ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
2. *Дроздов Н. С., Матеранская Н. П.* Практикум по биологической химии. 73, М., 1970.
3. *Меерсон Ф. З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М., 1984
4. *Метцлер Д.* Биохимия, 2, 376, М., 1980.
5. *Михлин Д. М.* Биохимия клеточного дыхания. 161, М., 1960.
6. *Нонхибел Д., Уолтон Дж.* Химия свободных радикалов. 382, М., 1977.
7. *Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.* В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), 66—68, М., 1977.
8. *Фридович И. В.* В кн.: Свободные радикалы в биологии (под ред. У. Прайора). 1, 272—314, М., 1979.
9. *Carrel R., Winterbourn C., Rachmilewitz E.* Br. J. Haematol. *30*, 259—264, 1975.
10. *Halliwell B.* FEBS Lett., *92*, 321—326, 1978.
11. *Iain S. K., Shonet S. B.* Biochim. et Biophys. Acta, *612*, 45—54, 1981.
12. *Little C., O'Brien P. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., *31*, 145—150, 1968.
13. *McCord J. M., Day E. D.* FEBS Lett., *86*, 139—142, 1978.
14. *Nicholls P.* Biochim et Biophys. Acta, *99*, 286—287, 1965.
15. *Segal H.* Biochim. et Biophys. Acta, *363*, 378—381, 1974.
16. *Stocks J., Dormandy T. L.* Br. J. Haematol., *20*, 95—111, 1971.

Поступило 10.XI 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 209—213, 1987 УДК 577.352.315+23

ΔΨ-ЗАВИСИМЫЙ ПЕРЕНОС ИОНОВ КАЛИЯ У *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

А. Г. ВАРДАНЯН, С. С. ДУРГАРЬЯН, М. И. ОГАНЕСЯН

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Аннотация — Изучен характер транспорта K^+ у аэробных бактерий *B. flavum*. Показано наличие трех фаз поглощения K^+. Значения K_M и V_{max} для поглощения K^+ близки к характеристикам Trk системы *E. coli*. Калиевый равновесный потенциал соответствует измеренному $\Delta\Psi$. Введение в среду протонофора приводит к реверсии процесса поглощения K^+. В присутствии ЛЦКД не наблюдается поглощения K^+. Арсенат натрия уменьшает вход K^+. Предполагается, что ионы K^+ поступают в клетки *B. flavum* по градиенту электрического поля, при этом АТФ является, видимо, регулятором этого переноса.

Ամփոփում — *Ուսումնասիրված է K^+-ի տրանսպորտի բնույթը B. flavum աէրոբ բակտերիաների մոտ։ Յույց է տրված K^+-ի կլանման երեք փուլերի առկայությունը։ K^+-ի կլանման համար K_M և V_{max}-ի արժեքները մոտ են E. coli բակտերիաների Trh սթրանների բնութագրերին։ Պայիումային հավասարակշռային պոտենցիալը համապատասխանում է չափված $\Delta\Psi$-ին։ Պրոտոնաֆորի ներմուծումը միջավայր հանգեցնում է K^+ կլանման ռևերսիայի։ N,N'-դիցիկլոհեքսիլկարբոդիիմիդի ներկայությամբ լի դիտվում K^+-ի կլանման նատրիումի արսենատ առաջացնում է K^+ ուստի նվազում։ Ենթադրվում է, որ K^+-ի իոնները քափանցում են B. flavum բջիջների մեջ էլեկտրական դաշտի գրադիենտի շնորհիվ, ընդ որում, ԱԵՖ-ը հանդիսանում է այդ պրոցեսի կարգավորիչ։*

Abstract — The character of K^+-transport in respiring bacteria *B. flavum* has been investigated. It has been revealed the presence of three phases of K^+-uptake. The values of K_m and V_{max} for K^+-uptake are close to *E. coli Trk* system characteristics. The equilibrium potassium potential corresponds to the measured $\Delta\Psi$. The application of protonophore with glucose available has led to a K^+-uptake reverse. In the presence of N, N'-dicyclohexylcarbodiimide no K^+-uptake has been observed. Application of sodium arsenate has caused a K^+-uptake decrease. It is assumed that the potassium ions enter the *B. flavum* cells by electrical field gradient, and this transfer may be regulated by ATP.

Ключевые слова: *гиперполяризация мембраны, мембранный потенциал* ($\Delta\Psi$), *ионы* K^+.

