

5. Chupin D. Tacheteerouge Simmental, 3, 26-31, 1985.
6. Donaldson L. E. Theriogenology, 21, 4, 517-524, 1984.
7. Donaldson L. E. Theriogenology, 21, 6, 1013-1018, 1984.
8. Creve T. Nord. Vet. Med., 32, 513-522, 1980.
9. Hahn J. Rinderproduktion, 63, 20-21, 1983.
10. Lindren G. M. and Wright R. W. Theriogenology, 29, 4, 407-416, 1983.
11. Rejger D. Theriogenology, 21, 1, 138-149, 1981.
12. Schilling e. d. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 19, 1425-1629, 1979.
13. Seldel G. E. and Seldel S. M. In: New Technologies in Animal Breeding, New York, 1981.
14. Whittingham D. G. Nature, 225, 125-126, 1971.

Поступило 26.II 1986 г.

Биол. ж. Армении, т. 39, № 11, с. 933-937, 1986

УДК 577.15.591.8

## ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АСПАРАГИНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* ВКМ-У-42 ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА И ГЛЮКОЗЫ

К. Р. СТЕПАНИАН, М. А. ДАВТЯН

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

**Аннотация** — Показано, что если в среду источники азота и глюкоза вносятся в количествах, при которых в процессе выращивания дрожжей сравнительно раньше расходуется источник азота, то активность аспарагиназы с начала логфазы роста непрерывно снижается. Если же раньше расходуется глюкоза, то она, несколько снижаясь, затем повышается до значения выше исходного и в случае с аспарагином и сравнивается с ним — при аспартате и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

После расхода глюкозы при всех использованных источниках азота рН среды роста повышается, и в зависимости от степени насыщения клеток азотом в среду выделяется  $\text{NH}_3$ .

**Անոտացիա** — ճուշդ է արժան, որ եթէ միջավայրում գլյուկոզան և ազոտի աղբյուրը ավելացրել են արեւելի բաւակոմիւններով, որ խմորանների անձան պրոցեսում ճամբատարար շուտ է սպառվում ազոտի աղբյուրը, ապա ասպարազինազայի ակտիվութիւնը սկսած բոլորից սկզբից անընդհատ նվազում է, եթէ շուտ է սպառվում գլյուկոզան, ապա ֆերմենտի ակտիվութիւնը որոշ չափով նվազելուց շատ սկսում է անկ և դառնում սկզբնականից բարձր՝ ասպարազինը որքան ազոտի աղբյուրը ասպարտիդէին և ճամբատարվում սկզբնական արժեքին՝ ասպարտատի և  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ի դեպքում:

Գլյուկոզայի ծախսվելուց շատ ասպարտիդիւմ բոլոր ազոտի աղբյուրների դեպքում միջավայրի pH-ը անում է և կախված բջիւնիւրի պարտով ճարտարագիտական աստիճանից միջավայր է արտադրատվում  $\text{NH}_3$ :

**Abstract** — It has been shown that if in the medium the nitrogen sources and glucose have been introduced in such number that in the process of yeasts increasing the nitrogen source is wasted earlier, then the asparaginase activity leading off the beginning of logphase of growth incessantly decreases. If glucose is wasted earlier, then the activity of ferment, decreasing a little, begins to increase and becomes higher than in the beginning when asparagin is used and becomes equal in case of aspartate and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

When glucose has been wasted, the pH of medium increases in case of all the used sources of nitrogen and depending on the degree of saturation of cells with nitrogen  $\text{NH}_3$  is isolated.

*Ключевые слова:* дрожжи, аспарагиназа.

Известно, что в микроорганизмах биосинтез многих соединений, в том числе и ферментов, зависит от условий их выращивания. На образование аспарагиназы значительное влияние оказывают источники азота и углерода.

Ранее нами было показано, что при азотном голодании дрожжей в 2%-ной глюкозе активность аспарагиназы резко снижается. При выращивании дрожжей с использованием разных источников азота активность фермента, особенно в начальных фазах роста, не зависит от типа источника азота, даже если это природный субстрат—*l*-аспарагин. На основании этого было сделано предположение об отсутствии субстратной индукции фермента [2].

Для окончательного решения этого вопроса изучалась активность аспарагиназы в зависимости от количественных соотношений источников азота и глюкозы в питательной среде в процессе выращивания дрожжей.

