

М. А. ДАВТЯН, М. Б. АТАНЕСЯН, Л. Е. ЛАЧИНЯН

СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ ИЗ АММИАКА И ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ГОМОГЕНАТАХ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIER- MONDII* ВКМ У-42

Изучался биосинтез аминокислот в гомогенатах дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 аммиака и дикарбонновых кислот. По эффективности прироста аминного азота эти субстраты располагаются в следующем порядке: пируват-фумарат-малат-сукцинат-щук- α -кетоглутарат-глюкоза. По-видимому, у этих дрожжей имеется активная ферментная система аминирования пирувата и фумарата.

Предыдущими исследованиями показано, что дрожжи рода *Candida* хорошо растут и усваивают глюкозу и кетокислоты при использовании аммонийных солей в качестве источника азота [9].

Усвоение аммиака осуществляется различными механизмами: прямое аминирование кетокислот, трансреаминирование, амидирование дикарбонновых аминокислот и белков, биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Не вызывает сомнения возможность прямого аминирования пириноградной кислоты в некоторых тканях животных [1—2], у некоторых бактерий [13—15], дрожжей [5] и растений [6, 17].

В растениях большая роль придается аспартазе в процессе аминирования фумаровой кислоты с образованием аспартата [7, 16].

Имеются сообщения о возможности аминирования щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) с образованием аспартата в некоторых растительных [14] и животных тканях [3].

Таким образом, в качестве первичных акцепторов аммиака при ассимиляции его выступают α -кетоглутарат, пируват, фумарат и, возможно, ЩУК. Следует отметить, что различные организмы обладают не одинаковыми возможностями ассимиляции аммиака путем аминирования кетокислот. Определение основной реакции аминирования для каждого конкретного случая представляет определенный интерес.

Наша цель заключалась в изучении возможности прямого аминирования кетокислот и фумаровой кислоты у дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42. Изучался прирост аминного азота при инкубировании гомогенатов дрожжей в присутствии аммиака и его акцепторов (кетокислоты и фумарат) или предшественников последних (глюкоза, сукцинат, малат).

Материал и методика. Объектом исследований служил представитель рода *Candida*, *C. guilliermondii* ВКМ У-42, полученный из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР. Методика выращивания дрожжей описывалась в предыдущих

статьях нашей лаборатории [4]. Густую суспензию дрожжей центрифугировали, и полученный осадок гомогенизировали в фосфатном буфере pH 7,4 в стеклянном гомогенизаторе Поттера в присутствии Al_2O_3 при t 4° с максимальной для данных условий скоростью—2500 оборотов в мин. Гомогенат разбавляли в фосфатном буфере таким образом, чтобы в 1 мл суспензии, подвергнутой гомогенизации, содержалось 50 мг дрожжей. В качестве акцепторов аммиака использовались следующие субстраты: пируват, фумарат, малат, сукцинат, ЩУК, α -кетоглутарат, глюкоза. Для изучения процесса синтеза аминного азота из аммиака и его акцепторов к гомогенату добавляли соответствующий субстрат-акцептор аммиака (100 мкмоль на пробу), углекислый аммоний (0,002 М), $MgCl_2$ (0,0001 М), фосфатный буфер и 1 мл дрожжевой суспензии. Общий объем пробы составлял 3 мл. Инкубирование проводили при 37° в течение 60 мин в атмосфере воздуха. Уровень аминокислот определяли колориметрическим методом Коккинга и Немма [12] и выражали в мкмольях на 100 мг абсолютно сухих дрожжей.

Результаты и обсуждение. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что в инкубируемых гомогенатах содержится 2,215 мкмоль аминного азота на 100 мг дрожжей, который представляет собой сумму предобразованного и вновь синтезированного за счет эндогенных субстра-

Таблица 1
Аминный азот в инкубированных (1 час) гомогенатах дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42, мкмоль аминокислот на 100 мг абсолютно сухих дрожжей

Состав пробы	Аминный азот
Гомогенат до инкубации	0,738 (54)
Гомогенат после инкубации	2,215 (54)
Гомогенат + $(NH_4)_2CO_3$	2,622 (54)
Гомогенат + кетоглутарат	1,830 (10)
Гомогенат + пируват	2,608 (8)
Гомогенат + ЩУК	2,941 (8)
Гомогенат + сукцинат	2,146 (10)
Гомогенат + фумарат	2,512 (10)
Гомогенат + малат	1,721 (9)
Гомогенат + глюкоза	1,630 (9)

тов аминного азота. При инкубировании гомогенатов в присутствии $(NH_4)_2CO_3$ наблюдается незначительный (недостовверный) прирост аминного азота, что, по-видимому, свидетельствует о низком уровне акцепторов аммиака в клетках изучаемых дрожжей. Отсутствует или происходит незначительный прирост аминного азота и при инкубировании гомогенатов с кетокислотами и другими метаболитами трикарбонового цикла, что, по-видимому, свидетельствует о низком уровне предобразованного аммиака в клетках, а в присутствии аммиака и кетокислоты (или других метаболитов цикла трикарбоновых кислот) в инкубированных пробах (в течение 1 часа) наблюдается заметный прирост аминного азота. В последующих экспериментах в качестве контроля служили инкубированные гомогенаты без субстратов.