У грамположительных аэробных бактерий *Brevibacterium flavum* аппликация метаболизируемых сахаров вызывает резкий и кратковременный выброс ионов водорода и гиперполяризацию мембраны [1, 2]. Этот процесс сопровождается потоком ионов калия внутрь клеток, причем стехиометрия ионного обмена H^+: K^+ равна единице. Эти данные являются предварительным указанием на то, что поглощение K^+ у аэробных бактерий происходит по градиенту электрического поля, в то время как анаэробы используют для транспорта K^+ энергию гидролиза АТФ [5].

В данной работе показано, что в аэробных бактериях *B. flavum* ионы калия действительно распределяются между клеткой и средой пассивно по градиенту электрического поля.

Материал и методика. В работе использовали клетки *Brevibacterium flavum* штамм ATCC 14067 [6]. Бактерии выращивали в течение 18—20 ч в мясопептонном бульоне при 30° на качалке. Дальнейшая процедура подготовки клеток к опыту описана ранее [1]. Количество жизнеспособных бактерий определяли методом высева на твердые питательные среды. Титр клеток в эксперименте достигал $3 \div 5 \times 10^9$ кл./мл. Потоки ионов и разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) определяли с помощью катионселективных электродов по описанным ранее методикам [4, 7, 9]. Внутриклеточную концентрацию ионов калия оценивали по количеству K^+, вытекающему из клеток, обработанных толуолом в концентрации 2,0 мкл/мл. Такая обработка ведет к освобождению 95% внутриклеточного K^+ [8]. Использовали N,N'-дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД), валиномицин, арсенат натрия, карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон (КХФГ) (все Sigma, США), тетрафенилфосфоний (ТФФ+) (Chemapol, ЧССР).

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что добавление глюкозы к суспензии клеток *B. flavum* вызывает резкую секрецию H^+ и гиперполяризацию мембраны с одновременным поглощением ионов калия, совпадающим по характеру с изменением $\Delta\Psi$ [1]. Однако это совпадение не может служить достаточным доказательством того, что только наличие $\Delta\Psi$ обеспечивает наблюдаемое поглощение и распределение ионов калия у *B. flavum*. Одним из основных доказательств того, что K^+ у этих бактерий распределяется пассивно между клеткой и средой является соответствие наблюдаемого распределения этих ионов с измеренной величиной $\Delta\Psi$ (табл.).

Установлено также, что скорость поглощения K^+ и количество ионов, поглощенное клетками, прямо пропорционально активности этого иона в среде в пределах 0,5—5,0 мМ. Соотношение начальных скоро-

Распределение ионов калия между клеткой и средой и $\Delta\Psi$ у *B. flavum* в средах с различным содержанием K^+ в отсутствие глюкозы

$[K^+]_o$ (мМ)	$[K^+]_{in}$ (мМ)	$[K^+]_{in}/[K^+]_o$	E_{K^+} (мВ)	$\Delta\Psi$ (мВ)
0.46	203	443	159	155±8
0.81	227	280	147	147±8
1.91	133	133	127	130±6

Примечание: $[K^+]_o$ — концентрация ионов калия в среде; $[K^+]_{in}$ — концентрация внутриклеточного K^+; величину равновесного калиевого потенциала рассчитывали по формуле

$$E_{K^+} = \frac{RT}{F} \ln ([K^+]_{in}/[K^+]_o).$$

стей потоков H^+:K^+ в изученной нами области концентраций K^+ близко к единице [1]. Из серии этих опытов по методу Лайнуивера-Берка определены значения $K_M = 2{,}4$ мМ и $V_{max} = 0{,}2$ мМ/мин. кл., близкие к характеристикам переноса ионов калия через Trk систему у *E. coli*, которая представляет собой K^+-ионофор [10].

Введение в экспериментальный раствор 10^{-5} М разобщителя окислительного фосфорилирования КХФГ приводит к реверсии процесса поглощения K^+ в присутствии глюкозы (не приведено). При этом скорость секреции ионов водорода, обычно наблюдаемая в течение гликолиза, уменьшается после добавления КХФГ, что объясняется электродиффузионным обратным током протонов, возникающим в результате образования дополнительных H^+-каналов вследствие обработки клеток протонофором КХФГ. Из этого опыта следует, что наличие $\Delta\Psi$ необходимо для поглощения и поддержания ионов K^+ внутри клеток. Поэтому ожидалось, что в присутствии валиномицина (10^{-6} М), создающего дополнительные каналы проводимости для ионов калия в мембране, будет усиливаться поток K^+ внутрь клеток под действием электрического поля. Однако при указанной концентрации валиномицина мы не наблюдали заметного изменения потоков H^+ и K^+ по сравнению с контролем.

