ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXII. 8, 1979

УДК 582.282.23:547.466:577.15

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИНОКСИДАЗЫ У SACCHAROMYCES VINI

Э. А. МАНТАШЯН

Дрожжи вида Sacch. vini способны окислять пролин в условиях экспоненциально выращенной культуры на синтетической среде с пролином в качестве единственного источника азота. Результаты, касающиеся явления индукции, получены при изучении хода индуцируемого синтеза пролиноксидазы во времени, концентрации субстрата, влияния глюкозы и ионов аммония.

Изучение азотного метаболизма у Saccharomyces vini показало, что эти дрожжи могут использовать в качестве единственных источников азота ряд аминокислот, в частности семейства глутаминовой кислоты. Обменные пути, по которым происходит превращение той или иной аминокислоты этого семейства, ведут к глутаминовой кислоте, являющейся ключевым азотным донором.

При утилизации дрожжами пролина и аргинина образование промежуточного продукта, пирролин-5-карбоксилата, возможно не только при окислении пролина, но и при трансаминировании орнитина [9]. Дальнейшее превращение пирролин-5-карбоксилата осуществляется при участии пирролиндегидрогеназы и приводит к образованию глутамата. Экспериментально показано, что пирролиндегидрогеназа, приводящая к образованию глутамата от аргинина (через орнитин) и от пролина, катализируя, по сути дела, одну и ту же реакцию, является тем не менее ферментом, имеющим различную природу [8].

Одинаковые пути деградации пролина свойственны Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Bacillus subtilis. Пролиноксидаза, образующая пирролинкарбоновую кислоту, которая превращается в глутамат с участием НАДФ-а и пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназы, индуцируется пролином и подвергается катаболитной репрессии. Клетки дикого штамма салмонеллы, росшие в присутствии пролина, обнаруживают заметное увеличение активности ферментов катаболизма пролина. Активность последних значительно уменьшается в присутствии глюкозы [2—4].

Работы Франка и сотр. также отмечают пролиноксидазную систему или ее некоторые компоненты у дикого типа E. coli как индуцируемую. Инкубация неадаптированных к пролину клеток в среде, содержащей пролин, приводит к быстрому увеличению пролиноксидазной актив-

ности, которая в существенной степени зависит от концентрации добавляемого пролина [5—7].

В настоящей работе изучались условия, при которых имеет место индукция дрожжевой пролиноксидазы.

Материал и методика. Двухсуточную культуру дрожжей вида Sacch. vini расы Кахури-7 выращивали на среде Ридер следующего состава (г/л водопроводной воды): $(NH_4)_2SO_4$—3,0; $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$—0,7; NaCl—0,5; KH_2PO_4—1,0; K_2HPO_4—0,1; глюкоза—2%. Витамины: тиамин, биотин, Са--пантотенат по 50 мкл/100 мл. Начальная величина pH 6,6.

Культивирование велось в аэробных условиях на качалке в колбах Эрленмейера при 25—28°. Экспоненциально выращенные клетки отделяли от культуральной жидкости, дважды промывали холодной водой и ресуспендировали в свежей среде Ридер, содержащей в качестве источника азота пролин в различных концентрациях. Через определенный промежуток времени в тех же условиях дрожжи отделяли, дважды промывали холодной водой, 0,062М калий-фосфатным буфером pH 7,1, ресуспендировали в том же буфере и вводили в реакционную смесь, где активность фермента определяли по убыли пролина по ранее описанной методике [1]. Пролиноксидазную активность выражали в микромолях пролина на 100 мг абс. сух. дрожжей.

Результаты и обсуждение. Индукция пролиноксидазы. Экспоненциально выращенные клетки получали на среде Ридер с сульфатом аммония в качестве единственного источника азота в течение 18 час. и переносили в свежую среду с пролином (0,5 мг/мл) и глюкозой (1%). Промытые клетки исследовали на ферментативную активность. Максимальное образование фермента отмечено за 40 мин (рис. 1).

