

Ю. Г. ПОПОВ, М. А. ДАВТЯН

УСВОЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ СЕМЕЙСТВА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ ЕДИНСТВЕННОГО ИСТОЧНИКА АЗОТА ДРОЖЖАМИ РОДА CANDIDA

II. Влияние на накопление азота и содержание свободных внутриклеточных аминокислот

При росте на изoleyцине отмечается небольшой выход биомассы с высоким содержанием общего азота. Наибольшие количества азота спирторастворимой фракции обнаружены в основном при использовании аспарагина, аспарагиновой кислоты и метионина. Однако между различными культурами могут быть значительные расхождения. Получены данные, свидетельствующие о том, что интенсивность биосинтеза определяется не только абсолютным содержанием, но и соотношением отдельных аминокислот в пуле, а также наличием других азотсодержащих соединений.

Спирторастворимая фракция аминокислот представляет собою наиболее лабильную часть азотсодержащих соединений клеток и подвергается значительным изменениям в зависимости от физиологического состояния клетки, источников питания и прочих условий культивирования.

Ввиду большой роли свободных внутриклеточных аминокислот в метаболизме микроорганизмов, в том числе дрожжей, их изучение привлекает внимание все большего числа исследователей. Значительный интерес представляют работы по изучению влияния отдельных аминокислот в качестве единственных источников азота на состав свободных внутриклеточных аминокислот. На дрожжах рода *Candida* было изучено содержание азота и аминокислот спирторастворимой фракции при усвоении аминокислот семейств пировиноградной и глутаминовой кислот [1, 5]. Представляет интерес изучение на этих же объектах и специфического действия аминокислот семейства аспарагиновой кислоты. В предыдущем сообщении нами приводились данные о влиянии этих аминокислот на некоторые стороны аэробной жизнедеятельности восьми штаммов дрожжей рода *Candida* [3]. Целью настоящей работы было изучение на тех же представителях влияния аминокислот семейства аспарагиновой кислоты и аспарагина как единственных источников азота на накопление общего и спирторастворимого азота, а также состав спирторастворимых аминокислот.

Материал и методика. Объектами исследования служили *C. chevallieri* 66, *C. guilliermondii* 71, *C. guilliermondii* var. *membranaciactens* 72, *C. utilis* 106, *C. tropicalis* DH-3, *C. arborea* 64 и *C. pulcherrima* 95, полученные из отдела типовых

культур Института микробиологии АН СССР, и *C. tropicalis* КЗ—10, полученный из отдела технологии кормов и биохимии АрмНИИ животноводства и ветеринарии.

Состав культуральной среды, способ подготовки посевного материала и методика проведения эксперимента приведены в предыдущей работе [3]. В полученной в двух сериях опытов биомассе (часть колб снималась с качалки к моменту почти полного расхода сахара в каждой из них) микрометодом Кьельдаля определялся общий азот, а методом хроматографии на бумаге—аминокислоты. Определения проводились также в исходной, голодающей по азоту культуре (посевной материал). Эти данные вместе с данными, полученными в варианте с сульфатом аммония, служили контролем.

Для определения спирторастворимых аминокислот биомасса дрожжей экстрагировалась в 80% этиловом спирте с модулем 30 при 75—80° в течение 1 часа. Распределение аминокислот проводилось нисходящим способом в растворителе бутанол-уксусная кислота-вода в соотношении 4:1:1 путем его шестикратного пропускания. Аминокислоты проявлялись 0,2% раствором нингидрина в ацетоне, пятна аминокислот элюировались в 0,1% растворе CdCl_2 и 60% метиловом спирте; полученные растворы фотометрировались согласно методике Лисицкого и Лорана [7].

Результаты и обсуждение. Влияние источников азота на накопление общего азота биомассы и спирторастворимой фракции. Полученные данные приведены в табл. 1. В голодающих культурах содержание общего азота по сравнению с культурами, выращенными на любом из испытанных источников азота, значительно понижено. Наименьшее количество азота наблюдается у *C. tropicalis* КЗ—10 и *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, наибольшее — у *C. pulcherrima* и *C. chevalieri*. Эти две культуры выгодно отличаются от всех остальных также и по уровню азота при усвоении сульфата аммония (соответственно 6,6 и 7,4%), хотя по выходу биомассы, удельной скорости роста и др. биохимическим показателям весьма сильно разнятся друг от друга. Уровень азота у *C. tropicalis* ДН-3 и у *C. utilis* при усвоении сульфата аммония низок (5,3—5,6%), что согласуется с данными Тер-Карапетяна с сотр. [5] и Макаровой [1]. Остальные культуры занимают промежуточное положение.