На рис. 1 показан характер изменения $\Delta\Psi$ и соответствующих потоков ионов K^+ и H^+ после добавления глюкозы при 30° и 20°. На всех трех кривых обращает на себя внимание наличие трех фаз, строго совпадающих во времени. Первая фаза поглощения K^+ полностью соответствует характеру изменения $\Delta\Psi$. Регистрируемая гиперполяризация мембран аэробных *B. flavum*, как было показано [1, 2], создается усилением секреции H^+ через дыхательную цепь при аппликации глюкозы. Когда мембранный потенциал у этих бактерий достигает некоторого порогового уровня, включение H^+-АТФазы в режим синтеза АТФ ведет к небольшому падению $\Delta\Psi$ с последующей его стабилизацией, очевидно, благодаря уравновешиванию потоков H^+, направленных из клетки в среду и из среды в клетку, соответственно через дыхательную цепь и H^+-АТФазу. Подтверждением последнего предположения может слу-

жить то, что, как уже было показано, в присутствии ДЦКД, блокирующего H^+-АТФазу и повышающего $\Delta\Psi$, секреция ионов H^+ после добавления глюкозы происходит без изменений скорости [2], и при этом наблюдается некоторое поглощение ионов K^+.

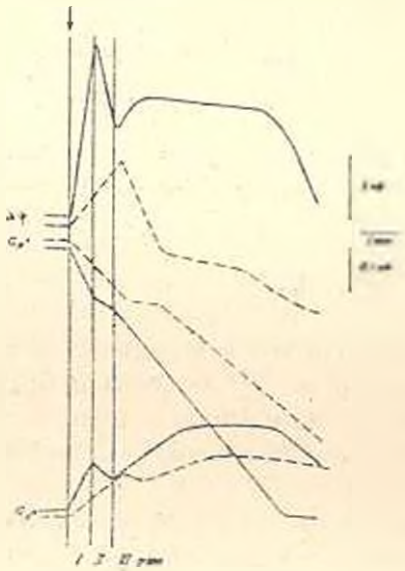

Рис. 1.

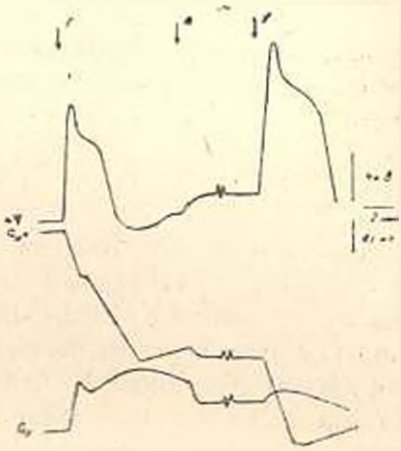

Рис. 2.

Рис. 1. Изменения активностей ионов H^+ и K^+ в среде и гиперполяризация мембраны *B. faecium* при аппликации глюкозы (Г, 2,0 мМ) при 30° (сплошная линия) и 20° (пунктир). Экспериментальная среда содержала (в мМ): трис — 10,0, H_3PO_4 — 3,0, KCl — 1,0, NaCl — 1,0, $MgSO_4$ — 1,0, ТФФ$^+$ — 2×10^{-3} (pH 7,3). Исходный уровень $\Delta\Psi$ практически не зависит от температуры и составляет —145 мВ. Фазы I, II, III показаны только для кривых при 30°.

Рис. 2. Изменения мембранного потенциала и активностей ионов H^+ и K^+ в среде у *B. faecium* при аппликации глюкозы (Г, 2,0 мМ) до и после добавления арсената натрия (А, 3,0 мМ). Условия эксперимента идентичны описанным в подписях к рис. 1 при 30°.

Снижение температуры приводит к замедлению секреции H^+, соответственно уменьшается гиперполяризация и замедляется вход K^+ (рис. 1), но при этом начальный уровень $\Delta\Psi$ до аппликации глюкозы остается постоянным (—145 мВ). Для первой фазы поглощения K^+ нами определен коэффициент Вант-Гоффа Q_{10}, равный 1,3. Это значение температурного коэффициента почти совпадает со значением $Q_{10}=1.4$ для физической диффузии [3], что еще раз указывает на неферментативный характер переноса ионов калия внутрь клеток в период первой фазы поглощения.

