

Л. Р. ТУМАНЯН, М. А. ДАВТЯН

## ВЛИЯНИЕ $\text{NH}_4^+$ И НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ НА ДЫХАНИЕ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* 71

В предыдущих исследованиях относительно влияния различных источников азота (аммиака и аминокислот) на прирост биомассы у представителей дрожжей рода *Candida* [4, 5] было показано, что они ведут себя неодинаково. Эффективность каждой аминокислоты как единственного источника энергии и азота зависит, несомненно, от наличия в клетке ферментных систем, обеспечивающих образование полного набора аминокислот, необходимых для синтеза собственных белков, а также ферментов, окисляющих углеродный скелет аминокислоты с целью обеспечения энергетических потребностей.

Из этих соображений вытекает, что выявление причин разной степени усвояемости различных аминокислот невозможно без изучения вышеупомянутых ферментативных этапов.

Настоящая работа преследует цель выяснить механизм усвоения дрожжами *C. guilliermondii* 71 аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот путем прослеживания обмена их углеродного скелета и  $\text{NH}_2$ -группы в отдельности.

В статье обобщены полученные данные о влиянии этих аминокислот и соответствующих кетокислот на дыхание и брожение дрожжей.

**Методика.** Объектом исследования служили дрожжи *C. guilliermondii* 71, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР.

Опыты проводились с культурой, выращенной в условиях, описанных ранее [9], и собранной в конце экспоненциальной фазы роста (не голодавшая), а также после предварительного глубокого азотного голодания вышеуказанной культуры (в 2% растворе глюкозы в течение 48 час. до расходования не менее 90% глюкозы), голодания в дистиллированной воде (48 час.) и полного голодания (глубокого азотного с последующим суточным голоданием в дистиллированной воде).

Перед опытом дрожжи промывались дважды дистиллированной водой и суспендировались в 0,05 M tris-буфере, pH 5,2.

Дыхание ( $Q_{O_2}$  и  $Q_{CO_2}$ ) оценивалось прямым манометрическим методом Варбурга [7]. Продолжительность инкубации — 2 час., температура среды —  $32^\circ$ , число качаний в минуту — 100—120. Фракционирование углеводов проводилось антроновым методом Морриса в модификации Чанга и Никерсона [10].

Определение АТФ-азной активности дрожжевой суспензии проводилось после предварительного замораживания (смесью NaCl со льдом 1:4, при  $-11$ — $-13^\circ$ ) и оттаивания. В инкубационную среду вносили АТФ (Reanal). Реакцию приостанавливали добавлением 6 мл 6% ТХУ. В контрольном варианте дрожжи добавлялись после ТХУ. Об АТФ-азной активности судили по нарастанию неорганического фосфора в ин-

Таблица 2

Влияние аланина, пирувата и смеси пирувата с  $\text{NH}_4^+$  на дыхание *S. guilliermondii* 71, подвергнутой полному голоданию

В инкубационном сосудике:  $\sim 21$  мг сухих дрожжей; концентрация добавленных субстратов: аланин—0,220 mM; пируват—0,220 mM;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  для пирувата—0,110 mM; объем инкубационной смеси—2 мл

Добавления	$V_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$Q_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$V_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$	ДК	% стимулирования	
						$Q_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$
—	250	5,9	152	3,6	0,61	100	100
Аланин	589	14,1	468	11,2	0,80	235	307
ПВ	439	10,6	364	8,7	0,84	175	240
ПВ + $\text{NH}_4^+$	800	19,3	619	14,8	0,78	320	407

В следующей серии опытов (табл. 3) с использованием аспартата и щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) выяснилось, что ЩУК является более эффективным субстратом, чем  $\alpha$ -кетоглутарат, и почти не уступает пирувату. Наиболее стимулирующее действие на дыхание оказывает аспартат. Последнее обстоятельство является свидетельством того, что, вероятно, в дрожжевой клетке имеются активные ферменты, обеспе-

