

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов определялись количество биомассы, рН среды и активность аспарагиназы дрожжей в стационарной фазе роста (после выращивания в течение 24 ч) при использовании разных источников азота.

Таблица I

рН среды, количество накопленной биомассы и активность аспарагиназы при выращивании дрожжей на разных источниках азота в стационарной фазе роста

Источник азота	рН среды		Количество биомассы, мг	Активность аспарагиназы, мкг NH ₃ / мг сухих дрожжей
	начальный	конечный		
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,3	2,8	2,8	12,0
l-аспартат	6,5	7,3	4,1	20,0
l-аспартат ÷ (NH ₄) ₂ SO ₄	6,5	6,33	3,6	21,0
l-аспарагин + (NH ₄) ₂ SO ₄	6,4	3,1	5,2	15,0
l-аспарагин	6,45	4,3	6,4	19,0

Как видно из табл. I, наибольший прирост биомассы в стационарной фазе роста среди использованных источников азота наблюдается на аспарагине. Добавление (NH₄)₂SO₄ подавляет этот процесс как в вариантах с аспарагином, так и с аспартатом. Необходимо отметить, что здесь и в дальнейшем источники азота брались в таких количествах, чтобы и соотношение, и суммарное количество по азоту во всех вариантах были одинаковыми.

Из таблицы видно также, что самая высокая активность аспарагиназы в этих условиях наблюдается при использовании в качестве источника азота смеси аспартата с (NH₄)₂SO₄. На первый взгляд полученные данные можно оценить как результат индукции фермента аспарагином и аспартатом (лучшим вариантом является аспартат с ионами аммония).

Как уже отмечалось, в литературе есть данные, согласно которым аспартат у некоторых микроорганизмов является более сильным индуктором для аспарагиназы, чем ее природный субстрат—аспарагин [2, 6, 9]. У других микроорганизмов они не влияют на образование аспарагиназы, а у нескольких видов *Pseudomonas* добавление аспарагиновой кислоты или ее амида даже ингибирует синтез фермента [8, 15]. Некоторые авторы [17] предполагают, что наблюдаемое стимулирование синтеза фермента аспартатом связано не с явлением индукции, а с непосредственным участием его в образовании молекулы аспарагиназы, где он является доминирующим. В некоторых случаях индукция фермента аспартатом происходит только в среде, содержащей аммиак, который не влияет на его индукцию аспарагином [9]. Авторы этих данных предполагают, что аспарагиновая кислота превращается в амид и затем индуцирует синтез фермента.

Возможность индукции непосредственно продуктом реакции маловероятна, как и репрессия синтеза фермента его природным субстратом.

В наших опытах измерение pH среды выращивания дрожжей в стационарной фазе роста при разных источниках азота показало, что он меняется по-разному (табл. 1) и зависит от продолжительности и условий выращивания, количественных соотношений источников азота и т. д.

pH среды выращивания сохраняется относительно постоянным при использовании аспартата с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и активность аспарагиназы при этом самая высокая (табл. 1). Так как pH среды играет отнюдь не последнюю роль как во всех происходящих в клетке процессах, так и, следовательно, в накоплении биомассы и проявлении активности аспарагиназы, нами была исследована активность фермента в условиях постоянного pH среды, поддерживаемого путем периодической нейтрализации его 0,1N NaOH. При этом совершенно неожиданно оказалось, что аспарагин и, тем более, аспартат в качестве источника азота не имеют преимуществ по сравнению с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (табл. 2). Следовательно, можно заключить, что аспарагин и аспартат, а также последний в комбинации с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ не являются индукторами аспарагиназы. Их благоприятное влияние на биосинтез фермента, по-видимому, обусловлено степенью поддержания pH среды постоянным.

Таблица 2

Активность аспарагиназы дрожжей в начале логарифмической фазы роста при выращивании на разных источниках азота (pH среды поддерживался постоянным, 6,4)

Источник азота	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	l-аспар- тат	l-аспар- тат + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	l-аспара- гин + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	l-аспара- гин
Активность фермента мкг, N_2 мг сухих дрожжей	45,5	39,0	43,5	42,0	48,0

Важным моментом оказалось выяснение зависимости активности аспарагиназы от фазы роста дрожжей. Как показывают данные (рис.), высокой аспарагиназной активностью обладают клетки в конце лаг-фазы и в начале логарифмической фазы роста. В дальнейшем, в ходе накопления биомассы, активность фермента снижается даже при поддержании pH среды постоянным, правда, она все же выше, чем при снижении pH среды (кривая получена при использовании $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Таким образом, полученные результаты дают основание предположить, что энергичное образование фермента у исследуемых дрожжей происходит в молодых делящихся клетках.

Интересно, что активность аспарагиназы была очень низкой у дрожжей и перед посевом в синтетическую среду, т. е. после выращивания в течение 48 ч на твердом агаре, всего 5 мкг NH_3 /мг сухих клеток (самая высокая активность фермента обнаруживается в начале ло-

гарифмической фазы роста, составляя примерно 45—55 мкг NH_3 /мг сухих дрожжей). Следовательно, после адаптации дрожжей к синтетической среде их аспарагиназная активность повышается примерно в 10 и более раз.

