Conrecil of Israel, vol. 8, 2, 1959.
6. Schultz A. S., Mc Mannus, DK, Pomper S. Arch. Biochem, 2, 412—419, 1949.