

БИОХИМИЯ

М. А. Тер-Карапетян, член.-корр. АН Армянской ССР.  
 А. М. Оганджян и Ш. А. Авакян

О некоторых особенностях окислительного распада и  
 аэробной ассимиляции уксусной кислоты дрожжевыми организмами

(Представлено 16.VIII.1956)

В последние годы изучению путей окислительного распада и ассимиляции уксусной кислоты, а также участию последней в биосинтезе аминокислот у дрожжевых организмов уделялось большое внимание.

Наряду с этим сравнительно меньше внимания обращалось на изучение закономерностей размножения дрожжевых организмов при аэробной ассимиляции уксусной кислоты, когда последняя присутствует в качестве единственного источника углерода.

Недостаточно изучались в частности соотношения:  $\frac{\text{максимально усвоенная заданная}}{\text{синтезированная биомасса}}$ ,  $\frac{\text{потребленный усвоенная}}{\text{усвоенная } \text{CH}_3\text{COOH}}$ ,  $\frac{\text{выделившийся } \text{CO}_2}{\text{усвоенная } \text{CH}_3\text{COOH}}$  и  $\frac{\text{углерод биомассы} + \text{углерод } \text{CO}_2}{\text{углерод субстрата}}$ .

Эти количественные соотношения представляют определенный теоретический и практический интерес — они характеризуют количественную сторону окислительного распада и ассимиляции уксусной кислоты, а в условиях производства служат критерием для установления норм расхода кислорода, выхода биомассы и др.

Настоящая работа посвящена изучению вышеуказанных количественных соотношений при аэробной ассимиляции уксусной кислоты в качестве единственного источника углерода. Кроме того, проведено исследование в условиях применения уксусной кислоты, меченой в карбоксильной группе радиоактивным углеродом  $\text{C}^{14}$ , для определения участия каждого из атомов углерода в образовании  $\text{CO}_2$  и клеточной массы.

Исследования окислительного распада и аэробной ассимиляции уксусной кислоты проведены отдельными исследователями не всегда в одинаковых условиях, что лишает возможности сравнения полученных результатов. В частности, ряд исследований проведен не всегда в полноценных для роста и размножения клеток условиях (<sup>1-7</sup>).

Особенность приведенного нами экспериментального материала заключается в том, что он получен с дрожжевой культурой, усваивающей уксусную кислоту без предварительной адаптации и лаг фазы роста культуры, представляющей высокую степень усвоения, обладающей и высокой степенью синтеза биомассы, из уксусной кислоты, при образовании в среде 3—4 генераций клеток.

*Методика исследования.* Объектом исследования служил штамм дрожжей из рода *Candida*, содержащийся постоянно на агаре с 1% ксилозы. Перед опытом, за 18—24 часа, он пересевался в жидкую среду с 1% ксилозы.

После тщательного промывания дистиллированной водой молодая культура засеивалась в опытную среду из расчета 5—8 мг сухой массы на 100 мл среды.

Опытная среда имела следующий состав — уксусная кислота 8—10 г, половина которой нейтрализовалась 1 N раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —6 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —1,00 г,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —0,10 г,  $\text{Zn}^{++}$  (из  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )—60γ,  $\text{Fe}^{++}$  (из  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )—100 γ, вода водопроводная—1 л.

В качестве источника биологических активаторов к среде добавлялся экстракт солодовых ростков из расчета 33,3 мл на 1 л. В этом количестве экстракта содержались 17 мг органического азота, из коих 5 мг амидного азота аспарагина и 116 мг органического углерода, из коих 14,6 мг аспарагинового.

Опыты проводились частично в специальной аппаратуре (8) в T-образных сосудах, наполненных 15—30 мл среды и частично в аппарате Варбурга при содержании 1,6—2,2 мл среды в сосудике.

Продолжительность опытов колебалась от 9 до 12 час., температура поддерживалась при  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ , а pH колебалась в пределах 5—7.

Опыты с радиоактивной уксусной кислотой проводились с  $\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{OON}$  активностью 11,5 мС в 1 мл, которая добавлялась к основной среде после разбавления до концентрации  $12 \cdot 10^{-4}$ ; активность последнего раствора равнялась 13,8 мС /мл соответствующей  $3 \cdot 10^7$  распад мин/мл.

