

Биол. журн. Армении, 3-4 (57), 2005

УДК 591.1.05

**ВЛИЯНИЕ АРГИНИНА И НЕКОТОРЫХ САХАРОПОНИЖАЮЩИХ  
СОЕДИНЕНИЙ НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ  
*CANDIDA GUILLIERMONDII* НП-4**

**А.Х. АГАДЖАНЫН, С.В. ЧУБАРЯН, Л.Р. ТУМАНЯН, А.А. АГАДЖАНЫН,  
А.А. НИКОЯН, М.С. МАРТИРОСЯН, Л.Г. АНАНЯН**

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049*

Исследовали влияние аргинина и некоторых сахаропонижающих препаратов на накопление биомассы дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4. Выявлено, что аргинин, являясь субстратом аргиназы при концентрации 1.15 мМ, ингибирует активность фермента по принципу субстратной ингибиции. Гипосульфит при низких концентрациях стимулирует синтез биомассы, а выше указанной концентрации - ингибирует процесс. Глибенкламид подавляет синтез биомассы дрожжей, а гильелес при концентрации 0.04 мМ увеличивает биомассу на 60%.

Ուսումնասիրվել է արգինինի և շաքարի քանակությունը իջեցնող որոշ նյութերի ազդեցությունը խմորասնկերի կենսազանգվածի կուտակման վրա: Հաստատվել է, որ արգինինը չի համարվում լավ խթանիչ խմորասնկերի ածի համար: Արգինինը, համարվելով արգինազայի սուբստրատ, 1.15 մМ դեպքում ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունը հետադարձ կապի սկզբունքով: Հիպոսուլֆիտի ցածր կոնցենտրացիան խթանում է կենսազանգվածի սինթեզը, իսկ բարձրի դեպքում՝ ընկճում է այն: Գլիբենկլամիդը ընկճում է խմորասնկերի կենսազանգվածի սինթեզը, իսկ զիլելեսը 0.04 մМ կոնցենտրացիայի դեպքում ավելացնում է կենսազանգվածը 60%-ով:

The influence of arginine and some of sugar-falling preparations on accumulation of yeast *Candida guilliermondii* biomass has been investigated. Arginine is not good stimulator for growth of yeast. Arginine at 1.15 mM concentration depresses the activity of arginase by substrate inhibition. Hyposulphite in low concentration stimulates synthesis of biomass but it inhibites process in high concentration. Hlibenclamide inhibits synthesis of yeast biomass but hileles at 0.04 mM concentration increases biomass for 60%.

*Аргиназа - аргинин - биомасса - дрожжи*

Аргинин участвует в синтезе белка и аминокислот. Все ткани используют его для ядерного и цитоплазматического биосинтеза. Аргинин - единственный переносчик гуанидиновой группы - является мощным стимулятором синтеза креатина. Следовательно, он принимает участие в первичном накоплении клеточной энергии в виде креатинфосфата. Аргинин участвует в цикле переаминирования и выведения из организма конечного азота, т.е. продукта распада отработанных белков. От мощности работы цикла мочевинообразования зависит способность организма, синтезируя мочевину, очищаться от белковых шлаков. Это один из самых эффективных стимуляторов продукции соматотропного гормона гипофиза (гормона роста). В последнее время пристальное внимание направлено на аргинин, потому

что он является донором оксида азота (NO) - эндотелиального релаксирующего фактора. L-аргинин под действием фермента NO-синтазы превращается в оксид азота и цитруллин. Конечными продуктами метаболизма NO являются нитриты и нитраты, которые в свою очередь восстанавливаются в NO. Оксид азота - биологически активное вещество, медиатор биохимических процессов, мощный эндогенный вазодилататор. Аргинин усиливает артериальный кровоток печени, улучшает процессы печеночной микроциркуляции, уменьшает гипоксию печени [4].

При многих заболеваниях, особенно при ишемической болезни сердца и хроническом обструктивном бронхите, синтез NO значительно снижается. Его дефицит приводит к дальнейшему прогрессированию поражения сердца и легких. При недостаточной продукции NO требуется его компенсация аргинин цитратом [5].