Отдельные аминокислоты по-разному влияют на процесс накопления азота в клетках разных культур. У всех культур в присутствии тех или иных аминокислот можно наблюдать более высокое содержание общего азота, чем при усвоении сульфата аммония. Наибольшему накоплению азота у большинства культур способствуют аспарагин, аспарагиновая кислота и изолейцин. При этом не всегда наблюдается четкая корреляция между влиянием аминокислоты на содержание общего азота и ее усвояемостью, оцениваемой по экономическому коэффициенту синтеза биомассы, удельной скорости роста и скорости потребления глюкозы. Так, например, максимальное накопление общего азота в биомассе *C. chevalieri* наблюдается на метионине, у *C. guilliermondii* — на треонине, хотя, как и большинством исследованных культур, ими лучше всего усваиваются аспарагин и аспарагиновая кислота [3]. Среди исследуемых культур наименее интенсивно биосинтез протекает у *C. pulcherrima*, особенно при усвоении аспарагиновой кислоты. И тем не менее у этой культуры, на общем фоне повышенного количества азота при любом из испытанных его источников, именно на аспарагиновой кислоте наблюдает-

Таблица 1

Влияние источников азота на содержание общего азота в биомассе и в ее спирторастворимой фракции, мг%

Культура		Исходная культура	Источники азота					
			NH_4^+	асп- NH_2	асп	тре	мет	илей
<i>C. chevalieri</i>	1	4,8	6,6	5,4	6,3	5,8	7,3	7,2
	2	0,9	1,3	1,4	1,4	1,4	1,8	1,5
<i>C. guilliermondii</i> var. <i>membranaefaciens</i>	1	3,2	6,2	7,6	6,7	5,9	6,0	7,4
	2	0,4	1,5	2,2	1,6	1,7	2,2	1,8
<i>C. guilliermondii</i>	1	3,7	5,7	6,2	6,4	7,0	4,8	5,2
	2	0,8	1,4	1,8	1,9	1,9	2,1	1,6
<i>C. utilis</i>	1	3,5	5,6	6,6	6,0	5,8	5,3	6,4
	2	0,8	1,5	1,6	2,1	1,3	1,4	1,2
<i>C. arborea</i>	1	4,2	5,8	5,4	5,7	5,1	4,4	6,1
	2	0,6	1,4	1,7	1,5	1,4	1,2	1,1
<i>C. tropicalis</i> DH-3	1	3,8	5,3	7,2	7,2	5,5	4,7	5,4
	2	0,4	1,9	2,1	2,1	1,4	2,3	1,5
<i>C. tropicalis</i> K3-10	1	3,2	5,7	6,2	6,5	5,6	5,7	6,9
	2	0,9	1,1	1,7	2,5	1,4	1,9	1,8
<i>C. pulcherrima</i>	1	4,6	7,4	6,0	7,8	6,7	7,7	7,2
	2	0,9	1,6	2,3	1,2	1,9	2,3	1,5

Примечание. 1 — общий азот биомассы;

2 — общий азот спирторастворимой фракции.

ся наибольшее содержание общего азота в биомассе (7,8%). В качестве другого примера может служить изолейцин, который у остальных культур по своему влиянию на выход биомассы наименее эффективен, хотя и способствует накоплению азота в значительных количествах. В подобных случаях в биомассе, возможно, происходит преимущественный синтез белков с высоким содержанием азота, т. е. содержащих аминокислоты с низким молекулярным весом и диаминокислоты.

С другой стороны, наименьшее по сравнению со всеми аминокислотами и сульфатом аммония накопление азота у *C. chevalieri* и *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* наблюдается на треонине, у *C. tropicalis* K3-10 — на треонине и метионине, у остальных культур — на метионине, т. е. на тех аминокислотах, которые плохо усваиваются указанными культурами.

Азот спирторастворимой фракции составляет приблизительно 1/5—1/4 общего азота. Количество растворимого азота снижается в процессе голодания. Несмотря на высокое содержание общего азота, у *C. pulcherrima* в среде с аспарагиновой кислотой обнаруживаются самые низкие количества спирторастворимого азота, что соответствует слабому приросту биомассы при усвоении этого источника азота. У большинства культур наиболее низкие значения спирторастворимого азота как абсолютные, так и в процентном отношении к общему азоту, наблюдаются при усвоении сульфата аммония, а наиболее высокие — при усвоении метионина, аспарагина и реже аспарагиновой кислоты.

Влияние источников азота на состав спирторастворимых аминокислот. В процессе голодания обменный фонд исходной культуры всех штаммов в основном сохраняет свой состав, но количественно уменьшается. Сумма аминокислот обменного фонда исходной культуры наиболее низка у *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* и в 3 раза меньше, чем при инкубации с сульфатом аммония; наибольшая сумма аминокислот исходной культуры наблюдалась у *C. chevalieri*. По процентному соотношению большинства аминокислот обменный фонд исходного варианта заметно отличается от варианта с сульфатом аммония. Преобладают аланин, глутаминовая кислота, лейцин+изолейцин, валин+фенилаланин.