Активность препаратов была подсчитана торцовым счетчиком с помощью известной техники. Результаты подсчетов корректировались на самоослабление. Перед каждой серией подсчетов была определена доля испускаемых препаратом β-частиц по счетчику; в отдельных сериях она колебалась от 0,4 до 1,0%.

*1. Коэффициент усвоения, синтез биомассы и выделение  $\text{CO}_2$  при аэробной ассимиляции уксусной кислоты.* Экспериментальные результаты приведены в табл. 1.

Результаты экспериментов показывают, что исследуемый дрожжевой организм способен усвоить более 94% заданной уксусной

Таблица 1

№№ опыт.	Исходная CH <sub>3</sub> COOH мг	Усвоенная CH <sub>3</sub> COOH мг	Синтезиро- ванная биомасса мг	Выделен- ный CO <sub>2</sub> мг	Усвоен. CH <sub>3</sub> COOH	Синтезиро- ванная био- масса	Выделен. CO <sub>2</sub>
					исходная CH <sub>3</sub> COOH %	усвоенная CH <sub>3</sub> COOH %	Усвоенная CH <sub>3</sub> COOH %
1	438	421	186	233	96,4	44,0	55,2
2	272	252	108	164	92,8	42,8	65,0
Средн.	—	—	—	—	94,6	43,4	60,1

кислоты в среде с исходной концентрацией ее около 0,80% и синтезирует биомассу до 44% (в абсолютно сухих веществах) от усвоенной уксусной кислоты. Последние данные превышают на 5% выход биомассы, полученной в подобной среде культурой *Torulopsis utilis* (9).

2. Поглощение кислорода при аэробной ассимиляции CH<sub>3</sub>COOH и CH<sub>3</sub>C<sup>14</sup>OON. Динамика и количество поглощенного кислорода были параллельно исследованы, с одной стороны, при ассимиляции ксилозы и CH<sub>3</sub>COOH и с другой — при ассимиляции CH<sub>3</sub>COOH и CH<sub>3</sub>C<sup>14</sup>OON.

Результаты этих исследований приведены в табл. 2 и на рис. 1 и 2.

Таблица 2

	I серия		II серия			
	Кси- лоза	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COOH+CH <sub>3</sub> C <sup>14</sup> OON		
Объем среды в сосуди- ках (мл)	2,2	2,2	1,6	1,6	1,6	1,6
Исходн. концентрация субстрата в среде в %	0,89	0,81	0,70	0,70+ 0,0036*	0,70+ 0,0072*	0,70+ 0,072*
Исходн. колич. субстра- та в сосудах (мг)	19,5	17,2	11,2	11,2+ 0,006*	11,2+ 0,012*	11,2+ 0,12*
Исходная активность в одном сосудике (тС)	—	—	—	0,069	0,138	1,38
Усвоенный субстрат (мг)	7,5	4,84	3,0	—	—	—
Потребленный O <sub>2</sub> (мг)	2,71	2,84	1,74	1,66	1,84	1,53
Синтезированная био- масса (мг)	3,85	2,17	1,5	1,6	1,6	1,5
Синтезирован. биомас- са % усвоен. субстрат %	50,0	45,0	50,0	—	—	—
г-атом кислорода на 1 г-моль субстрата	3,4	2,2	2,2	—	—	—
Генерации клеток	3	2	2	2	2	2

\* означает концентрацию или количество CH<sub>3</sub>C<sup>14</sup>OON.