Таблица 3

Влияние аспартата, ЩУК и смеси ЩУК с  $\text{NH}_4^+$  на дыхание *S. guilliermondii* 71, подвергнутой полному голоданию

В инкубационном сосудике:  $\sim 15$  мг сухих дрожжей; концентрация добавленных субстратов: аспартат—0,166 mM; ЩУК—0,166 mM;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  для смеси со ЩУК—0,083 mM; объем инкубационной смеси—2 мл

Добавления	$V_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$Q_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$V_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$	ДК	% стимулирования	
						$Q_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$G_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$
—	223	7,4	138	4,6	0,61	100	100
Аспартат	713	23,7	1018	33,9	1,44	320	749
ЩУК	356	11,8	518	17,5	1,46	162	386
ЩУК + $\text{NH}_4^+$	619	20,9	599	20,0	0,98	283	749

чивающие дезаминирование аспартата (путем прямого дезаминирования или трансдезаминирования).

При сравнении дыхательных коэффициентов (ДК) окисления изученных субстратов после полного голодания отмечаются высокие значения его в случае со ЩУК и аспартатом. Если при добавлении пирувата и  $\alpha$ -кетоглутарата ДК ниже или близок к 1,0, то ЩУК и аспартат повышают его приблизительно до 1,5.

Вероятнее всего, это обусловлено интенсивным декарбоксилированием их дрожжевыми клетками. Интересно, что во всех экспериментах  $\text{NH}_4^+$  понижает ДК. Следует обратить внимание, что эффект этот обусловлен не подавлением образования  $\text{CO}_2$ , а происходит при одно-

временном усилении как поглощения  $\text{O}_2$ , так и выделения  $\text{CO}_2$ , но с превалированием первого процесса. Это наводит на мысль, что понижение ДК под влиянием  $\text{NH}_4^+$  происходит вследствие более заметного стимулирования ферментов, участвующих в поглощении  $\text{O}_2$ . Можно заключить, что ферменты, обуславливающие выделение  $\text{CO}_2$ , вероятно, проявляют при голодании заметную стабильность, вследствие чего активирование их под действием  $\text{NH}_4^+$  относительно слабее. Таким образом, согласно этим соображениям, эффект на дыхание (как на поглощение  $\text{O}_2$ , так и выделение  $\text{CO}_2$ ) обусловлен состоянием голодавших дрожжей.

С целью подтверждения этого объяснения проведены специальные опыты (табл. 4).

Таблица 4

Влияние  $\text{NH}_4^+$ ,  $\alpha$ -кетоглутарата и их смеси на дыхание неголодавшей культуры *S. guilliermondii* 71

В инкубационном сосудике:  $\sim 18$  мг сухих дрожжей; концентрация добавленных субстратов:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,047 mM; КГ—0,133 mM;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  для смеси с КГ—0,066 mM; объем инкубационной смеси—2 мл

Добавления	$V_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$Q_{\text{O}_2}^{\text{в}}$	$V_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{в}}$	ДК	% стимулирования	
						$Q_{\text{O}_2}^{\text{н}}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{н}}$
—	545	14,6	425	11,3	0,78	100	100
$\text{NH}_4^+$	822	21,8	583	15,6	0,71	151	137
КГ	863	23,1	1070	28,2	1,24	158	251
КГ + $\text{NH}_4^+$	1018	27,4	1282	33,9	1,25	186	301

Приведенные данные наглядно показывают, что при окислении  $\alpha$ -кетоглутарата неголодавшей культурой вышеописанный эффект  $\text{NH}_4^+$  отсутствует.

При анализе совокупности полученных нами данных можно прийти к заключению, что, действительно, эффективность окисления изученных аминокислот зависит как от возможностей клетки отщепить  $\text{NH}_2$ -группу (трансаминированием, и в основном дезаминированием) с образованием соответствующей кетокислоты, так и от возможностей клетки окислить последнюю. Это заключение было подкреплено при изучении окисления валина и лизина.

