

Л. А. НАВАСАРДЯН, Е. Г. БАГДАСАРЯН, М. А. ДАВТЯН

ИЗМЕНЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* 71 ПРИ АЗОТНОМ ГОЛОДАНИИ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВАЛИНА- N^{15}

При азотном голодании дрожжей *C. guilliermondii* 71 помимо количественных изменений происходят также качественные сдвиги в белках водорастворимой фракции. После восьмичасовой инкубации культуры в присутствии валина- N^{15} наблюдается тенденция к восстановлению водорастворимых белков. Полученные данные приводят к выводу о ресинтезе белков водорастворимой фракции за счет катаболизма других белковых фракций, в частности щелочерастворимых белков, количество которых в указанных условиях понижается. Однако, как показывают данные по включению N^{15} в щелочерастворимую фракцию, одновременно происходит и синтез этой фракции.

В предыдущих наших исследованиях [2] было показано, что при азотном голодании у дрожжей *C. guilliermondii* 71 происходят глубокие количественные и качественные сдвиги в белковых фракциях. В частности, наряду с наблюдаемым понижением количества водорастворимой фракции значительно увеличивается содержание щелочерастворимых белков.

Сопоставление данных по содержанию общего азота и белка, определенного методом Лоури, позволило заключить о возможных качественных сдвигах белковых фракций при голодании.

С целью более глубокого изучения данного вопроса в новой серии экспериментов помимо общего азота изучались показатели аминного азота и аминокислотного состава белковых фракций при азотном голодании *C. guilliermondii* 71. При этом особое внимание обращалось на щелочерастворимые и водорастворимые белки.

Подробно исследовались также изменения обменного фонда аминокислот и водорастворимого (небелкового) азота. Специальные серии опытов были посвящены изучению изменения всех указанных показателей белковых фракций при инкубации голодающих по азоту дрожжей в присутствии меченого валина- N^{15} . При этом мы исходили из предположения, что инкубация голодающих культур в присутствии источника азота (валина) должна привести к восстановлению исходного соотношения количественного и качественного составов белковых фракций.

Материал и методика Способы выращивания культуры *C. guilliermondii* 71, азотного голодания и фракционирования белков после гомогенизации дрожжевых клеток описаны в нашей предыдущей работе [2].

Голодающая по азоту культура *C. guilliermondii* 71 подвергалась восьмичасовой инкубации в синтетической среде с валин- N^{15} в качестве источника азота (атомный %

N¹⁵-валина 9,2). После инкубации биомассу центрифугировали, дважды промывали дистиллированной водой и подвергали гомогенизации. Затем водорастворимую фракцию разделяли на белковые и небелковые азотсодержащие части колоночным методом, с применением сефадекса G-25

Окончательное заключение о накоплении валина-N¹⁵ в дрожжевой клетке и распределении его внутри между отдельными фракциями белка делалось на основании данных масс-спектрометра.

Пробы, предназначенные для масс-спектрометрического анализа, предварительно подвергались соответствующей обработке.

Приготовление и анализ образцов N¹⁵ в отдельных фракциях белков проводились по методике Бернарда [1].

Содержание N¹⁵ в атомных процентах определялось по формуле

$$N^{15} = \frac{N^{14}N^{15} + 2(N^{15}N^{15})}{2(N^{14}N^{14} + N^{14}N^{15} + N^{15}N^{15})} \times 100\%$$

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов исследовалась водорастворимая фракция, которая, согласно предыдущим нашим исследованиям, при азотном голодании уменьшалась.

С целью выявления компонентов, за счет которых произошло указанное уменьшение, эта фракция разделялась на колонке с сефадексом G-25 на белковые и небелковые азотсодержащие части, в которых определялись содержание общего азота, белка (по Лоури) и аминокислотный состав.

Таблица 1

Количество общего азота, белка по общему азоту и по Лоури в водорастворимой и щелочерастворимой фракциях, а также общего азота небелковых азотсодержащих соединений дрожжей *S. guilliermondii* 71, мг на 100 мг абс. сух. дрожжей

Фракции	До голодания			После голодания			Инкубация на валине—N ¹⁵ , t = 8 час.		
	общий азот	белок по общему азоту	белок по Лоури	общий азот	белок по общему азоту	белок по Лоури	общий азот	белок по общему азоту	белок по Лоури
Водорастворимая	1,56	9,75	14	0,51	3,2	5,3	0,78	4,9	7,3
Щелочерастворимая I и II	1,03	6,43	6,43	1,23	7,7	9,1	1,1	6,9	8,6
Небелковые азотсодержащие соединения	0,83	—	—	0,14	—	—	0,80	—	—

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что в исходной культуре содержится 1,56 мг белкового азота и 0,83 мг азота небелковых водорастворимых соединений на 100 мг биомассы, а при голодании эти величины падают соответственно до 0,51 мг и 0,14 мг, т. е. уменьшаются почти в три и шесть раз соответственно. Таким образом, при голодании наблюдаемое уменьшение водорастворимой фракции происходит как за счет белков, так и небелковых азотсодержащих соединений. Интересно сопоставление количества белка, определенного по Лоури, с содержанием белкового азота. Белок по Лоури в исходной культуре составляет

14 мг на 100 мг дрожжей, а количество белка, определяемого по общему азоту, составляет 9,57 мг на 100 мг дрожжей. Эти величины после голодания соответственно составляют 5,3 и 3,2 мг, т. е. данные, полученные при определении белка двумя способами, резко расходятся. По-видимому, при голодании, помимо количественных, произошли и качественные сдвиги в водорастворимых белках, что и отразилось на интенсивности окраски с реактивом Фолина.