При усвоении различных источников азота наблюдаемые в обменном фонде расхождения носят в основном количественный и реже качественный характер. Расхождения в качественном составе аминокислот у всех культур наблюдаются главным образом на треонине и метионине, при усвоении которых на хроматограммах обнаруживаются неидентифицированные пятна. Между результатами опытов I и II серий значительных различий не было, наибольшие из них наблюдались в сумме аминокислот пула в процессе адаптации *C. chevalieri* и *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* к треонину и *C. guilliermondii* — к метионину.

Как видно из приведенных в качестве примера в табл. 2 данных только для *C. chevalieri*, в пуле исследованных культур преобладают аланин, глутаминовая кислота, глицин, аргинин; γ -аминомасляная кислота встречается в основном в вариантах с аспарагином и сульфатом аммония. Орнитин при усвоении треонина или совсем не обнаруживается, или обнаруживается в виде следов. Глутамин во всех вариантах встречается, как правило, в незначительных количествах.

Таблица 2

Влияние различных источников азота на состав спирторастворимых аминокислот у *C. chevalieri*, мМ/100 мг сухих дрожжей

Аминокислоты обменного фонда	Исходная голодаю- щая куль- тура	Источники азота*					
		NH_4^+	асп- NH_2	асп	тре	мет	илей
орн	сл.	0,21	0,24	0,16	сл.	0,23	0,30
лиз	0,71	1,40	1,26	0,94	0,99	1,72	1,07
арг+асп- NH_2	0,32	1,54	2,17	1,99	0,54	1,68	0,53
асп	1,02	0,83	3,16	3,67	сл.	1,38	0,36
сер	0,83	1,11	1,20	0,86	1,20	1,37	0,66
гли	0,76	1,14	1,88	1,48	2,16	2,20	1,40
глу	0,92	1,75	1,98	1,80	1,55	3,51	2,08
тре	0,91	1,44	1,64	1,41	12,49	1,99	1,24
ала	2,80	5,83	6,03	5,46	4,21	5,49	5,72
тир	0,32	0,41	0,42	0,35	0,35	0,61	0,33
ГАМК	1,22	4,08	3,09	2,33	1,22	1,69	0,88
вал+фала	1,32	1,75	1,52	1,11	0,90	1,32	1,54
лей+илей	1,19	1,90	1,10	0,93	0,81	1,10	4,35

* Для всех источников азота приводятся результаты II серии опытов.

Из аминокислот, служащих источником азота, в наибольшем количестве в пуле всех культур обнаруживаются треонин, изолейцин, аспарагиновая кислота, меньше—метионин. В случае с экзогенным аспарагином в пуле последний обнаруживается в очень небольших количествах, однако при этом накапливается аспарагиновая кислота, что свидетельствует о наличии почти у всех культур активной аспарагиназы.

Для большинства культур из исследованных источников азота наиболее эффективным по своему влиянию на накопление аминокислот в пуле оказался аспарагин. За исключением *C. arborea*, *C. utilis* и *C. tropicalis* ДН-3, сульфат аммония в этом отношении часто значительно уступает аминокислотам. Если в общей сумме аминокислот спирторастворимой фракции не учитывать поступившую из среды субстратную аминокислоту, то наименьшее количество свободных внутриклеточных аминокислот наблюдается в основном на средах с изолейцином и треонином, которые и обеспечивают небольшой выход биомассы. Следовательно, между содержанием аминокислот в пуле и количеством синтезированной биомассы в некоторых случаях существует прямая зависимость. Однако накопление биомассы не всегда обусловлено синтезом аминокислот обменного фонда. Вероятно, усвояемость той или иной аминокислоты в качестве единственного источника азота определяется не только общей суммой аминокислот пула, но и тем, насколько соотношение аминокислот в нем является оптимальным для биосинтеза. Так, соотношение лиз:арг+асп-NH₂:асп:глу:вал+фала:лей+илей в спирторастворимой фракции *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* при росте на плохо усвояемом треонине составляет 1:1,6:1,5:3,4:5,4:2:8, а при росте на хорошо усвояемом аспарагине—1:16,3:22,2:7,9:2,5:2,1, хотя по общей сумме аминокислот оба варианта мало отличаются друг от друга.

Эффективность сульфата аммония как источника азота в отношении синтеза биомассы на фоне сравнительно невысокого содержания свободных аминокислот в пуле объясняется, по-видимому, не только соотношением аминокислот, оптимальным для биосинтеза, но и вовлечением аммиака в биосинтез других важных азотсодержащих соединений (глутамин, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, некоторые аминокислоты и пр.). Это объяснение хорошо согласуется с выводами, сделанными нами в предыдущих работах [2, 6]. Из сказанного вытекает, что эффективность аминокислоты как источника азота обусловлена также ее способностью образовывать некоторое количество свободного аммиака (путем прямого дезаминирования или трансдезаминирования), необходимого для обеспечения синтеза некоторых важных аминокислот и других азотсодержащих соединений.

