ՀԱՅԿԱԿԱՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIII, 6, 633—637, 1980

УДК 577.15.591.8

ИЗМЕНЕНИЕ БИОМАССЫ И АРГИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ CANDIDA GUILLIERMONDII НП-4 В НОРМЕ И ПРИ ГОЛОДАНИИ

Л. А. НАВАСАРДЯН, А. С. АВАКЯН, М. А. ДАВТЯН

Изучалась аргиназная активность в нормальных условиях и при азотном голодании у углеводородокисляющих дрожжей C. guilliermondii НП-4. Выяснилось, что при голодании в водной среде, содержащей лишь гексадекан, аргиназная активность их интенсивно увеличивается (≈8 раз). При 24-часовом инкубировании предварительно подвергнутых азотному голоданию дрожжей в нормальной питательной среде она снижается, приближаясь к исходной.

Ключевые слова: аргиназная активность, дрожжи.

Все возрастающая потребность в белково-витаминных веществах выдвигает вопрос о получении дрожжевой биомассы промышленным путем. Известно, что при использовании нефтяных отбросов за короткий промежуток времени синтезируется дрожжевая биомасса, богатая белково-витаминными компонентами. С целью разработки эффективных методов биосинтеза дрожжевой биомассы необходимо выяснение основных сторон обмена дрожжей, использующих нефтяные отбросы (углеводороды). При этом более перспективными являются вопросы, связанные с азотным обменом, в частности с обменом и синтезом аминокислот и белковых фракций. Важно также изучение вопроса о продлении жизнеспособности, а также ферментативных процессов в микроорганизмах при переносе их в анабиотическое состояние.

Наши предыдущие исследования на дрожжах C. guilliermondii ВКМ У-42, которые выращивались в среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода [1, 2], показали, что в белковых фракциях дрожжей, подвергнутых азотному голоданию, наблюдаются как количественные, так и подфракционные сдвиги. В частности, изотопным методом нами показано, что у дрожжей в процессе голодания, наряду с катаболизмом определенных белков, протекает анаболизм других. При голодании алканокисляющих дрожжей C. guilliermondii НП-4 происходят аналогичные, хотя и менее выраженные, перестройки в фракционном составе их [3].

Изучение некоторых ферментативных процессов на фоне фракционных перестроек в белках, происходящих при голодании дрожжей, может способствовать выяснению вопроса о биохимических изменениях у микроорганизмов в процессе голодания.

Нами исследована аргиназная активность алканокисляющих дрожжей C. guilliermondii НП-4 в стационарной фазе роста, при азотном голодании и в условиях восстановления нормального питания. Ферментативная активность определялась в водорастворимой белковой фракции.

Материал и методика. Дрожжи C. guilliermondii НП-4 выращивали на качалке (200—250 об/мин) при температуре 31—32° в литровых колбах Эрленмейера. Состав минеральной среды (в г/л): $NH_4H_2PO_4$—2, $(NH_4)_2HPO_4$—0,5, K_2SO_4—0,2, $MgSO_4$—0,2. В качестве источника углерода использовали углеводород-октадекан ($C_{16}H_{34}$)—1%-ный, pH среды доводили до 5,5 1н раствором H_2SO_4. Культивирование проводили в течение 48 ч. Количество биомассы определяли нефелометрированием на ФЭК М-57.

Полученную дрожжевую биомассу замораживали до —20—25° и разрушали прессом типа пресса Хьюза. Дрожжевой гомогенат перемешивали 10 мин на магнитной мешалке, после чего центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин. Аргиназную активность определяли путем инкубирования гомогената в 0,05 М глициновом буфере (pH 9,5) в присутствии 50 мкм L-аргинина и 5 мкм $MnCl_2$ при 37° в течение 30 мин. Количество образовавшейся мочевины определяли методом Арчибальда [5].

Активность фермента выражали в мкм образовавшейся мочевины на 100 мг сухих дрожжей и на 1 мг водорастворимого белка. Фракционирование белка проводили методом Плешкова [4] с некоторыми изменениями. Количество белка определяли методом Лоури [6].

Результаты и обсуждение. Как видно из табл. 1, при инкубировании дрожжей C. guilliermondii НП-4 в течение 48 ч в среде, где в качестве единственного источника углерода использовался $C_{16}H_{34}$, аргиназная активность составляет $5\pm1{,}2$ мкм на 100 мг биомассы. При дальнейшем 48-часовом азотном голодании в алкансодержащей ($C_{16}H_{34}$) водной среде она возрастает и достигает 40 ± 6.