Действительно, полученные хроматограммы гидролизатов водорастворимых белков показывают некоторые различия в аминокислотном составе последних до и после голодания. После голодания заметно повышается процентное содержание лизина, гистидина, аспартата и серина и несколько понижается количество валина (табл. 2). По-видимому, при голодании не все подфракции водорастворимых белков уменьшаются равномерно.

Таблица 2

Аминокислотный состав водорастворимой и щелочерастворимой фракции белка дрожжей *S. guilliermondii* 71, количество аминокислот, моль

Аминокислоты	Водорастворимая фракция			Щелочерастворимая фракция		
	исходная культура	голодающая культура	инкубация на валине- ¹⁵ , t = 8 час.	исходная культура	голодающая культура	инкубация на валине- ¹⁵ , t = 8 час.
Цистеин	8,4	9,3	10	—	—	—
Лизин + гистидин	10,9	15,2	13	20,6	21	19
Аргинин	5,8	4,7	5,8	6	5,7	4,4
Аспарагиновая кислота	15,7	21	15,7	5,4	4,8	4,7
Глицин	8	8,1	7,8	6,3	8,4	6,5
Глутаминовая кислота + треонин	18,8	19	17,4	24	24,5	23,6
Аланин	10,8	10,2	10,2	11,4	12	11,6
Тирозин	4,2	3	4	2,7	3,3	3,47
Валин	4,3	1,3	5	6	6,3	7,63
Фенилаланин	3,2	1	1,5	4,3	2	4,7
Лейцин	9,4	7,5	9,4	14	12	14,5

При хроматографическом анализе на бумаге небелковой азотсодержащей фракции, которая в литературе известна как свободный или обменный пул аминокислот, оказалось, что она в течение голодания значительно обедняется аминокислотами.

При восьмичасовой инкубации голодающей культуры в присутствии меченого валина-¹⁵ наблюдается обратная картина, а именно показатели общего азота и белка, а также свободного фонда приближаются к величинам неголодающей культуры. Интересно, что при этом восстанавливается нормальное процентное соотношение аминокислот белков водорастворимой фракции (табл. 2).

Однако следует подчеркнуть, что темпы восстановления свободного пула более выражены. Это находит свое отражение также при исследовании удельного содержания ¹⁵N в указанных фракциях.

Таблица 3
Содержание N¹⁵ и N¹⁴ в отдельных белковых фракциях и в свободном пуле дрожжей *S. guilliermondii* 71 после восьмичасовой инкубации на валине — N¹⁵, %

Фракции	% N ¹⁵	% N ¹⁴
Водорастворимая	1,34	98,64
Солерастворимая	3,1	96,9
Спирторастворимая	1,7	98,3
Щелочерастворимая I и II	1,12	98,88
Свободный пул	7,1	92,9

Данные табл. 3 показывают, что процентное содержание N¹⁵ после восьмичасовой инкубации в водорастворимой фракции достигает 1,34, а в свободном пуле—7,1. Полученные данные вполне объяснимы, ибо включение аминокислот в биосинтез белков происходит после их предварительного включения в обменный фонд. Однако следует обратить внимание на тот факт, что в этих экспериментах процентное соотношение N¹⁵ в инкубационной среде составляет 9,2, и если бы восстановление обменного фонда аминокислот происходило бы за счет азота меченого валина, то процентное содержание последнего должно было быть значительно выше полученного нами. Содержание азота водорастворимой фракции в указанных условиях увеличивается на 40%. Следовательно, если это восстановление произошло бы за счет меченого валина среды, то теоретически процентное содержание азота N¹⁵ в этой фракции должно было быть 2,9 взамен обнаруженного нами 1,34. Полученные данные наводят на мысль о том, что ресинтез белков этой фракции, а также в некоторой степени обменного фонда аминокислот происходит и за счет аминокислот, образующихся при катаболизме других белков. По всей вероятности, ресинтез водорастворимых белков идет за счет аминокислот щелочерастворимых белков, количество которых, как было показано [2], при азотном голодании резко возрастает.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что при азотном голодании несколько возрастает содержание общего азота и белка в щелочерастворимой фракции. Если учесть, что при этом увеличивается количество биомассы на 50—60% [2], то значит действительный прирост белка и общего азота в щелочерастворимой фракции при голодании значительно выше приведенных в таблице данных.