По сумме свободных внутриклеточных аминокислот, а также выходу биомассы и экономическому коэффициенту ее синтеза среди исследованных культур выделяется *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*. У *C. pulcherrima*, по сравнению с остальными культурами, количество аминокислот в пуле при усвоении сульфата аммония, аспарагиновой

кислоты и изoleyцина оказалось наименьшим, хотя эта культура обладает наиболее активным и богатым набором аминотрансфераз [4]. Сравнительно недавно предложенное изменение систематического положения *C. pulcherrima* объясняет наличие глубоких различий по многим признакам между этой культурой и остальными изученными штаммами дрожжей рода *Candida* [8, 9].

Таким образом, аминокислоты семейства аспарагиновой кислоты специфически влияют на накопление общего и спирторастворимого азота и на состав свободных внутриклеточных аминокислот как в пределах одной и той же культуры, так и у разных представителей рода *Candida*.

Ереванский государственный университет,
кафедра физиологии и анатомии растений
и кафедра биохимии

Поступило 6.VII 1972 г.

Յու. Գ. ՊՈՊՈՎ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԹԹՎԻ ԸՆՏԱՆԻՔԻ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՈՐՊԵՍ ԱԶՈՏԻ ՄԻԱԿ ԱՂԲՅՈՒՐԻ ՅՈՒՐԱՑՈՒՄԸ CANDIDA ՑԵՂԻ ՇԱՔԱՐԱՍՆԿԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է ասպարազինաթթվի, թրեոնինի, մեթիոնինի, իզուլեյցինի, ասպարազինի և մեթիոնի սուլֆատի, որպես ազոտի միակ աղբյուրի, ազդեցությունը *Candida* ցեղի ութ շտամների վրա, կենսազանգվածի ընդհանուր և սպիրտալուծելի ֆրակցիայում, ազոտի կուտակման և ազատ ներքջային ամինաթթուների կազմի վրա:

Միջավայրում իզուլեյցինի ներկայությամբ կուլտուրաներ ամեցնելիս նկատվում է կենսազանգվածի ցածր ելք՝ ընդհանուր ազոտի բարձր պարունակությամբ: Սպիրտալուծելի ազոտի ամենաբարձր քանակ հայտնաբերված է ասպարազինի, ասպարազինաթթվի և մեթիոնինի օգտագործման ժամանակ: Սակայն առանձին կուլտուրաների միջև կարող են լինել զգալի տարբերություններ: Ամինաթթուների յուրացման և ընդհանուր ազոտի պարունակության միջև պարզորոշ կորելյացիա չի նկատվում: Կենսազանգվածի կուտակման մակարդակը ավելի շատ պայմանավորված է ազատ ներքջային ամինաթթուների պարունակությամբ: Այդպիսի պայմանավորվածության բացակայության դեպքերը ցույց են տալիս, որ կենսազանգվածի սինթեզի ինտենսիվությունը բնորոշվում է ոչ միայն փոխանակային ֆոնդում առանձին ամինաթթուների բացարձակ պարունակությամբ, այլև, հավանական է, նրանց փոխհարաբերությամբ և ազոտ պարունակող այլ միացությունների առկայությամբ:

Այսպիսով, ասպարազինաթթվի բնականիքի ամինաթթուները յուրահատուկ ձևով են ազդում ընդհանուր և սպիրտալուծելի ազոտի կուտակման և ազատ ներքջային ամինաթթուների կազմի վրա, ինչպես միևնույն կուլտուրայի սահմաններում, այնպես էլ *Candida* ցեղի տարբեր ներկայացուցիչների մոտ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Макарова Е. Н. Микробиология, XLII, 2, 1973.
2. Нерсисян А. А., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, XXVI, 6, 1973.
3. Попов Ю. Г., Чубарян С. В. Биологический журнал Армении, XXV, 12, 1972.
4. Тер-Карпетян М. А., Джанибекова В. Г. ДАН АрмССР, XLVIII, 3, 1969.
5. Тер-Карпетян М. А., Инджикян С. М., Чубарян С. В. Биологический журнал Армении, XXI, 1, 1968.
6. Туманян Л. Р., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, XXV, 11, 1972.
7. Lissitsky S. a. Lourent G. Bull. soc. biol., 37, 1177, 1955.
8. Pitt J. I. a. Miller T. W. Mycologia, 60, 663, 1968.
9. Wickerham L. J. Mycologia, 56, 253, 1964.