Полученные результаты показывают следующее:

а) окислительный распад и аэробная ассимиляция уксусной кислоты происходят у исследуемого организма без предварительного периода адаптации или лаг фазы; в этих условиях динамика поглощения кислорода не представляет никакого расхождения в средах

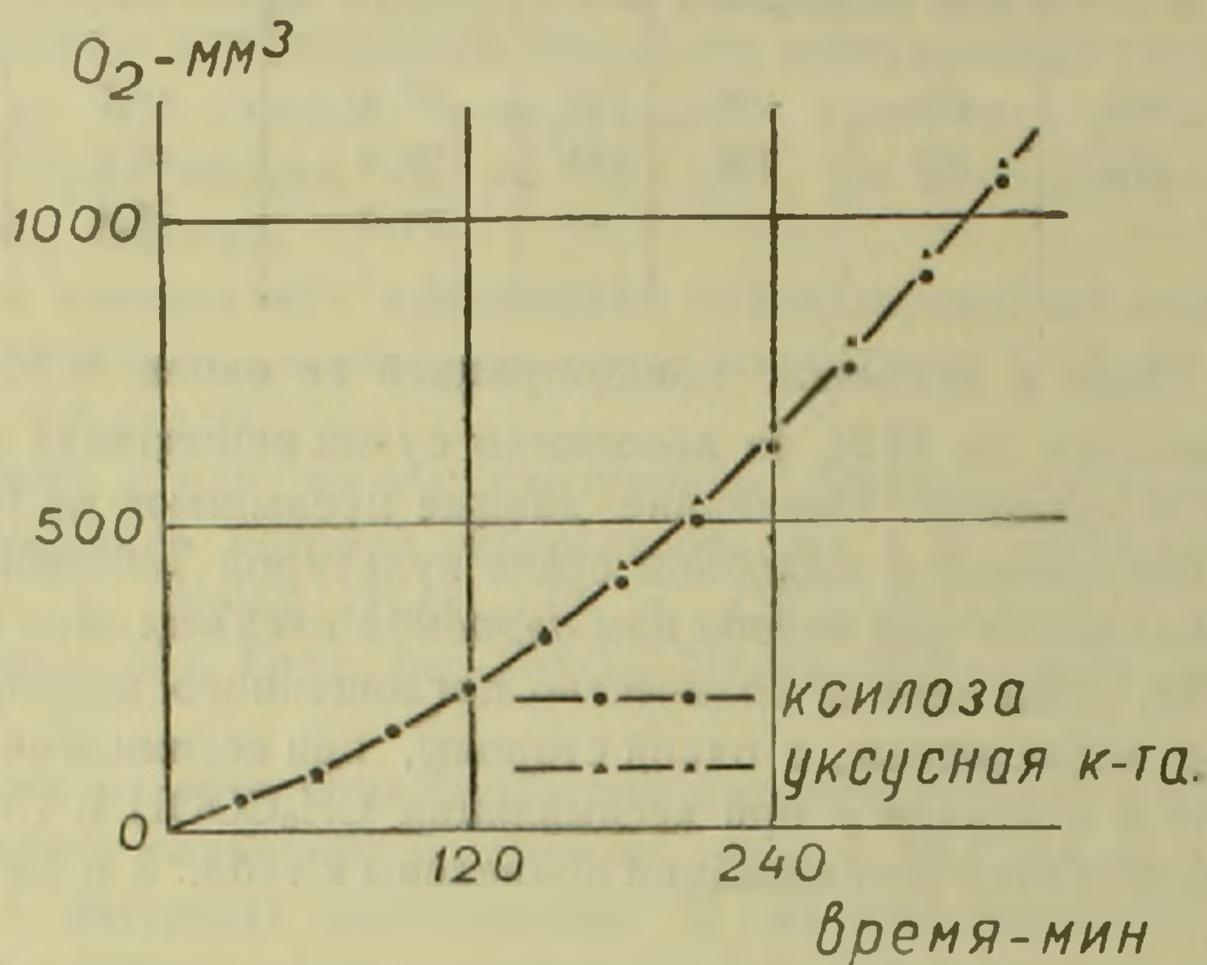


Рис. 1.