Данные табл. 5 свидетельствуют о том, что в отсутствие глюкозы поглощение  $\text{O}_2$  протекает значительно слабее при наличии валина и лизина, чем глутамата. Слабовыраженное стимулирование дыхания в присутствии валина и лизина можно объяснить их неспособностью подвергаться прямому дезаминированию, что подтверждается сходством эффекта этих аминокислот с эффектом глутамата в условиях, оптимальных для трансаминирования (добавление глюкозы). Это согласуется с данными других исследователей относительно интенсивного трансаминирования этих аминокислот нашим объектом [2].

В специальной серии опытов с целью выяснения вышепредложенного механизма действия  $\text{NH}_4^+$  на дыхание дрожжей путем возможного

Таблица 5

Влияние валина, лизина и глутамата на дыхание *S. guilliermondii* 71, подвергнутой полному голоданию, в отсутствии и присутствии глюкозы  
 В инкубационном сосудике: ~15 мг сухих дрожжей; концентрация добавленных субстратов: валин—0,094 mM; лизин—0,094 mM; глутамат—0,094 mM; глюкоза—0,111 mM; объем инкубационной смеси—2 мл

Добавления	$V_{O_2}^B$	$Q_{O_2}^B$	$V_{CO_2}^B$	$Q_{CO_2}^B$	ДК	% стимулирования	
						$Q_{O_2}^B$	$Q_{CO_2}^B$
Без глюкозы							
—	342	11,1	210	6,8	0,62	100	100
Валин	530	17,4	368	11,9	0,69	155	175
Лизин	513	16,6	319	10,6	0,62	155	151
Глутамат	782	26,0	858	28,4	1,09	229	408
В присутствии глюкозы							
—	709	23,0	833	27,0	1,17	100	100
Валин	829	26,9	825	26,8	0,99	177	99
Лизин	927	29,9	977	31,1	1,06	130	116
Глутамат	943	30,6	1077	34,7	1,12	132	129

амидирования белков нами исследовалось влияние его на уровень эндогенных углеводов. Приведенные в табл. 6 значения показывают, что под влиянием  $NH_4^+$  происходит некоторое понижение суммарного количества углеводов, причем оно имеет место за счет ТХУ—экстрагируемой фракции (трегалоза). В присутствии глюкозы наблюдается повышение уровня суммарного содержания углеводов с преимущественным увеличением той же фракции. При добавлении  $NH_4^+$  к глюкозе общий уровень углеводов понижается, причем количество ТХУ-экстрагируемой фракции—значительно. Эти данные свидетельствуют о том, что  $NH_4^+$  стимулирует дыхание, вероятно, за счет расходования преимущественно трегалозы. Этот эффект  $NH_4^+$  можно было бы объяснить усилением расходования моносахаридов с понижением их уровня в клетке, что, в свою очередь, привело бы к расходованию поли- и дисахаридов. Однако подобное объяснение несостоятельно, ибо в использованной нами голодавшей культуре отсутствуют моносахариды и, следовательно, имеются благоприятные условия для расщепления поли- и дисахаридов. Поэтому высокий уровень в голодающих клетках указанных поли- и дисахаридов является скорее следствием пониженной активности расщепляющих их ферментов, и понижение их уровня с добавлением  $NH_4^+$  происходит, вероятно, вследствие активирования ферментов (возможно, путем амидирования).

С этим объяснением полностью согласуются результаты наших исследований относительно АТР-азной активности суспензии *S. guilliermondii* 71. Интересно, что она проявляет АТР-азную активность после замораживания и оттаивания, причем эта обработка не лишает их жизнеспособности (проявляют нормальный рост). Хотя роль этого фермента предстоит выяснить, мы можем утверждать, что он участвует в реали-

зации энергии макроэргической связи для той или иной биологической работы. Можно было ожидать особенно высокую активность этого фермента у клеток, подвергнутых глубокому азотному голоданию, резко нуждающихся в энергии. Однако, как показали наши исследования, они вовсе не обнаруживают АТР-азной активности в отличие от неголодавших и голодавших в дистиллированной воде. Таким образом, клетки, подвергнутые глубокому азотному голоданию и сильно нуждающиеся в энергии АТР, не в силах реализовать готовую энергию, вероятно, вследствие понижения активности соответствующих ферментов (возможно, вследствие дезамидирования). Это является доказательством пониженной активности ферментных систем после голодания.

