ELECTROPHORETIC PROTEIN PATTERNS OF NODULE BACTERIA MUTANTS

A. Dz. NALBANDIAN, A. Yu. GHARIBIAN

It has been established that the protein composition of the soy-bean and alfalfa nodule bacteria mutants differ from their original strains in their protein composition. No such changes have been detected in the protein composition of esparcet nodule bacteria.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегшвили Ц. К., Магварияни М. З., Рамшвили Н. М. Сообщ. АН Груз. ССР, 86, 3, 697—699, 1977.
2. Желюк В. М., Лобова Н. А. Микробиология, 41, 3, 561—564, 1972.
3. Маурер Г. Диск-электрофорез, 13, М., 1971.
4. Налбандян А. Д., Алексанян А. П. Микробиология, 46, 4, 770—772, 1977.
5. Налбандян А. Д., Алексанян А. П. Биолог. ж. Армении, 31, 8, 799, 1978.
6. Шемаханова И. М., Олейников Р. Р. Докл. АН СССР, 200, 5, 1240, 1971.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 265—267, 1951.

«Биолог. ж. Армении», т. 37, № 10, 1984

УДК 582.282.23:547.466:577.15

ПРОЛИНОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУЛА АМИНОКИСЛОТ В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО СИНТЕЗА ФЕРМЕНТА ДРОЖЖАМИ SACCHAROMYCES VINI

Э. А. МАНТАШЯН, М. А. ДАВТЯН

Научено влияние аминокислот группы глутаминовой кислоты, вносимых в питательную среду в качестве единственных источников азота, на активность пролиноксидазы и состав обменного аминокислотного фонда винных дрожжей. Выявлена прямая корреляция между концентрацией накапливаемого внутриклеточного пролина и активностью пролиноксидазы.

Ключевые слова: дрожжи, аминокислоты, пролиноксидаза.

Индукцированный синтез пролиноксидазы (L-пролин:НАД(Ф)-5-оксидоредуктаза КФ 1.5.1.2), рассматриваемый в аспекте утилизации аминокислот как источников азотного питания, неизбежно связывается со способностью усвоения аминокислот группы глутаминовой кислоты (цитруллин, орнитин, аргинин, пролин). В предыдущих работах рассматривались вопросы индукции пролиноксидазы пролином [3], орнитином [4] и их смесью, являющейся не менее эффективным индуктором, чем отдельная аминокислота [4].

В настоящем сообщении приводятся данные, касающиеся вопросов влияния экзогенного аминокислотного питания на ферментную систему, ответственную за последующее окисление пролина.

Материал и методика. Объектом исследования служили интактные дрожжевые клетки вида *Saccharomyces vini*. Состав используемой питательной среды и способ культивирования опубликованы ранее [2, 3]. Биомассу дрожжей, находящихся в экспоненциальной фазе роста (18-часовая культура), ресуспендировали в свежей среде Ридер, содержащей в качестве источника азота либо одну из нижеуказанных аминокислот, либо сульфат аммония (мг/100 мл; дозы эквивалентны по азоту): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —235; пролин—410; аргинин—310; цитруллин—235; орнитин—273; глутаминовая кислота—525. Инкубацию в этой среде продолжали в течение 60 мин, после чего клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, дважды промывали холодной водой, один раз—0,062 М калий-фосфатным буфером, рН 7,1. После последнего центрифугирования в одной партии определяли пролиноксидазную активность, в другой—спирторастворимую фракцию аминокислот (аминокислотный пул). Пролिनоксидазную активность определяли по убыли пролина реакционной смеси и выражали в микромолях на 100 мг абсолютно сухих дрожжей. Для получения спирторастворимой фракции к одной порции дрожжей (инокулята) приливали 95%-ный этиловый спирт (гидромодуль 30:1) и экстрагировали в пробирках с обратным холодильником в течение часа при 75—80°. Остывший экстракт центрифугировали и использовали для количественного определения аминокислот. Другую порцию дрожжей (постинкубированная культура) аналогичным образом экстрагировали после 60-минутной инкубирования с аминокислотами. Для количественного определения аминокислот использовали метод распределительной бумажной хроматографии [8]. Пролин проявляли отдельно 1%-ным раствором пизатина в этиловом спирте [1], орнитин—2%-ным раствором свежеприготовленного ванилина в н-пропиловом спирте [5], цитруллин—раствором п-диметилбензальдегида в этиловом спирте [5].