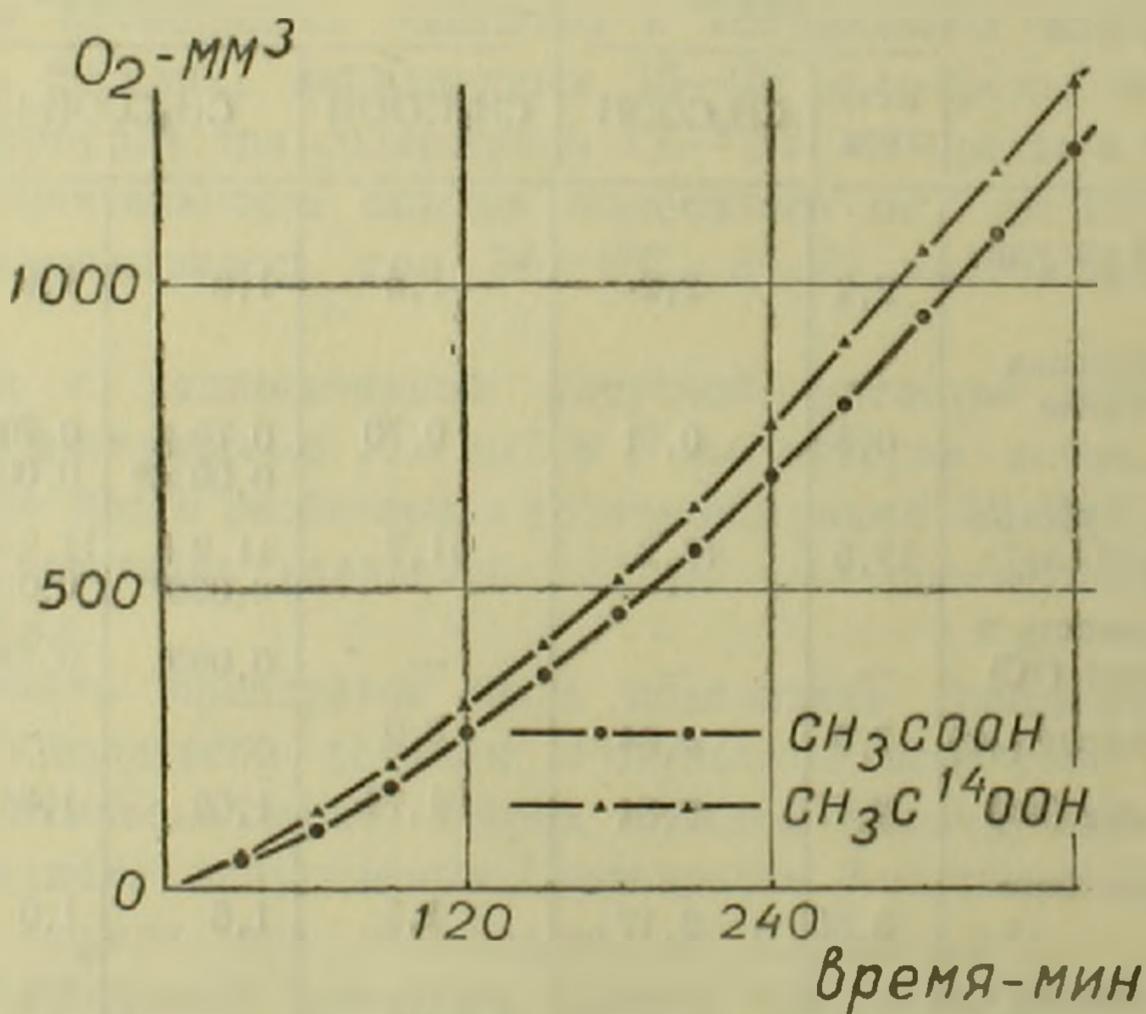


Рис. 2.

с ксилозой или уксусной кислотой; окислительный распад субстрата происходит медленнее в случае с уксусной кислотой, чем с ксилозой, вследствие чего в первом случае размножение клеток происходит медленнее, чем во втором;

б) при окислительном распаде уксусной кислоты, сопровождающемся размножением дрожжевых клеток, поглощается 2,2 грамма кислорода на каждую молекулу субстрата; такое количество значительно превышает расход кислорода, присущий окислительному распаду и ассимиляции глюкозы и ксилозы (<sup>10</sup>);

в) наличие в основной среде уксусной кислоты, меченой в карбоксиле радиоактивным изотопом C<sup>14</sup> в концентрациях в пределах 0,86—86  $\mu$ C в 100 мл, не оказывает заметного влияния на динамику поглощения кислорода и слабо угнетает синтез биомассы.