*Материал и методика.* Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводили по ранее описанным методикам [3]. В качестве ферментного препарата использовали высушенные дрожжевые клетки [1]. Наличие аммиака в ростовой среде определяли реактивом Несслера.

*Результаты и обсуждение.* Из данных табл. 1 видно, что при выращивании дрожжей в среде с обычными концентрациями глюкозы (1%)

Таблица 1. Изменение активности аспарагиназы и pH среды при выращивании дрожжей в средах с разной концентрацией *l*-аспарагина и глюкозы

Время выращивания, ч	Концентрация глюкозы, %	Концентрация аспарагина, г/л	pH среды	Активность аспарагиназы, мкг $\text{NH}_3$	%	Наличие в среде аммиака
14	1.00	3.1	6.25	190	100	—
17			6.15	154	81	—
20			5.25	131	69	—
23			4.20	93	40	—
38			8.25	114	60	+
14	0.10	3.1	7.40	147	100	+
17			8.00	112	76	+
20			8.80	158	107	+
23			9.00	202	137	+
38			9.10	217	140	+
14	0.25	3.1	6.25	188	100	—
17			6.85	139	74	+
20			7.81	175	93	+
23			8.05	190	101	+
38			8.95	250	133	+
14	1.00	1.55	5.35	188	100	—
17			5.10	144	76	—
20			4.00	138	73	—
23			3.85	94	50	—
38			7.25	71	38	—

и источника азота (3,1 г/л L-аспарагина) в начале логфазы роста клетки обладают высокой аспарагиназной активностью. К 23–24 часу (стабионарная фаза) отмечается минимум активности фермента. рН среды снижается, и  $\text{NH}_3$  не выделяется. При выращивании дрожжей в течение более длительного времени (до 38 ч и более) рН ростовой среды повышается до 8 и более. При этом незначительно повышается и активность аспарагиназы, и в среду выделяется  $\text{NH}_3$ .

Когда же концентрация глюкозы в среде в 10 раз меньше нормы, активность аспарагиназы, снижаясь с начала логфазы роста дрожжей, достигает минимума сравнительно раньше (к 16–17 часу роста), причем она не доходит до уровня, наблюдаемого к 23 часу при обычной концентрации глюкозы. В процессе дальнейшего роста дрожжей активность фермента повышается и достигает более высокого уровня, чем в начале логфазы; рН среды непрерывно растет;  $\text{NH}_3$  выделяется уже на начальных стадиях роста дрожжей.

Таблица 2. Изменения активности аспарагиназы и рН среды при выращивании дрожжей до середины логфазы роста и после перенесения их в среду без глюкозы

Время выращивания, ч	Источник азота											
	аспарагин				аспарагат				$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
	а*	б	в	п	а	б	в	п	а	б	в	
В нормальной среде												
16	6,20	156	100	—	6,80	153	100	—	4,10	160	100	
После перенесения в среду без глюкозы												
5	7,65	163	103	+	8,21	150	93	+	6,45	154	96	
22	8,80	216	137	+	9,05	159	104	+	6,50	157	98	

\* а—рН среды, б—активность аспарагиназы, мг  $\text{NH}_3$ , в—наличие в среде аммиака.

Исследован также вариант с внесением в среду четверти нормы (0,25%) глюкозы. В этом случае динамика изменения активности фермента сходна с таковой при использовании 0,1%-ной глюкозы, но несколько менее выражена.

В той же таблице (табл. 1) приведены данные о результатах выращивания дрожжей в среде с обычным количеством глюкозы и в 2 раза меньшим—азота. Видно, что активность аспарагиназы в процессе выращивания дрожжей непрерывно снижается; значение рН среды падает до 23 часа, но к 40-му оно выше, чем на начальной стадии роста;  $\text{NH}_3$  в среду не выделяется. Очевидно, при наличии глюкозы рН среды постепенно снижается, и, наоборот, когда она израсходована,—возрастает. В последнем случае при наличии источников азота, помимо понижения активности фермента, наблюдается также выделение  $\text{NH}_3$ . Следуя этой логике, можно было ожидать повышение активности фермен-

та при переносе дрожжей, выращенных в нормальных условиях в среде, лишенную глюкозы (источник азота L-аспарагин). Данные табл. 2 показывают, что, действительно, в этих условиях активность фермента повышается.