В статье приводятся средние результаты трех-пяти повторностей.

Результаты и обсуждение. 1. *Влияние аминокислотных добавок в питательную среду на синтез пролиноксидазы.* Согласно литературным данным, у ряда микроорганизмов синтез пролиноксидазы вызывается пролином и подавляется в присутствии аммония [7], что характерно и для многих других ферментов азотного катаболизма. Если для дрожжей рода *Saccharomyces* достоверно установлено, что синтез аргиназы и орнитинтрансминазы—первых двух ферментов катаболизма аргинина—вызывается аргинином, орнитинном и их аналогами— α , γ -дiamiнобутиратом, лизинном и гомоаргинином [6], то для синтеза дрожжевой пролиноксидазы такие индукторы не установлены. Принимая во внимание взаимосвязь обмена глутамата, аргинина, орнитина, цитруллина и пролина, мы выбрали в качестве возможных индукторов перечисленные аминокислоты и исследовали пролиноксидазную активность. Как видно из данных табл. 1, синтез пролиноксидазы индуцируется пролином, орнитинном, значительно слабее (в 10 раз) глутаматом, аргинином и цитруллином. В присутствии ионов аммония фермент не синтезируется, и, по нашим данным, даже очень низкие концентрации аммония способны оказать репрессивное действие [4].

2. *Влияние аминокислотных добавок в питательную среду на аминокислотный пул дрожжей*

В табл. 2 представлены данные, выражающие на примере пяти аминокислот величину приращения внутриклеточных аминокислот в

Таблица 1

Влияние аминокислот группы глутаминовой кислоты на индуцированный синтез дрожжевой пролиноксидазы, мкмоль пролина/100 мг дрожжей

Источник азота	Пролиноксидаза	Источник азота	Пролиноксидаза
$(NH_4)_2SO_4$	0,16	Цитруллин	1,79
Глутаминовая кислота	1,34	Орнитин	12,57
Аргинин	1,56	Пролин	16,74

Таблица 2

Приращение аминокислот спирторастворимой фракции в постинкубированной на аминокислотах культуре *Sacch. vini*, мкг/100 мг дрожжей

Аминокислоты спирторастворимой фракции	Источники азота					
	NH_4^+	Про	Арг	Цитр	Орн	Глу
Глутаминовая кислота	173	311	311	—	—	356
Аргинин	240	30	477	—	21	—
Орнитин	5	23	—	—	214	37
Цитруллин	—	—	—	532	—	—
Пролин	9	730	204	37	554	62

Примечание: знаком (—) обозначено отсутствие приращения.

постинкубированной на аминокислотах культуре. Обращает на себя внимание высокий прирост глутамата (во всех вариантах, за исключением вариантов с экзогенными цитруллином и орнитинном), пролина, орнитина и цитруллина.

Данные табл. 3 показывают более подробно изменения, происходящие в аминокислотном составе дрожжей (инокулята) после 60-минутного контакта с аминокислотами (постинкубированная культура). Высокое содержание пролина (20% от суммарного аминокислотного состава) в варианте с экзогенным пролином и орнитинном и найденная там же максимальная пролиноксидазная активность наводят на мысль о существовании прямой корреляции между особенностями обмена клетки, обусловленными азотным питанием, и синтезом ферментов, прежде всего индуцированного происхождения (в данном случае пролиноксидазы).