Это дало нам основание провести опыты по усвоению CH<sub>3</sub>C<sup>14</sup>ООН в широком диапазоне концентраций радиоактивного соединения.

Явление временного угнетения дыхания дрожжей, описанное П. А. Власюком (<sup>11</sup>) с радиоактивным фосфором (P<sup>32</sup>) в дозах выше 10  $\mu$ C в 100 мл, нами не наблюдалось.

3. *Баланс углерода при аэробной ассимиляции CH<sub>3</sub>COOH и CH<sub>3</sub>C<sup>14</sup>ООН.* Результаты параллельных опытов, проведенных с CH<sub>3</sub>COOH и CH<sub>3</sub>C<sup>14</sup>ООН, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Источник углерода		CH <sub>3</sub> COOH		CH <sub>3</sub> COOH + CH <sub>3</sub> C <sup>14</sup> ООН			
		мг	% от общего	% от усвоенного	активность во всей пробе имп/мин	% от общего	% от усвоенного
В начале опыта	В исходной среде	5,3	98,2	—	12100	100	—
	в том числе:						
	в уксусной кислоте	5,2	96,4	—	—	—	—
	в биоактиваторах	0,1	1,8	—	—	—	—
	В посевных дрожжах	0,1	1,8	—	—	—	—
	Сумма	5,4	100	—	—	—	—
В конце опыта	В остаточной среде	4,05	75,0	—	2100	17,4	—
	в том числе:						
	в уксусной кислоте	3,8	70,5	—	—	—	—
	в биоактиваторах	0,1	1,8	—	—	—	—
	в продуктах метаболизма	0,15	2,7	11,0	—	—	—
	В дрожжах	0,78	14,5		2215	18,3	24
	в том числе: в размножившихся	0,68	12,6	48,5	—	—	—
	В CO <sub>2</sub>	0,57	10,5	40,5	7035 <sup>2</sup>	58,3	76
	Сумма	5,40	100		1:350	94,0	100

<sup>1</sup> усвоенный углерод подсчитан по формуле: углерод первоначальной уксусной кислоты — углерод остаточной уксусной кислоты.

<sup>2</sup> представляет сумму газообразного и растворимого C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>

Полученные результаты показывают следующее:

а) при аэробной ассимиляции немеченой уксусной кислоты углерод распределяется так—48,5 % в размножившихся клетках дрожжей, 40,5 % в выделенном  $\text{CO}_2$  и до 11 % накапливается в среде, в виде промежуточных продуктов метаболизма; эти данные опровергают результаты Виндлера, указывающие окисление  $2/3$  уксусной кислоты до  $\text{CO}_2$  (<sup>12</sup>) и значительно отклоняются от уравнения, предложенного Ван-Нилем и Коэном (<sup>13</sup>), в котором каждый из двух атомов углерода распределяется по-одному в  $\text{CO}_2$  и в биомассе;

б) при аэробной ассимиляции меченой уксусной кислоты наблюдается совершенно иная картина.

Усвоенный  $\text{C}^{14}$  распределяется: в дрожжах только 24 %, а в  $\text{CO}_2$  выделяется 76 %.

Кажущееся противоречие результатов в двух случаях можно истолковать на основе некоторых известных фактов о разнозначности каждого из атомов углерода уксусной кислоты в образовании биомассы и  $\text{CO}_2$ .

Полученные нами результаты доказывают, что при аэробной ассимиляции радиоактивного углерода  $\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{OON}$  суммарная картина сводится к следующему: из каждых 4 атомов  $\text{C}^{14}$  при распаде субстрата 3 атома выделяются в виде  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  и только 1 атом включается в реакции по биосинтезу.