Таблица 1

Аргиназная активность дрожжей C. guilliermondii НП-4, мкм/100 мг сухой биомассы (культура взята после 48-часовой инкубации)

Опыт	До голодания	После голодания
1	6	22
2	3,7	76
3	2,3	35
4	3,7	17
5	11,4	47,7
6	3,2	43
M±m	5±1,2	40±6

Таким образом, при азотном голодании интенсивно возрастает активность аргиназы дрожжей. Это свидетельствует о том, что в экстремальных условиях в дрожжевых клетках усиливаются катаболические процессы, вследствие чего увеличивается количество некоторых аминокислот, в том числе аргинина, что может явиться причиной субстратной индукции аргиназы. В результате катаболических процессов образуются также пептиды и дипептиды, которые, очевидно, оказывают положительное воздействие на стабилизацию ферментов, продлевая период по-

лужизни, что в свою очередь приводит к увеличению количества аргиназы.

Было изучено также изменение дрожжевой биомассы в экстремальных условиях. При инкубации в течение 48 ч в нормальной питательной среде синтезировалось 330 мг биомассы, а аргиназная активность составляла 5 мкм на 100 мг биомассы. После 48-часового азотного голодания наблюдалось увеличение ее всего на 15% (количество синтезированной биомассы составляло 50—60 мг), тогда как аргиназная активность увеличивалась в 8 раз и достигала 40 мкм (рис.).

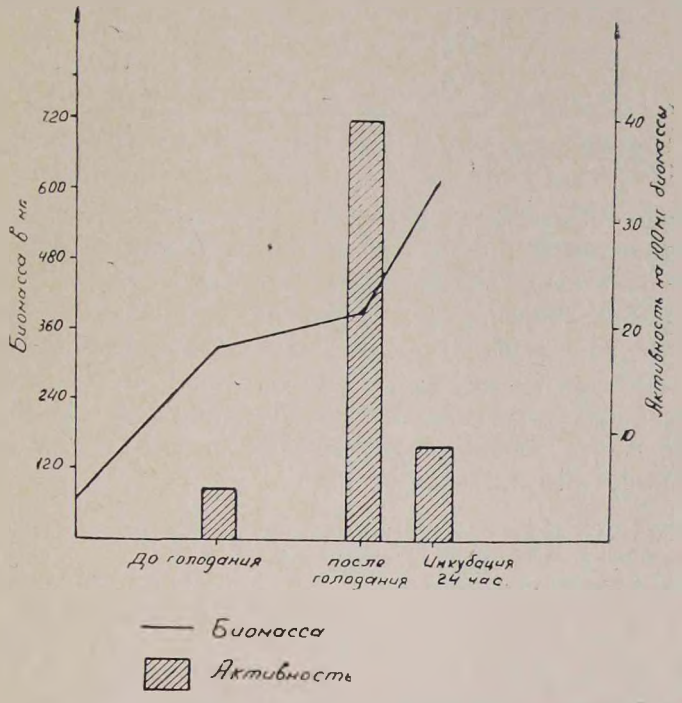

Рис. 1. Изменение биомассы и аргиназной активности дрожжей C. guilliermondii НП-4 в экстремальных условиях.

Таким образом, биосинтез аргиназы в процессе азотного голодания свидетельствует об анаболических процессах в некоторых белковых фракциях.

При 24-часовой инкубации предварительно подвергнутых азотному голоданию дрожжей в нормальной питательной среде биомасса значительно увеличивалась (на 60%) и достигала 610 мг, в то время как аргиназная активность в этот период падала до 9 мкм.

Определялась также удельная активность аргиназы в нормальных и подвергнутых азотному голоданию дрожжах. Полученные данные представлены в табл. 2.

Как показывают данные табл. 2, после 48-часовой инкубации в стационарной фазе удельная активность аргиназы дрожжей C. guilliermondii НП-4 равнялась 1,2±0,2 мкм. После 48-часового голодания в алкансодержащей среде она возрастает до 12,1±2,2 мкм.