При постинкубировании на аммонии аминокислотный состав не претерпевает существенных изменений и не вносит в дрожжевую клетку дополнительных количеств той или иной аминокислоты. В варианте с пролином резко падает (по сравнению с инокулятом) количество серина, несколько снижается количество валин-метионина, лейцина. Дополнительно синтезируются глицин, глутамат-треонин, тирозин. При постинкубации с аргинином в количественном отношении доминируют аргинин, пролин, глутамат, аспарат, глицин. В варианте с цитруллином обеднение аминокислотного состава отме-

Аминокислотный состав спирторастворимой фракции дрожжей *Saccharomyces vini*, мкг/100 мг дрожжей

Таблица 3

Аминокислоты пула	Инокулят		Инкубация инокулята с аминокислотами											
			NH ₄ ⁺		Про		Арг		Цитр		Ори		Глу	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Цистин	450,0	17,1	300,0	10,5	720,0	18,7	390,0	10,9	270,0	11,9	300,0	10,2	105,0	4,4
Орнитин	187,0	7,1	192,0	6,7	210,0	5,5	110,0	3,1	85,5	3,8	391,0	13,3	224,0	9,3
Лиз+гис	113,0	4,3	108,0	3,8	150,0	3,9	43,0	1,2	94,5	4,1	209,0	7,1	106,0	4,4
Аргинин	480,0	18,2	720,0	25,2	510,0	13,3	957,0	26,8	225,0	9,9	501,0	17,0	450,0	18,9
Аспаргат	123,3	4,7	123,3	4,3	164,4	4,3	460,3	12,9	82,2	3,6	82,2	2,8	123,3	5,2
Серин	212,8	8,1	202,2	7,1	80,9	2,1	85,1	2,4	212,8	9,4	61,7	2,1	106,4	4,5
Цитруллин	—	—	—	—	—	—	—	—	532,0	23,5	—	—	—	—
Глицин	76,9	2,9	76,9	2,7	102,6	2,7	128,2	3,6	76,9	3,4	76,9	2,6	102,6	4,3
Глу-тре	355,5	13,5	528,8	18,5	666,6	17,3	666,6	18,7	355,5	15,6	400,0	13,6	711,0	29,9
Аланин	288,8	11,0	296,2	10,4	242,2	6,3	279,5	7,8	76,4	3,4	223,6	7,6	201,2	8,5
Пролин	49,1	1,9	57,7	2,0	779,5	20,2	253,3	7,1	86,1	3,8	603,1	20,5	110,7	4,6
Глицин	75,0	2,9	67,5	2,4	120,0	3,1	82,5	2,3	52,5	2,3	следы	—	75,0	3,2
Мет.	93,3	3,5	73,3	2,6	56,7	1,5	60,0	1,7	50,0	2,2	50,0	1,7	40,0	1,7
Дей	109,1	4,1	97,7	3,4	68,2	1,8	70,9	2,0	68,2	3,0	32,7	1,1	51,8	2,2
	2613,8		2843,6		3871,1		3586,4		2267,6		2931,2		2407,0	

Примечание: 1—концентрация аминокислоты; 2—процент от суммы.

чтается за счет заметного снижения концентрации лизина+гистидина, аргинина, аланина, лейцина. В то же время при проявке хроматограмм специфическим проявителем, выявляющим цитруллин в виде единственного пятна, последний обнаруживается в обменном фонде исключительно в варианте с экзогенным цитруллином. Что касается накопления пролина в этом варианте, то его количество, хотя и возрастает, но не намного по сравнению с вариантами с пролином и орнитинном.

При постинкубации на орнитине наибольшая доля от суммарного аминокислотного состава приходится на синтезированные орнитин и пролин. Эти аминокислоты, а также аргинин, глутамат и цистин преобладают в фонде, в то время как остальные находятся в небольших количествах. В варианте с глутаматом отмечается обеднение фонда за счет снижения количества цистина, серина, валин-метионина, лейцина. Концентрация пролина повышается незначительно.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что индукция пролиноксидазы дрожжей вида *Sacch. vini* вызывается пролином и орнитинном. Активность пролиноксидазы предопределяется высоким содержанием свободного внутриклеточного пролина, который в условиях описанных экспериментов был найден при культивировании дрожжевых клеток на пролине или орнитине.

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

Поступило 11.1.1984 г.