Заслуживают внимания данные о том, что в условиях *in vivo* нитрит натрия оказывает иммунодепрессивное действие, проявляющееся в угнетении лейкопоеза и снижении функций активных нейтрофилов крови. В этих же условиях нитрит натрия не влияет на функцию активных рецидентных перитонеальных макрофагов [1, 3].

Целью настоящей работы является изучение влияния аргинина и некоторых сахаропонижающих соединений на накопление биомассы дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4.

**Материал и методика.** Объектом исследования служили некоторые лекарственные растения и дрожжи *C. guilliermondii* НП-4. Подготовка посевного материала для дрожжей осуществлялась по следующей схеме: музейная культура → двухсуточная культура на 2%-ном сусло-агаре → культура, выращенная в жидкой синтетической питательной среде следующего состава: глюкоза - 10г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1.23г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.625г, NaCl - 0.125г,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 3.12г,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0.125г на 1 л водопроводной воды. Среду распределяли по 100 мл в литровые конические колбы и подвергали стерилизации при 0.5 атм. в течение 20 мин. К стерильной среде добавлялся простерилизованный раствор биотина в расчете 0.8 мг на 100 мл. Инкубацию проводили в течение 20-22 ч при интенсивном взбалтывании при 30°-32°С. Подготовленную к опыту культуру центрифугировали, промывали, суспензировали в 12 мл воды, отсюда брали 1 мл и доводили до 50 мл водой и нефелометрировали. Исходя из показаний ФЭК-а(КФК-2-УХЛ 4.2), по стандартной кривой определяли количество дрожжей. Сухую биомассу уточняли взвешиванием. Статистическая обработка проведена по Вознесенскому [2].

**Результаты и обсуждение.** Изучали влияние аргинина на накопление биомассы дрожжей *C. guilliermondii* НП-4 (табл. 1).

Таблица 1. Влияние различных концентраций аргинина на накопление биомассы дрожжей *C. guilliermondii* НП-4 (n=7)

Субстрат	Концентрация аргинина, мМ	Синтезиров. биомасса, мг
Контроль	-	0.82±0.05
L-аргинин	0.14	1.02±0.07
	0.28	0.89±0.06
	0.43	0.89±0.06
	0.57	0.88±0.06
	1.15	0.89±0.06

Полученные данные показывают, что добавление аргинина к питательной среде (за исключением 0.14 мМ) не влияет на накопление биомассы дрожжей. Нас заинтересовало, какое влияние окажет расщепление добавленного в среду роста аргинина на орнитин и мочевину.

Таблица 2. Влияние аргиназы на накопление биомассы дрожжей *C. guilliermondii* НП-4 (n=7)

Субстрат	Концентрация аргинина, мМ	Количество аргиназы, мг	Синтезир. биомасса, мг
Контроль	-	2	0.82±0.05
L-аргинин	0.14	2	1.44±0.10
	0.28	2	1.58±0.10
	0.43	2	1.77±0.12
	0.57	2	2.00±0.14
	1.15	2	1.53±0.10

Согласно полученным данным (табл. 2), добавление в среду аргиназы с аргинином оказывает стимулирующее влияние на рост дрожжей. Интересно то обстоятельство, что при концентрации аргинина 0,57 мМ в среде инкубации усиливается процесс накопления биомассы. Аргинин, являясь субстратом аргиназы, при концентрации 1,15 мМ ингибирует активность фермента по принципу субстратной ингибиции. Далее исследовали влияние непосредственного внесения в среду роста продуктов распада аргинина- мочевины и орнитина, а также цитруллина (табл.3).

Таблица 3. Влияние различных соединений на накопление биомассы дрожжей *C. guilliermondii* НП-4 (n=7)

Субстрат	Концентрация субстрата, мМ	Синтезир. биомасса, мг
Контроль	-	0.82±0.05
L-орнитин	0.24	1.32±0.08
	0.48	1.53±0.04
L-цитруллин	0.29	0.96±0.05
	0.57	1.06±0.05
Мочевина	0.23	0.82±0.05
	0.95	1.03±0.05
L-аргигин + аргиназа	0.48	2.00±0.09

Из приведенных данных следует, что во всех вариантах в той или иной степени наблюдается увеличение биомассы дрожжей. Однако уровень накопления биомассы достигает максимума, в варианте аргинин+аргиназа, где сам аргинин может являться субстратом для определенных ферментативных процессов, вследствие чего происходит усиленный синтез биомассы.