Интересно, что и в этом случае после голодания становится более выраженным расхождение между количеством белка, определяемым двумя различными способами. Так, если до голодания количество белка, определяемого методом Лоури и по общему азоту совпадают, то после голодания при определении по общему азоту оно выражается в значительно заниженных цифрах по сравнению с методом Лоури. Это свидетельствует о том, что при голодании происходят не только количественные, но и качественные сдвиги в щелочерастворимой фракции. По-видимому, при голодании происходит неравномерный биосинтез под-

фракции щелочерастворимых белков. Не исключается, что при этом преимущественно происходит биосинтез определенной подфракции (или нескольких подфракций), имеющих значение при голодании. Хроматографический анализ (табл. 2) гидролизатов щелочерастворимых белков, однако, не обнаруживает выраженного различия в процентном соотношении белков до и после голодания, а также после восьмичасовой инкубации в присутствии меченого валина. По-видимому, различные подфракции щелочерастворимых белков не особенно отличаются по аминокислотному составу.

При восьмичасовой инкубации в присутствии валина- N^{15} понижается содержание общего азота и белка щелочерастворимой фракции и приближается к значению аналогичных показателей неголодающей культуры.

В общих чертах можно заключить, что при голодании происходит увеличение щелочерастворимых белков за счет водорастворимых фракций, а при инкубации в присутствии азота (валина— N^{15}), наоборот, увеличивается содержание водорастворимых белков за счет щелочерастворимых.

Приведенные в табл. 1, 3 данные наглядно показывают, что хотя при инкубации в присутствии источника азота происходит понижение содержания щелочерастворимых белков, одновременно происходят и биосинтетические процессы в этой фракции, так как обнаруживается 1,12% N^{15} . Это, по-видимому, связано с тем, что различные подфракции щелочерастворимых белков по-разному реагируют на азотное голодание, а также при инкубации в присутствии источника азота. По всей вероятности, как уже было сказано выше, у дрожжей имеется особая подфракция (или несколько подфракций) щелочерастворимых белков, которая усиленно синтезируется при голодании и, наоборот, катаболизируется в присутствии источника азота.

Приведенные в табл. 3 данные показывают, что происходят биосинтетические процессы и в остальных белковых фракциях, так как в них также обнаруживается включение N^{15} . Однако происходящие изменения в этих фракциях вряд ли могут играть существенную роль в количественном балансе и распределении азота в клетках, ибо содержание азота в них весьма незначительно.

Как уже выше отмечалось, при восьмичасовой инкубации в присутствии валина- N^{15} в водорастворимых белках обнаруживается N^{15} значительно ниже теоретически ожидаемых величин. На основании этого сделано заключение о ресинтезе водорастворимых белков за счет катаболизма щелочерастворимых белков. Можно было бы предположить, что образовавшиеся при катаболизме щелочерастворимые белки должны пройти в свободный пул аминокислот и далее вовлечься в биосинтетические процессы. Однако данные таблицы показывают, что процентное содержание N^{15} в свободном пуле близко таковому в среде (7,1 и 9,2 соответственно), т. е. не происходит ожидаемое разбавление N^{15} в свободном пуле.

На основании этого можно прийти к заключению, что ретулизация аминокислот белкового катаболизма может осуществляться минуя свободный пул, что согласуется с мнением некоторых авторов [3].

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 25.VII 1973 г.

Լ. Հ. ՆԱՎԱՍԱՐԴՅԱՆ, Ե. Դ. ԲԱԳԴԱՍԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

CANDIDA GUILLIERMONDII 71 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ
ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱԶՈՏԱՅԻՆ ՔԱՂՑԻ ԵՎ ՎԱԼԻՆ—N¹⁵-Ի
ՕԴՏԱԴՈՐԾՄԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Candida guilliermondii 71 խմորասնկերի տզոտային բաղցի դեպքում նրանց ջրալուծ սպիտակուցային ֆրակցիաներում բացի քանակական փոփոխություններից, տեղի են ունենում նաև որակական տեղաշարժեր: Այդ խմորասնկերի կուլտուրան վալին-N¹⁵-ի վրա, սինթետիկ միջավայրում, ինկուբացիայից հետո առաջացնում է ջրալուծ ֆրակցիայի սպիտակուցների վերականգնման տենդենց: Ստացված տվյալներից պարզվում է, որ տեղի է ունենում ջրալուծ ֆրակցիայի սպիտակուցների ռեսինթեզ ուրիշ սպիտակուցային ֆրակցիաների կատաբոլիզմի հաշվին ևս՝ մասնավորապես հիմնալուծ ֆրակցիայի, որոնց քանակը վալին-N¹⁵-ի վրա, ինկուբացիայի դեպքում, իջնում է: Սակայն ինչպես ցույց են տալիս հիմնալուծ սպիտակուցային ֆրակցիաների մեջ N¹⁵-ի ներգրավման վերաբերյալ եղած տվյալները միաժամանակ տեղի է ունենում այդ ֆրակցիայի սպիտակուցների սինթեզ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Барнард Дж. Современная масс-спектрометрия. М., 1957.
2. Давтян М. А., Багдасарян Е. Г., Навасардян Л. А. Биологический журнал Армении. 26, 4, 1973.
3. Piergiorgio R. P. and Geoge W. J. Biolog. chem. 246, 18:5724, 1971.