Сопоставление результатов параллельных опытов с  $\text{CH}_3\text{COON}$  и  $\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{OON}$  приводит нас к заключению, что метильная группа уксусной кислоты участвует преимущественно в реакциях по синтезу клеточной массы и частично только в образовании  $\text{CO}_2$ . Наши данные, полученные с новым видом дрожжевого организма из рода *Candida* и по другой методике, дополняют результаты Эренсверда и др. (<sup>6</sup>) с *Torulopsis utilis*. Эти исследователи путем применения дважды меченой уксусной кислоты ( $\text{C}^{13}\text{H}_3\text{C}^{14}\text{OON}$ ) с соотношением  $\frac{\text{C}^{14}}{\text{C}^{13}} = 1$  установили, что соотношение это в выделенном  $\text{CO}_2$  доходит до двух.

Вышеприведенные исследования приводят нас к следующим выводам.

1. Исследуемый дрожжевой организм из рода *Candida* обладает высоким коэффициентом усвоения уксусной кислоты, который достигает до 96 % заданного количества.

2. В условиях аэробноза исследуемый организм синтезирует в среднем 43,4 % клеточной биомассы (в абсолютно-сухом веществе) и выделяет 60 %  $\text{CO}_2$  от усвоенной уксусной кислоты. При этом потребляются 2,2 грамм-атома кислорода на каждую молекулу уксусной кислоты.

3. При аэробном размножении дрожжей *Candida* суммарное распределение углерода субстрата происходит следующим образом: 48,5 % в синтезированной биомассе в выделенном  $\text{CO}_2$ , а 11 % остается в среде.

Опыты с меченой уксусной кислотой ( $\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{OOH}$ ) показали, что оба атома углерода уксусной кислоты не равнозначны в процессе аэробного метаболизма:  $\text{C}^{14}$  карбоксильной группы выделяется на 76 % в виде  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  и только 24 % его накапливается в биомассе и в промежуточных метаболитах.

При этом наибольшая доля углерода метильной группы идет по пути биосинтеза клеточной массы.

Институт животноводства и ветеринарии  
МСХ Армянской ССР

Մ. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ,  
Ա. Ս. ՕՅԱՆՋԱՆՅԱՆ ԵՎ Ե. Ա. ԱՎԱԳՅԱՆ

**Շաքարասնկային օրգանիզմների կողմից քացախաթթվի օքսիդատիվ քայքայման և աերոբ ասիմիլյացիայի մի քանի հատկությունների մասին**

Վերջին ժամանակներս մեծ ուշադրություն է դարձված քացախաթթվի օքսիդատիվ քայքայման ուղիների ուսումնասիրությանը և նրա մասնակցությունը շաքարասնկային օրգանիզմների կողմից կատարվող ամինոթթուների սինթեզի մեջ:

Համեմատարար ավելի քիչ ուշադրություն է դարձված շաքարասնկերի բաղադրամասն օրինաչափությունների վրա, քացախաթթվի աերոբ ասիմիլյացիայի պայմաններում, երբ վերջինս ածխածնի միակ աղբյուրն է:

Ոչ բավարար են ուսումնասիրված հետևյալ փոխհարաբերությունները  $\frac{\text{մաքսիմալ յուրացված } \text{CH}_3\text{COOH}}{\text{ված } \text{CH}_3\text{COOH}}$  (յուրացման գործակից),  $\frac{\text{սինթեզված բիոմասսա}}{\text{յուրացված } \text{CH}_3\text{COOH}}$ ,  $\frac{\text{սպտազործված } \text{O}_2}{\text{ված } \text{CH}_3\text{COOH}}$ ,  $\frac{\text{անջատված } \text{CO}_2}{\text{յուրացված } \text{CH}_3\text{COOH}}$  և  $\frac{\text{բիոմասսայի ածխածին} + \text{CO}_2 \text{ ածխածին}}{\text{սուբստրատի ածխածին}}$ :

Այս քանակական հարաբերությունները տեսական և սյրակտիկ հետաքրքրություն են ներկայացնում:

Ներկա աշխատանքը վերաբերվում է վերոհիշյալ քանակական փոխհարաբերությունների ուսումնասիրությանը քացախաթթվի աերոբ մետաբոլիզմի պայմաններում, երբ միջավայրում չկա ածխածնի ուրիշ աղբյուր:

Բացի դրանից հետազոտվել է նաև ռադիոակտիվ իզոտոպային քացախաթթվի ածխածնի ( $\text{C}^{14}$ ) մասնակցությունը  $\text{CO}_2$ -ի և ըջջային մասսայի առաջացման մեջ:

Հետազոտությունների մեթոդիկական և էքսպերիմենտալ մասը նկարագրված են սերատում:

Ստացված արդյունքները հանգեցնում են հետևյալ եզրակացություններին.