Для выявления влияния концентрации пролина на ход индуцируемого синтеза фермента промытые клетки ресуспендировались в свежей среде с указанными на графике 2 концентрациями пролина. Через 60 мин дрожжи отделяли от культуральной жидкости и исследовали на активность. Увеличение активности пролиноксидазы зависит от концентрации добавляемого в ростовую среду пролина и носит линейный характер (рис. 2). Эксперименты, проведенные Франком на E. coli, выявили не только такой же характер индуцирования пролиноксидазной

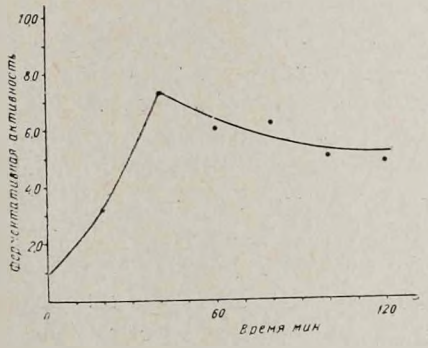

Рис. 1.

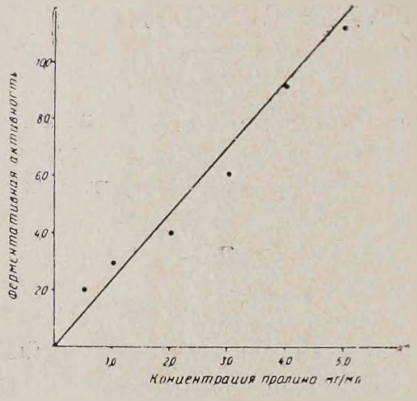

Рис. 2.

Рис. 1. Ход индукции пролиноксидазы во времени.

Рис. 2. Индукция пролиноксидазы как функция концентрации пролина

системы, но и показали, что исследованные L-аминокислоты [15] окисляли адаптированные к пролину клетки примерно на 20% от наблюдаемой скорости на пролине, а L-изомеры глутамата, серина, треонина, аланина — примерно на половину скорости на пролине [5].

Заметное влияние на степень окисления пролина винными дрожжами оказывают ионы аммония и глюкоза. Необходимость изучения этого вопроса была вызвана, в частности, разноречивыми литературными данными. Доказанным, однако, является тот факт, что синтез пролиноксидазы репрессируется аммоний сульфатом в присутствии глюкозы. В среде, содержащей глюкозу и пролин в качестве источника азота, катаболитная репрессия пролиноксидазы Klebsiella aerogenes уменьшается [10]. В наших опытах исключение глюкозы или ионов аммония из ростовой среды проводилось после перенесения экспоненциально выросших клеток в свежую среду Ридер.

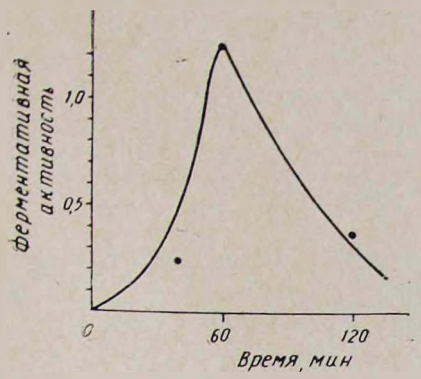

Рис. 3.

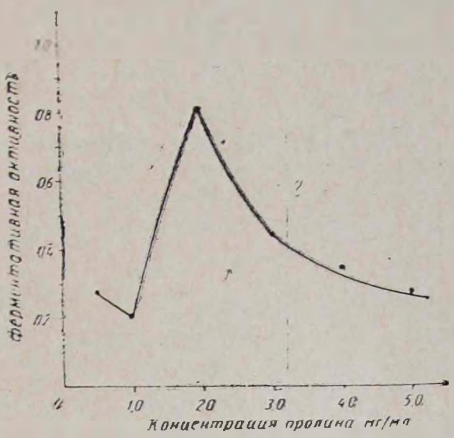

Рис. 4.