Таблица 6

Количество углеводных фракций *C. guilliermondii* 71, подвергнутой полному голоданию, при инкубировании в присутствии  $\text{NH}_4^+$ , глюкозы и их смеси, мг% от абсолютно сухих дрожжей

Добавления	ТХУ-экстрагируемая (трегалоза)	Гликоген (щел. экстрагируемый)	Гликоген (кисл. экстрагируемый)	Маннан	Глюкан
—	1,12	1,69	0,59	28,24	18,50
$\text{NH}_4^+$	0,51	2,82	0,58	26,27	17,23
Глюкоза	1,10	4,37	1,72	25,70	22,88
Глю + $\text{NH}_4^+$	0,16	2,54	0,62	27,68	18,50

Совокупность приведенных в статье экспериментальных данных убеждает в том, что эффективность аминокислот в стимулировании дыхания дрожжей обусловлена в первую очередь наличием ферментов, обеспечивающих отщепление  $\text{NH}_2$ -группы (либо трансаминированием, либо прямым дезаминированием), а также окисляющих ее углеродный скелет. Полученные данные позволяют нам прийти к заключению, что наблюдаемое под влиянием  $\text{NH}_4^+$  стимулирование дыхания определяется не включением последнего в обменные процессы (прямое аминирование, биосинтетические реакции), а обусловлено, вероятно, прямым активирующим влиянием его на ферменты голодавших клеток (возможно, их амидированием).

Ереванский государственный университет,  
проблемная лаборатория сравнительной  
и эволюционной биохимии

Поступило 11.IV 1972 г.

Լ. Բ. ԹՈՒՄԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

$\text{NH}_4^+$ -ի եւ գլյուկոզի ազդեցութեամբ *C. guilliermondii* 71-ի քիմիական կազմը  
CANDIDA GUILLIERMONDII 71 ԽՈՐԱՍՆԿԻ ՇՆՉԱԹՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Ուսումնասիրվել է  $\alpha$ -ալանինի, գլյուտամինաթթվի, ասպարադինաթթվի, փրիինի և վալինի ազդեցությունը *C. guilliermondii* 71 խմորասնկի շնչառու-

Таблица 5

Влияние валина, лизина и глутамата на дыхание *S. guilliermondii* 71, подвергнутой полному голоданию, в отсутствие и присутствии глюкозы

В инкубационном сосудике: ~15 мг сухих дрожжей; концентрация добавленных субстратов: валин—0,094 mM; лизин—0,094 mM; глутамат—0,094 mM; глюкоза—0,111 mM; объем инкубационной смеси—2 мл

Добавления	$V_{O_2}^B$	$Q_{O_2}^B$	$V_{CO_2}^B$	$Q_{CO_2}^B$	ДК	% стимулирования	
						$Q_{O_2}^B$	$Q_{CO_2}^B$
Без глюкозы							
—	342	11,1	210	6,8	0,62	100	100
Валин	530	17,4	368	11,9	0,69	155	175
Лизин	513	16,6	319	10,6	0,62	155	151
Глутамат	782	26,0	858	28,4	1,09	229	408
В присутствии глюкозы							
—	709	23,0	833	27,0	1,17	100	100
Валин	829	26,9	825	26,8	0,99	177	99
Лизин	927	29,9	977	31,1	1,06	130	116
Глутамат	943	30,6	1077	34,7	1,12	132	129