Приведенные в табл. 2 данные показывают, что при инкубировании гомогенатов дрожжей с α -кетоглутаратом происходит прирост аминного

Таблица 2

Прирост аминного азота при инкубации гомогенатов (1 час) в присутствии аммиака и субстратов трикарбонового цикла, мкмоль аминноазота на 100 мг абсолютно сухих дрожжей

α -кетоглутарат	Пируват	ЩУК
$M+m = 12,220 \pm 2,370$ (10)	$M+m = 18,021 \pm 0,602$ (8)	$M+m = 13,072 \pm 1,850$ (8)
Глюкоза	Сукцинат	Малат
$M+m = 10,862 \pm 0,724$ (9)	$M+m = 13,730 \pm 0,982$ (10)	$M+m = 15,840 \pm 1,059$ (9)
Фумарат		
$M+m = 16,595 \pm 0,895$ (10)		

азота, происходящий, по всей вероятности, под действием глутаматдегидрогеназной реакции, соответствующий фермент которой имеет широкое биологическое распространение. Большой прирост аминного азота наблюдается при инкубировании гомогената в присутствии кетоглутарата и аммиака. Исходя из этого можно заключить, что в изучаемых дрожжах аланиндегидрогеназа представлена лучше по сравнению с глутаматдегидрогеназой.

Щавелевоуксусная кислота также обуславливает прирост аминного азота, ненамного превосходя в этом отношении α -кетоглутарат, но значительно уступая пирувату. Глюкоза является наименее эффективным субстратом в отношении прироста аминного азота. Значительно эффективнее глюкозы в этом отношении является сукцинат. Таким образом, изученные субстраты по эффективности прироста аминного азота располагаются в следующем порядке: пируват, фумарат, малат, сукцинат, ЩУК, α -кетоглутарат, глюкоза.

На основании этих данных можно заключить, что в изучаемых дрожжах имеется активная ферментная система аминирования пирувиноградной кислоты, а также фумарата. Заключение о существовании фермента, аминирующего фумарат (вероятно, аспартазы) подтверждается еще и тем, что легко превращающиеся в фумарат субстраты (сукцинат и особенно малат) также обуславливают заметный прирост аминного азота. Наблюдаемое преимущество ЩУК по сравнению с α -кетоглутаратом в отношении прироста аминного азота, по всей вероятности, обусловлено возможным декарбоксилированием ЩУК в пируват дрожжевой декарбоксилазой. На основании полученных нами данных можно прийти к заключению, что в изучаемых дрожжах утилизация аммиака, вероятно, происходит, главным образом, посредством аланиндегидроге-

назой и аспартазой реакций, и значительно слабее глутаматдегидрогеназой реакции. Для окончательного решения вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 23.VII 1973 г.

Մ. Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ, Մ. Բ. ԱԹԱՆՆՈՅԱՆ, Լ. Ն. ԼԱԶՐՆՅԱՆ

ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԸ ԱՄՈՆՅԱԿԻՑ ԵՎ ԳԻԿԱՐԹՈՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻՑ
CANDIDA GUILLIERMONDII ВКМ У-42 ԽՄՈՐԱՍՆԻԵՐԻ
ՀՈՄՈԳԵՆԱՏՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է ամինային ազոտի աճը *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 խմորասնկի հոմոգենատները, ամոնյակի և զանազան դիկարբոնային թթուների հետ ինկուբացիայի ենթարկելիս:

Պարզվել է, որ ամենաէֆեկտիվը պիրուվատն ու ֆումարատն են: Հեշտությամբ ֆումարատի փոխարկվող սուբստրատները (մալատ, սուկցինատ), նույնպես պայմանավորում են ամինային ազոտի զգալի աճ:

Օրսալարացախաթթուն և մանավանդ α -կետոգլյուտարատաթթուն պակաս էֆեկտիվ են: Ստացված տվյալների հիման վրա եզրակացվում է, որ հետադրոտված խմորասնկերում ամոնյակի յուրացումը հիմնականում իրականացվում է պիրուվատի և ֆումարատի ամինացումը կատալիզող ֆերմենտային սիստեմներով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Березовская Н. Н. Биохимия, 23, 125, 1958.
2. Давтян М. А. Биохимия, 27, 542, 1962.
3. Давтян М. А., Бунятыян Г. Х., Баблочян Р. С. Вопросы биохимии мозга, Изд. АН СССР, 69, 74, 1969.
4. Инджикян С. М. Ученые записки ЕГУ, 5, 69, 1969.
5. Кретович В. Л., Краузе Е. ДАН СССР, 136, 147, 1961.
6. Кретович В. Л., Степанович К. М. ДАН СССР, 80, 226, 1951.
7. Кретович В. Л., Асеева К. В., Бундель А. А. ДАН СССР, 80, 226, 1951.
8. Пятницкая И. Н. Биохимия, 25, 86, 1960.
9. Тер-Карапетыян М. А., Инджикян С. М., Чубарян С. В. Биологический журнал Армении, 21, 3, 1968.
10. Шатилов В. Р., Евстигнеева З. Г. ДАН СССР, 178, 482, 1968.
11. Шень-Сан-Чун Хунь Мун-Мун, Браунштейн А. Е. Биохимия, 24, 957, 1959.
12. Kocking E. C. and Jem E. N. Biochem. 9, 21, 58, 1954.
13. Fairhurst A. S., King H. K., Sewell C. E. J. gen. Microb., 15, 106, 1956.
14. Jacoby J. Planta, 49, 561, 1957.
15. Plerard A., Wlame S. M. Bloch. of Biophys acta, 37, 490, 1950.
16. Pei-Sung, Tang Vel-chem Fu-hen Vu. Sci Record New, 1, 39, 1957.
17. Tsukamoto A. Plant and Cell Physiol, 11, 221, 1970.
18. Woldman D. S. Bloch. et Biophys Acta, 34, 527, 1959.