1. Հետազոտվող շաքարասնկային օրգանիզմը, որը պատկանում է *Candida* ցեղին, ունի քացախաթթվի յուրացման բարձր գործակից, մինչև 96 տոկոսի:

2. Աերոբիոզի պայմաններում հետազոտվող օրգանիզմը յուրացված քացախաթթվից սինթեզում է միջին հաշվով 43,4 տոկոս ըջջային բիոմասսա (բացարձակ չոր քաշով) և անջատում է 60 տոկոս  $\text{CO}_2$ : Այս դեպքում քացախաթթվի ամեն մի մոլեկուլի օքսիդացման համար օդազործվում է 2,2 գրամ-ատոմ թթվածին:

3. *Candida* ցեղի շաքարասնկերի աերոբ բաղադրամասն պայմաններում սուբստրատի ածխածնի գումարային տեղարաշխումը կատարվում է հետևյալ կերպ. 48,5 տոկոսը անցնում է սինթեզված բիոմասսայի մեջ, 40,5 տոկոսը՝ անջատված  $\text{CO}_2$ -ի մեջ, իսկ 11 տոկոսը մնում է միջավայրի մեջ:

4. Իզոտոպային քացախաթթվով ( $\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{OOH}$ ) փորձերը ցույց տվեցին, որ աերոբ մետաբոլիզմի ղեկավարում ածխածնի հրկու ատոմները համարժեք չեն՝ կարրո-

Բսիլ խմբից  $C^{14}$ -ի 76 տոկոսն անջատվում է որպես  $C^{14}O_2$  և միայն 24 տոկոսը կուտակվում է բիոմասայի և միջավայրի մետաբոլիտների մեջ:

Այս դեպքում մեթիլ խմբի ածխածնի մեծ մասը դնում է բջջային նյութի բիոսինթեզի ուղղությամբ:

#### ЛИТЕРАТУРА — ԴՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> Г. Виланд и А. Зондергоф, *Ann.* 499, 213, 1932. <sup>2</sup> А. Виртанен и Сундман, *Biochem. Z.* 313, 236, 1942. <sup>3</sup> С. Вейнгауз и Р. Миллингтон, *J. Amer. Chem. Soc.* 69, 3089, 1947. <sup>4</sup> Ч. Гильварг и К. Блок, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 5791, 1950; *J. Biol. Chem.* 193, 339, 1951. <sup>5</sup> Ч. Ванг, Р. Лаббэ, В. Кристенсен и В. Шельделин, *J. Biol. Chem.* 197, 645, 1952. <sup>6</sup> Дж. Баддлей, Г. Эренсверд и др. *J. Biol. Chem.* 183, 771, 1951. <sup>7</sup> И. Веселов, В. Левачева, Э. Фролова, Сессия АН СССР по мирному использованию атомной энергии (1–5 VII, 1955 г.), отдел биол. наук, стр. 271, 1955. <sup>8</sup> М. Тер-Карапетян, Известия АН Арм.ССР (серия биологическая) 8, 33, 1955. <sup>9</sup> Г. Финк и И. Кребс, *Biochem. Z.* 300, 59, 1938. <sup>10</sup> М. Тер-Карапетян, М. Малатян, ДАН Арм. ССР, 23, (1), 29, 1956. <sup>11</sup> И. А. Власюк, Труды научн. сессии Инст. биол. физ. АН СССР, стр. 28, 1955. <sup>12</sup> Р. Винцлер, *Cell. and Comp. Physiol.* 15, 343, 1940. по *Biol. Abstracts* 15, 294, 1941. <sup>13</sup> К. Ван Ниль и А. Коэн, *J. of Cell. and Comp. Physiol.* 20, 95, 1942, по *Ann. Rev. Biochem.* 15, 452, 1946.