амидирования белков нами исследовалось влияние его на уровень эндогенных углеводов. Приведенные в табл. 6 значения показывают, что под влиянием  $NH_4^+$  происходит некоторое понижение суммарного количества углеводов, причем оно имеет место за счет ТХУ—экстрагируемой фракции (трегалоза). В присутствии глюкозы наблюдается повышение уровня суммарного содержания углеводов с преимущественным увеличением той же фракции. При добавлении  $NH_4^+$  к глюкозе общий уровень углеводов понижается, причем количество ТХУ-экстрагируемой фракции—значительно. Эти данные свидетельствуют о том, что  $NH_4^+$  стимулирует дыхание, вероятно, за счет расходования преимущественно трегалозы. Этот эффект  $NH_4^+$  можно было бы объяснить усилением расходования моносахаридов с понижением их уровня в клетке, что, в свою очередь, привело бы к расходованию поли- и дисахаридов. Однако подобное объяснение несостоятельно, ибо в использованной нами голодавшей культуре отсутствуют моносахариды и, следовательно, имеются благоприятные условия для расщепления поли- и дисахаридов. Поэтому высокий уровень в голодающих клетках указанных поли- и дисахаридов является скорее следствием пониженной активности расщепляющих их ферментов, и понижение их уровня с добавлением  $NH_4^+$  происходит, вероятно, вследствие активирования ферментов (возможно, путем амидирования).

С этим объяснением полностью согласуются результаты наших исследований относительно АТР-азной активности суспензии *S. guilliermondii* 71. Интересно, что она проявляет АТР-азную активность после замораживания и оттаивания, причем эта обработка не лишает их жизнеспособности (проявляют нормальный рост). Хотя роль этого фермента предстоит выяснить, мы можем утверждать, что он участвует в реали-

зации энергии макроэргической связи для той или иной биологической работы. Можно было ожидать особенно высокую активность этого фермента у клеток, подвергнутых глубокому азотному голоданию, резко нуждающихся в энергии. Однако, как показали наши исследования, они вообще не обнаруживают АТР-азной активности в отличие от неголодавших и голодавших в дистиллированной воде. Таким образом, клетки, подвергнутые глубокому азотному голоданию и сильно нуждающиеся в энергии АТР, не в силах реализовать готовую энергию, вероятно, вследствие понижения активности соответствующих ферментов (возможно, вследствие дезамидирования). Это является доказательством пониженной активности ферментных систем после голодания.

Таблица 6

Количество углеводных фракций *C. guilliermondii* 71, подвергнутой полному голоданию, при инкубировании в присутствии  $\text{NH}_4^+$ , глюкозы и их смеси, мг% от абсолютно сухих дрожжей

Добавления	ТХУ-экстрагируемая трегалоза)	Гликоген (щел. экстрагируемый)	Гликоген (кисл. экстрагируемый)	Маннан	Глюкан
—	1,12	1,69	0,59	28,24	18,50
$\text{NH}_4^+$	0,51	2,82	0,58	26,27	17,23
Глюкоза	1,10	4,37	1,72	25,70	22,88
Глю + $\text{NH}_4^+$	0,16	2,54	0,62	27,68	18,50

Совокупность приведенных в статье экспериментальных данных убеждает в том, что эффективность аминокислот в стимулировании дыхания дрожжей обусловлена в первую очередь наличием ферментов, обеспечивающих отщепление  $\text{NH}_2$ -группы (либо трансаминированием, либо прямым дезаминированием), а также окисляющих ее углеродный скелет. Полученные данные позволяют нам прийти к заключению, что наблюдаемое под влиянием  $\text{NH}_4^+$  стимулирование дыхания определяется не включением последнего в обменные процессы (прямое аминирование, биосинтетические реакции), а обусловлено, вероятно, прямым активирующим влиянием его на ферменты голодавших клеток (возможно, их амидированием).

Ереванский государственный университет,  
проблемная лаборатория сравнительной  
и эволюционной биохимии

Поступило 11.IV 1972 г.