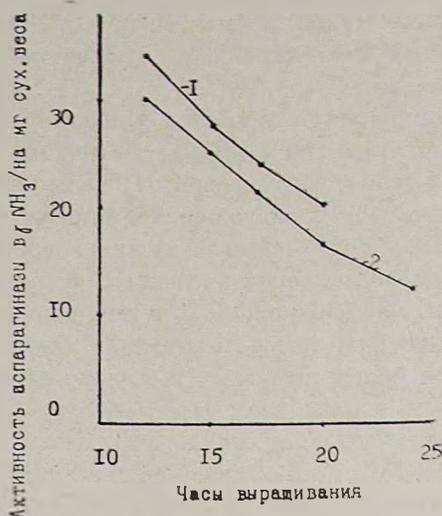


Рис. Зависимость активности аспарагиназы дрожжей от фазы роста и pH среды выращивания. 1—при постоянном pH, 2—при изменяющемся pH.

Изучалось также влияние азотного голодания дрожжей на активность аспарагиназы.

Голодание проводилось в условиях интенсивного аэрирования при 30° в двух вариантах: на дистиллированной воде (24 ч); на 2%-ной глюкозе (48 ч) с последующим перенесением биомассы на дистиллированную воду (24 ч).

Таблица 3

Аспарагиназная активность дрожжей, выращенных на разных источниках азота и на фоне голодания, мкг NH_3 /мг сухих клеток

Источник азота	Аспарагиназная активность перед и после голодания		
	перед голоданием (дрожжи в середине логарифмической фазы роста)	голодание на воде (24 ч)	голодание на 2%-ной глюкозе (24 ч) + на воде (24 ч)
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	36,0	33,0	5,0
l-аспаргат	30,0	28,0	2,5
l-аспарагин	30,0	31,0	1,0

Из табл. 3 видно, что при голодании в течение 24 ч на воде активность аспарагиназы почти не меняется, т. е. не подвергается индукции, подобно большинству катаболических ферментов аминокислотного обмена (аргиназе, глутаматдегидрогеназе и т. д.), во втором же ва-

рианте она резко снижается. Можно предположить, что при азотном голодании на 2%-ной глюкозе происходит катаболитная репрессия, или аспарагиназа расходуется в этих жестких условиях для сохранения жизнеспособности клеток.

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

Поступило 7.V 1980 г.

CANDIDA GUILLIERMONDII BKM-Y-42 ԽՆՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԶԱՅԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԸ

Կ. Ի. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

48 ժամ պինդ ազարի վրա աճելուց հետո *Candida guilliermondii* BKM-Y-42 խմորասնկերն ունեն շատ ցածր ասպարագինազային ակտիվություն: Ֆերմենտի ամենաբարձր ակտիվություն դիտվում է սինթետիկ միջավայրում աճման լադֆազի վերջում ու լոգարիթմական ֆազի սկզբում և կենսազանգվածի աճի հետ մեկտեղ այն նվազում է:

Ասպարագինազային ակտիվությունը կտրուկ իջնում է նաև խմորասնկերը 2% գլյուկոզայի միջավայրում ազոտային քաղցի ենթարկելուց հետո:

Ասպարագինի, ասպարտատի և վերջինիս $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ի հետ որպես աղտի միակ աղբյուր օգտագործելու դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը չի բարձրանում:

Ուսումնասիրված սահմաններում աճման միջավայրի pH-ի նվազման (6,5—2,5) դեպքում ասպարագինազայի ակտիվությունը նվազում է:

SOME ASPECTS OF ASPARAGINASE BIOSYNTHESIS OF *CANDIDA GUILLIERMONDII* YEAST

K. R. STEPANIAN, M. A. DAVTIAN

It has been established that asparaginase activity after the growth during 48 hours on hard agar is low. The activity also considerably decreases after nitrogenous starvation in 2% glucose. The maximal activity of yeast asparaginase has been observed at the end of lagphase and the beginning of logphase, while during accumulation of biomass and decrease of growth medium pH the activity of asparaginase is reduced.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Виноградова Б. Д., Чегалейчик А. Г., Пириева Д. А., Ушаков В. М., Рылкин С. С. Микробиология, 45, 1, 1976.
2. Гривинь П. П., Аузан С. И., Озолин Р. К. Микроорганизмы—продуценты биологически активных веществ, Рига, 1972.
3. Гарьковая Л. Ф., Крайzman З. В., Гривинь П. П., Озолин Р. К. Биосинтез и выделение микробных метаболитов. Рига, 1975.

4. Давтян М. А., Степанян К. Р., Оганесян С. П. Биолог. ж. Армении. 30, 2, 1977.
5. Евсеев Л. П., Николаев А. Я., Еременко В. В., Мардашев С. Р. Биохимия, 32, 4, 1967.
6. Евсеев Л. П. Автореф. канд. дисс., М., 1970.
7. Еременко В. В., Соколов Н. Н. Прикладная биохимия и микробиология, 10, 1, 1974.
8. Занин В. А. Изв. АН СССР (сер. биол.), 3, 338, 1973.
9. Мардашев С. Р., Николаев А. Я., Евсеев Л. П., Еременко В. В. Биохимия, 32, 5, 1967.
10. Мардашев С. Р., Еременко В. В., Николаев А. Я. Микробиология, 39, 11, 1970.
11. Нефедова М. В., Игнатов С. Г., Чигалейчик А. Г., Виноградов Д. А., Егоров Н. С. Прикладная биохимия и микробиология, 14, 4, 1978.
12. Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 28, 9, 1975.
13. Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении. 30, 3, 1977.
14. Смирнов И. П., Занин В. А., Березов Т. Т. Прикладная биохимия и микробиология, 12, 1, 1976.
15. Cedar H., Schwartz J. H. J. Bacteriol., 96, 6, 1968.
16. Roberts J., Burson G., Hill J. M. J. Bacteriol, 95, 2117, 1968.
17. Wehlan H. A., Wriston I. C. Biochem., 8, 6, 1969.