Некоторая стимулирующая роль L-цитруллина и мочевины может быть обусловлена использованием азота этих соединений при росте дрожжей.

В следующей серии экспериментов нами изучено влияние сахаропонижающих соединений на накопление биомассы дрожжей.

Таблица 4. Влияние гипосульфита на накопление биомассы дрожжей *S. guilliermondii* НП-4 (n=7)

Субстрат	Концентрация гипосульфата, мМ	Синтезиров. биомасса, мг
Контроль	-	0.78±0.05
Гипосульфит	0.06	1.13±0.07
	0.32	0.95±0.06
	0.63	0.54±0.05
	3.16	0.48±0.05

Данные, приведенные в табл. 4, показывают, что гипосульфит при низких концентрациях (до 0.06 мМ) стимулирует синтез биомассы, а выше этой концентрации ингибирует процесс.

Далее мы нейтрализовали гипосульфит и проводили исследования в присутствии нейтрального гипосульфита (табл.5).

Таблица 5. Влияние нейтрального гипосульфита на накопление биомассы дрожжей *S. guilliermondii* НП-4 (n=7)

Субстрат	Нейтрализация HCl (капл.)	Концентрация гипосульфата, мМ	Синтезиров. биомассы, мг
Контроль	-	-	0.78±0.05
Гипосульфит	5	0.06	1.03±0.06
	5	0.32	1.01±0.06
	5	0.63	0.58±0.05
	5	3.16	0.48±0.05

Из полученных данных следует, что нейтрализация гипосульфита не действует на накопление биомассы дрожжей *S. guilliermondii* НП-4.

Результаты исследования влияния на рост биомассы некоторых сахаропонижающих соединений и растительного экстракта для лечения сахарного диабета представлены в табл. 6.

Таблица 6. Влияние различных сахаропонижающих соединений на накопление биомассы дрожжей *S. guilliermondii* НП-4 (n=7)

Сахаропонижающие препараты	Концентрация, мМ	Синтезиров. биомасса, мг
Контроль	-	0.78±0.05
Глибенкламид	0.02	0.83±0.05
	0.04	0.97±0.05
	0.06	0.75±0.05
Гилъелес	0.02	0.98±0.05
	0.04	1.26±0.07
Экстракт для лечения сахарного диабета	1 мл	1.44±0.08
	10 мл	1.83±0.08

Согласно данным (табл. 6), глибенкламид практически не влияет на синтез биомассы дрожжей, а гилъелес, при концентрации 0.04мМ в среде, увеличивает количество биомассы на 60%. Экстракт растений увеличивает биомассу дрожжей почти в 2.5 раза. Следовательно, разные вещества, способствующие понижению сахара в крови, по-разному действуют на накопление биомассы дрожжей. По всей вероятности, дрожжевые клетки резко отличаются от клеток человека и других млекопитающих, поэтому под действием этих препаратов происходит ингибция синтеза биомассы дрожжей. По-видимому, у человека и других млекопитающих комплексирование препаратов сульфаниламочевинны с рецепторами мембраны  $\beta$ -клеток или метаболизм глюкозы внутри  $\beta$ -клетки приводит к генерации АТФ и закрытию АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов. Повышение внутриклеточного калия способствует деполяризации мембраны  $\beta$ -клетки, открытию вольтаж-чувствительных  $Ca^{++}$ -каналов, вхождению в клетку ионов кальция, повышению его концентрации, что в свою очередь стимулирует высвобождение инсулина из  $\beta$ -клеток процессом экзоцитоза [3]. Можно сказать, что у дрожжей этот механизм не функционирует.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Виноградов Н.А.* Антибиотики и химиотерапия. 2, 24-29,1998.
2. *Вознесенский В.А.* Первичная обработка экспериментальных данных. Л.,1969.
3. *Дерягина В.П., Машковцев Ю.В., Ильницкий А.П.* Биомедицинская химия. 49, 1, 19-26, 2003.
4. *Калентерян Г.З., Базеян А.А., Гаспарян Х.С.* Сб. Научные труды и сообщения. Ереван, 2003.
5. *Тюрина С.Н.* Труды Донецкого гос. мед. университета, 1-6, 2002.

Поступила 12.VII.2004