Рис. 3. Влияние времени инкубации дрожжей в ростовой среде, не содержащей глюкозу.

Рис. 4. Индуцированный синтез пролиноксидазы в отсутствие глюкозы.

Концентрация глюкозы—1%; аммония—2,35, пролина—4,1 мг/мл (дозы рассчитаны исходя из потребностей винных дрожжей в азоте на 1 г глюкозы и эквивалентны).

Таблица

Синтез пролиноксидазы дрожжами Sacch. vini, мкМ пролина/100 мг абс. сух. др.

Добавки к среде роста			Пролиноксидаза
пролин		глюкоза	
+	+	+	2,22
+*	—	+	6,62
+**	—	+	8,31
+***	—	+	11,75
—	+	+	1,01
+	+	—	0,85

*—2,0 мг/мл. **—4,1, ***—6,1.

Как видим (рис. 3, 4, таблица), исключение глюкозы из ростовой среды заметно снижает пролиноксидазную активность.

Экспериментальные данные позволяют заключить, что пролиноксидаза — регулируемый фермент и может индуцироваться пролином особенно эффективно в среде с глюкозой. Ионы аммония оказывают тормозящее действие, усиливающееся в отсутствие глюкозы.

Ереванский государственный университет,
проблемная лаборатория сравнительной
эволюционной биохимии

Поступило 2. VII 1979 г.

ՊՐՈԼԻՆՕՔՍԻԴԱԶԱՅԻ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ SACCHAROMYCES VINI ԽՄՈՐԱՄԱՆԿԵՐԻ ՄՈՏ

Է. Ա. ՄԱՆԹԱՇՅԱՆ

Saccharomyces vini *տեսակի խմորասնկերի էքսպոնենցիալ պայմաններում աճեցրած կուլտուրանները, սինթետիկ միջավայրում ազոտի միակ աղբյուր պրոլինի առկայությամբ, ընդունակ են օքսիդացնել պրոլինը։*

Ինդուկցիայի երևույթին վերաբերվող տվյալները ստացված են ուսումնասիրելով՝ պրոլինօքսիդազայի ինդուկցված սինթեզը՝ կախված ժամանակից, սուբստրատի կոնցենտրացիայից, ամոնիումի իոններից և գլյուկոզայի ազդեցությունից։

PROLINOXYDASE REGULATION BY *SACCHAROMYCES VINI*

E. A. MANTACHIAN

It has been shown that *Sacch. vini* are capable to oxidize proline of a culture exponentially grown on synthetical medium containing proline as the only source of nitrogen. The results concerning the induction phenomen have been received at the study of: a) the induced prolinoxidase synthesis process b) substrate concentration c) the effect of ammonium ions and glucose.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Манташян Э. А.* Межвуз. сб. науч. тр. «Биология», вып. 1. Ереван, 1979.
2. *Condamine H.* Annales Institut Pasteur., *120*, 9—22, 1971.
3. *Dedinger S., Brill W.* J. of bacteriology, *103*, 1, 144—152, 1970.
4. *Deutch Ch. E., Soffer R.* L. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, *72*, 1, 405—408, 1975.
5. *Frank L., Rybicki P.* Archives of biochemistry and biophysics, *95*, 441—449, 1961.
6. *Frank L.* J. of bacteriology, *86*, 4, 781, 1963.
7. *Frank L., Ranhard B.* Archives of Biochemistry and biophysics, *107*, 325—331, 1964.
8. *Hauwer G. De., Lavalle R., Wiame J. M.* Biochimica biophysica acta, *81*, 257—269, 1964.
9. *Meister A* Biochemistry of amino acids, New York, 1965.
10. *Prival M. J., Magasanik B.* J. of biological chemistry, *246*, 20, 6288—6296, 1971.