ԱՄԻՆՈՔՐՈՒՆԵՐԻ ԴՆՏԱՐՈՒԿ ՊՈՒԷԸ ԵՎ ՊՐՈԼԻՆՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ՍԻՆԹԵԶԸ ԿՄՐՈՒԱՆԿԵՐՈՒՄ

Է. Ա. ՄԱՆՏԱՇԻԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻՅԱՆ

Ստուժնատիրվել է գլուտամինաթթվի խմրի ամինաթթուների՝ որպես աճ-ման միջավայրում ազոտի միակ աղբյուրի ազդեցությունը խմորասնկային բջիջների պրոլինօքսիդազային ակտիվության և ամինաթթուների փոխանակու-թյան ֆունկցի վրա: Հաստատվել է ուղիղ կոռելյատիվ կապ կուտակված ներքջա-յին պրոլինի բանակության և պրոլինօքսիդազային ակտիվության միջև:

METABOLIC POOL OF AMINO ACIDS AND PROLINE OXYDASE SYNTHESIS IN YEASTS

E. A. MANTASHIAN, M. A. DAVTIAN

The effect of amino acids of the glutamate acid series as a sole source of nitrogen in growth medium, on the activity of proline oxydase and amino acids pool composition of yeast cells has been studied. A direct correlation between the concentration of intracellular proline and the activity of oxydase has been revealed.

1. Бритиков Е. А. Биологическая роль пролива. М., 1975.
2. Манташян Э. А. Межвузовск. сб. научн. тр. «Биология», вып. 1, 110. Ереван, 1979.
3. Манташян Э. А. Биолог. ж. Армении, 32, 8, 797, 1979.
4. Манташян Э. А. Биолог. ж. Армении, 37, 1, 46, 1984.
5. Хайс И. М., Моцек К. Хроматография на бумаге. М., 1962.
6. Dubois E. Revue des fermentations et des industries alimentaires, 30, 6, 1975.
7. Jayakumar A., Singh H. and Prasad R. BVA, 556, 144, 1979.
8. Lissitzky S., Laurent G. Buil. Soc. biol., 37, 1177, 1955.

«Биолог. ж. Армении», т. 37, № 10, 1984

УДК 577.472

ГИДРОФИЗИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЧИСЛЕННОСТЬ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИТОКОВ ОЗЕРА СЕВАН

Р. О. ОГАНЕСЯН, Г. С. ВАРДАНЯН, М. Г. ГЕЗАЛЯН,
А. А. ҚАРАПЕТАН, В. М. МУРАДЯН

Впервые исследованы удельная электропроводность вод притоков оз. Севан и численность гетеротрофных бактерий в них. Приведены также данные о температуре воды и ее окисляемости. Установлены значительные различия в этих показателях между различными притоками и их участками.

Ключевые слова: притоки оз. Севан, удельная электропроводность, перманганатная и бихроматная окисляемость, гетеротрофные бактерии.

В связи с интенсификацией сельского хозяйства, развитием промышленности и строительством рекреационных объектов в бассейне оз. Севан, а также снижением уровня озера примерно на 19 м, изменившим соотношением объема воды притоков Большого Севана и его нынешнего объема вдвое (объем Большого Севана уменьшился с 39 до 21 км³, годовой приток по рекам составляет около 600 млн. м³, по Арпа-Севанскому водоводу—около 200 млн. м³), создались серьезные предпосылки усиления их эвтрофирующего действия на озеро. В свете сказанного приобретает особое значение комплексное изучение притоков оз. Севан. Мы задались целью исследовать распределение численности гетеротрофных бактерий с определением температуры, удельной электропроводности и окисляемости вод на ряде участков некоторых основных притоков оз. Севан: рр. Масрик, Макенис, Арпа и Гаварагет.

Материал и методика. Исследования проводились в мае—ноябре 1982 г. Пробы воды брали из четырех участков (станции С₁—С₄) р. Масрик, трех (С₅—С₇)—р. Макенис, из приустьевых участков притока р. Арпа и р. Гаварагет. При выборе местоположения станций исходили из того, чтобы они были наиболее показательными для характеристики антропогенного воздействия на водные массы.