Լ. Բ. ԹՈՒՄԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

$\text{NH}_4^+$ -ի եւ գլյուկոզի ազդեցութեամբ *C. guilliermondii* 71-ի քիմիական կազմը  
CANDIDA GUILLIERMONDII 71 ԽՈՐԱՍՆԿԻ ՇՆՉԱԹՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Ուսումնասիրվել է  $\alpha$ -ալանինի, գլյուտամինաթթվի, ասպարագինաթթվի, փրիինի և վալինի ազդեցությունը *C. guilliermondii* 71 խմորասնկի շնչառու-

թյան վրա: Ապացուցվել է, որ գոյություն ունի խիստ համապատասխանություն ամինաթթվի և նրա կետոածանցյալի միջև՝ շնչառության խթանման տեսակետից: Շնչառական լավ սուբստրատներ են հատկապես պիրոխաղողաթթուն և օքսալաքացախաթթուն, իսկ  $\alpha$ -կետոգլուտարաթթուն այդ տեսակետից զգալի զիջում է առաջիններին: Մյուս կողմից՝ ամենաէֆեկտիվ սուբստրատը ամինաթթուներից ասպարագինաթթուն է, ապա գլուտամինաթթուն, որոնց զիջում է ալանինը: Այս սվյալները վկայում են այն մասին, որ էֆեկտիվ սուբստրատ լինելու համար նշանակություն ունի ոչ միայն ամինաթթվի համապատասխան կետոածանցյալի էֆեկտիվությունը, այլ նաև բջջի ներսում սվյալ ամինաթթուն դեամինացնող (ուղղակի դեամինացմամբ կամ տրանս-դեամինացմամբ) ֆերմենտների առկայությունը և ակտիվությունը:

Լիզինը և վալինը վատ սուբստրատներ են շնչառության համար, բայց տրանսամինացման օպտիմալ պայմաններ ստեղծելու դեպքում (գլյուկոզայի ավելացնում) նրանք էլ ստիմուլում են շնչառությունը:

Կատարվել են հատուկ փորձեր ապացուցելու  $\text{NH}_4^+$ -ի շնչառության վրա ունեցող ստիմուլող էֆեկտը: Պարզվել է, որ  $\text{NH}_4^+$ -ի ազդեցության տակ շնչառության խթանմանը զուգահեռ, նկատվում է խմորասնկի տրեգալոզային ֆրակցիայի պակասում: Մեր կարծիքով  $\text{NH}_4^+$ -ը ուղղակի ստիմուլում է քաղցի հետևանքով խիստ ընկճված ֆերմենտների գործունեությունը (այդ թվում նաև տրեգալոզայի յուրացումը պայմանավորող ֆերմենտների): Միևնույն ժամանակ չի ժխտվում, որ  $\text{NH}_4^+$ -ը ֆերմենտների վրա իր ազդեցությունը իրականացնում է նրանց ամիդացնելու միջոցով:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Векслер Я. И. III Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы. Сб. докладов. Ереван, 1962.
2. Джанибекова В. Г., Бобохидзе Е. А. и Тер-Карпетян М. А. Биологический журнал Армении, XXIV, 5, 1971.
3. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.
4. Тер-Карпетян М. А., Инджикян С. М. и Чубарян С. В. Биологический журнал Армении, XXI, 1, 1968.
5. Тер-Карпетян М. А., Макарова Е. Н. и др. Тезисы IX Международного конгресса по микробиологии. 1966.
6. Тяхяпыльд Л. Я. ДАН СССР, 147, 1962.
7. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х. и Штауффер Дж. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., 1951.
8. Чанс Б. Сб. Регуляция клеточного обмена. М., 1962.
9. Чубарян С. В., Тер-Карпетян М. А. и Туманян Л. Р. Биологический журнал Армении, XXIV, 8, 1971.
10. Chung C. W. and Nickerson W. J. J. Biol. Chem. 201, 1, 395, 1954.
11. Dobry A. and Sturtevant J. M. J. Biol. Chem. 195, 141, 1952.
12. Halvorson H. O. and Spiegelman S. J. Bact. 65, 5, 496, 1953.
13. Ungar G., Aschkin E., Psychoys S. and Romano D. V. J. Gen. Physiol., 40, 635, 1957.