При аппликации глюкозы в присутствии арсената натрия амплитуда гиперполяризационных ответов увеличивается (рис. 2), хотя как скорость, так и количество выходящего H^+ уменьшаются. В этом случае уменьшается также поток K^+ внутрь, что, очевидно, можно объяснить отсутствием АТФ. Как было показано ранее [2], ионы K^+, поступая в клетки в ответ на гиперполяризацию мембраны, уменьшают амплитуду гиперполяризации. Поэтому в отсутствие потока ионов K^+, направлен-

ного из среды в клетку, наблюдается реальная величина амплитуды гиперполяризации—большая по сравнению с контролем (рис. 2).

Таким образом, ионы калия поступают в клетки *B. flavum* по градиенту электрического поля, но при этом АТФ, возможно, является регулятором этого переноса. Причем регуляция может быть как аллостерической, так и происходящей за счет фосфорилирования какого-то белка Trk системы, как это детально обсуждается Стьюартом и др. [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Варданян А. Г., Мартиросов С. М.* Биофизика, *31*, 5, 833, 1986.
2. *Варданян А. Г., Гончегулян А. Е., Петросян П. К., Мартиросов С. М.* Биофизика, *31*, 6, 993, 1986.
3. *Ленинджер А.* Биохимия, 700, М., 1974.
4. *Мартиросов С. М., Трчунян А. А., Варданян А. Г.* Биофизика, *27*, 1, 48, 1982.
5. *Мартиросов С. М., Трчунян А. А.* Биофизика, *31*, 3, 464, 1986.
6. *Штанников А. В., Лившиц В. А., Жданова Н. Н.* Генетика, *17*, 1419, 1981.
7. *Durgaryan S. S., Martirosov S. M.* Bioelectrochem. Bioenerg., *5*, 554, 1978.
8. *Eisenstadt E.* J. Bacteriol., *112*, 264, 1972.
9. *Martirosov S. M., Petrosian L. S., Trchounian A. A., Vardanian A. G.* Bioelectrochem. Bioenerg., *8*, 613, 1983.
10. *Stewart L. M. D., Bakker E. P., Booth I. R.* J. Gen. Microbiol., *131*, 77, 1985.

Поступило 30.IX 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 213—219, 1987 УДК 663.1.577.112.38:582

БИОСИНТЕЗ L-ПРОЛИНА ИЗОЛЕЙЦИНЗАВИСИМЫМИ МУТАНТАМИ *BREVIBACTERIUM FLAVUM* НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ МЕЛАССУ

Э. М. АКОПЯН, Б. И. КАРАБЕКОВ, В. Е. АКСЕНОВСКАЯ, А. А. БУЛУТЯН, А. Г. МУРАДЯН, Ф. Н. ТХРУНИ

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Аннотация—Изучена возможность осуществления биосинтеза l-пролина изолейцинзависимыми мутантами *B. flavum* на питательных средах, содержащих в качестве источника сахара свекловичную и тростниковую мелассы. Установлено, что свекловичная меласса обладает выраженной ингибирующей активностью в отношении биосинтеза этой аминокислоты, в то время как тростниковая, наоборот, стимулирует этот процесс. Эффект от применения этих видов мелассе зависит от их содержания в питательной среде. Определены условия практического применения этих видов сырья для получения l-пролина.

Անոտացիա — *Ուսումնասիրված է l-պրոլինի բիոսինթեզը Brevibacterium flavum իզոլեյցինից կախված մուտանտների կողմից սնուցող միջավայրում՝ որպես շարարի ազբյուր օգտագործելով ճակնդեղի և շաքարեղեգի մելասաներ։ Հաստատված է, որ այդ ամինաթթվի բիոսինթեզի նկատմամբ ճակնդեղի մելասան օժտված է արտահայտիչ արգելակող հատկությամբ, այն դեպքում, երբ շաքարեղեգի մելասան, ընդհակառակն, օժտված է խթանող հատկությամբ։ Այդ երկու տեսակի մելասաների օգտագործման էֆեկտը կախված է սնուցող միջավայրում նրանց պարունակությունից։ Որոշված են այդ երկու տեսակի հումքերի գործնական կիրառման պայմանները l-պրոլինի ստացման համար։*