Таблица 2

Удельная аргиназная активность дрожжей C. guilliermondii НП-4, мкм/мг белка

Опыт	До голодания	После голодания	Относительное изменение удельной активности
1	1,5	11	7,3
2	0,5	21	23,3
3	1,0	17	17,0
4	0,9	4,8	5,3
5	2,3	17	7,4
6	0,9	9,6	10,6
7	0,4	4,4	11,0
M±m	1,2±0,2	12,1±2,2	11,7±2,2

Суммируя приведенные в данной работе данные, можно заключить, что наблюдаемая при голодании индукция белковой подфракции, обладающей аргиназной активностью, является свидетельством глубоких перестроек фракционного состава белков, выражающихся не только в катаболизме, но и анаболизме определенных белковых подфракций. Это подтверждает выводы предыдущих исследований [1, 2] о том, что голодание характеризуется определенным биохимизмом, обеспечивающим жизнедеятельность клеток в экстремальных условиях, а не простым катаболизмом клеточных структур.

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

Поступило 2.VII 1979 г.

ԱԶԽԱՋՐԱԾԻՆ ՕՔՍԻԴԱՑՆՈՂ CANDIDA GUILLIERMONDII НП-4 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԿԵՆՍԱԶԱՆԳՎԱԾԻ ԵՎ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՆՈՐՄԱՅՈՒՄ ԵՎ ՔԱՂՑԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Լ. Հ. ՆԱՎԱՍԱՐԴՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՎԱԳՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է նավթային ածխաջրածիններ օքսիդացնող C. guilliermondii НП-4 *խմորասնկերի արգինազային ակտիվությունը ազոտային քաղցի և նորմալ սնուցումը վերականգնելու պայմաններում։ Պարզվել է, որ միայն* $C_{16}H_{34}$ *ածխաջրածին պարունակող ջրի միջավայրում խմորասնկերը ազոտային քաղցի ենթարկելիս արգինազային ակտիվությունը ինտենսիվ կերպով ավելանում է (≈8 անգամ)։ Ազոտային քաղցի ենթարկված խմորասնկերը լիարժեք սննդամիջավայրում 24 ժամյա ինկուբացիայի ենթարկելիս արգինազա ֆերմենտի ակտիվությունը իջնում և մոտենում է ելակետայինին։*

Ստացված տվյալները հաստատում են այլ օբյեկտի վրա կատարած մեր փորձերի նզրակացությունները, որոնց համաձայն քաղցի պայմաններում

խորը փոփոխություններ է ենթարկվում խմորասնկերի սպիտակուցի ֆրակցիոն կազմը (սպիտակուցների կատաբոլիզմի ընդհանուր ֆոնի վրա որոշ սպիտակուցային ենթաֆրակցիաներ ենթարկվում են անաբոլիզմի)։ Քաղցի պայմաններում արգինազային ակտիվության ավելացումը խոսում է արգինազային ակտիվությամբ օժտված սպիտակուցային ենթաֆրակցիայի ինդուկցիայի մասին։

THE CHANGES OF BIOMASS AND ARGINASE ACTIVITY IN HYDROCARBON-OXIDAIZING YEASTS CANDIDA GUILLIERMONDII NP-4 UNDER NORMAL CONDITIONS AND STARVATION

L. H. NAVASARDIAN, A. S. AVAGIAN, M. A. DAVTIAN

The activity of arginase under normal conditions and nitrogen star vation in hydrocarbon-oxidizing yeasts C. guilliermondii Np-4 has been investigated. It has been shown that under starvation in water medium containing only $C_{16}H_{34}$, the activity of arginase intensively increases (8 times). Under 24 hour incubation in normal nutritional medium in yeasts preliminary exposed to nitrogen starvation the arginase activity decreases to control level.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Давтян М. А., Багдасарян Е. Г., Навасардян Л. А.* Биолог. ж. Армении, *26*, 1, 23, 1973.
2. *Навасардян Л. А., Багдасарян Е. Г., Давтян М. А.* Биолог. ж. Армении, *26*, 12, 44, 1973.
3. *Навасардян Л. А., Авакян А. С.* Тез. Всесоюзн. конф. «Эволюционная биохимия и происхождение жизни», Ереван, 1978.
4. *Плешков Б. П.* Практикум по биохимии растений. М., 1968.
5. *Archibald R. M.* J. Biol. Chem., *156*, 171, 1944,
6. *Lowry O. H., Rosebrough W. Y.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.