Когда источником азота служит аспарат и глюкоза вносится в среду в обычном количестве или меньше нормы, то в процессе выращивания дрожжей изменение активности аспарагиназы в основном происходит так, как и при аспарагине (табл. 3). Однако после расхода глю-

Таблица 3. Изменения активности аспарагиназы и pH среды при выращивании дрожжей в среде с разной концентрацией глюкозы (источник азота — аспарат)

Время выращивания, ч	Концентрация глюкозы, %	pH среды	Активность аспарагиназы, мкг NH <sub>3</sub>	%	Наличие в среде аммиака
14	1.00	6.80	187	100	—
17		7.08	154	82	—
20		7.13	148	79	—
23		7.35	95	50	—
40		8.65	102	55	—
14	0.10	7.05	130	100	—
17		7.75	117	82	+
20		8.20	113	87	+
23		8.35	127	98	+
40		9.10	129	100	+
14	0.25	6.95	158	100	—
17		7.85	120	76	+
20		8.35	105	66	+
23		8.35	140	87	+
40		9.20	152	100	+

козы, особенно 0,1%-ной, активность аспарагиназы, повышаясь, не превосходит значений этого показателя в начале логфазы; pH среды непрерывно повышается, а NH<sub>3</sub> начинает выделяться сравнительно позже и в меньшем количестве, чем в варианте с аспарагином.

Не повышается активность фермента и в том случае, когда дрожжи, выращенные в нормальных условиях, переносятся в среду без глюкозы, где источником азота является аспарат (табл. 2), несмотря на то, что pH среды повышается и в ней выделяется NH<sub>3</sub>.

Когда источником азота в среде служит (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и глюкоза внесена в количестве в 10 раз меньше нормы, динамика изменения активности фермента в основном аналогична таковой варианта, когда источником азота служит аспарат (табл. 4). А если глюкоза в 4 раза меньше нормы или на уровне нормы, во всех фазах роста дрожжей активность аспарагиназы непрерывно снижается. По всей вероятности, это связано с резким снижением pH среды (3,0 и меньше) уже на ранних этапах роста дрожжей. Несмотря на некоторое возрастание pH после расходования глюкозы, активность фермента не повышается (табл. 4). Не повышается она и в том случае, когда дрожжи, выращенные в нормальных условиях, переносятся в среду без глюкозы, где источником азота служит (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, хотя и в этом случае заметно возрастает pH среды (табл. 4).

Таблица 4. Изменения активности аспарагиназы и pH среды при выращивании дрожжей в среде с разной концентрацией глюкозы (источник азота— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

Время выращивания, ч	Концентрация глюкозы, %	pH среды	Активность аспарагиназы, мкг $\text{NH}_3$	%
14	0.10	5.00	145	100
17		5.20	115	79
20		5.55	127	87
23		5.70	130	90
40		5.80	140	97
11	0.25	3.25	164	100
17		2.85	148	90
20		2.90	130	80
23		3.05	123	75
40		4.85	98	60
60	1.00	4.90	00	00
14		3.70	187	100
17		3.20	150	80
20		3.00	100	54
23		2.60	25	13
40	2.10	00	00	

Исследован также вариант, в котором выращенные в нормальной среде дрожжи переносились в среду без источника азота (табл. 5). Активность аспарагиназы в этом случае непрерывно снижается.

Таблица 5. Изменение активности аспарагиназы и pH среды при выращивании дрожжей до середины логфазы роста и после перенесения их в среду без источника азота

Время выращивания, ч	pH среды	Активность аспарагиназы, мкг $\text{NH}_3$	%
В нормальной среде			
14	3.10	160	100
После перенесения в среду без источника азота			
5	6.15	78	49
22	6.10	40	25

Таким образом, заметное влияние на биосинтез аспарагиназы у дрожжей оказывает количественное соотношение источников азота и глюкозы в среде их роста.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян М. А., Степанян К. Р., Биолог. ж. Армении, 31, 8, 1981.
2. Степанян К. Р., Давтян М. А., Биолог. ж. Армении, 31, 3, 1981.
3. Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А., Биолог. ж. Армении, 28, 9, 1975.

Поступило 28.III 1985 г.