

БИОХИМИЯ

М. А. Тер-Карапетян, академик АН Армянской ССР, и Е. Н. Макарова

Культуральные особенности влияния биотина и источника азота на накопление  $\gamma$ -аминомасляной кислоты у дрожжей

(Представлено 4/VII 1964)

$\gamma$ -Аминомасляная кислота (ГАМК) обнаружена в дрожжевых организмах относительно недавно (<sup>1-4</sup>). Установлено, что ГАМК входит в состав растворимого в воде, 80% этиловом спирте или же 4% трихлоруксусной кислоте запасного фонда аминокислот.

В других детальных исследованиях по изучению запасного фонда аминокислот в зависимости от видовых и культуральных особенностей дрожжей нет сведений о наличии этого важного метаболита (<sup>5</sup>).

Вопросу изучения обмена ГАМК у дрожжевых организмов уделено мало внимания. Выдвинута гипотеза, что в пекарских дрожжах количество ГАМК увеличивается в условиях анаэробнозиса (<sup>3</sup>). Однако это предположение было в дальнейшем опровергнуто (<sup>6</sup>). Установлено, что у *Candida tropicalis* штамм КЗ—10 при усвоении *d*-ксилозы в качестве единственного источника углерода ГАМК накапливается больше в запасном фонде аминокислот, чем при усвоении *d*-глюкозы (<sup>4</sup>), но механизм этого явления еще не изучен. Подробными исследованиями показано, что для двух культур дрожжей—*Candida utilis* (штамм IMI 23311), *Saccharomyces cerevisiae* (*Dist. Comp. Ltd*)—ГАМК является плохим источником углерода, но хорошим источником азота, усваиваемым через реакции переаминирования посредством адаптивного фермента (<sup>6</sup>).

За последние годы на примере ряда представителей рода *Candida* в нашей лаборатории установлены новые факты, показывающие тесную зависимость состава свободных аминокислот дрожжевых клеток как от природы организма, так и от источников азотного питания (<sup>7-9</sup>).

Настоящая работа посвящена изучению некоторых особенностей влияния биотина на накопление свободной ГАМК у представителей рода *Candida* при выращивании в присутствии различных источников азота (аммиак и аспарагин).

Объектом исследования служили три штамма из рода *Candida*, у которых особенно наглядно выражено влияние источников азота или биотина на процессы накопления ГАМК, а именно—*C. guilliermondii* № 71, *C. pulcherrima* № 95, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР и *C. tropicalis* штамм КЗ—10 из коллекции лаборатории биохимии Арм. НИИЖиВ<sup>(8)</sup>.

Культуральная основная среда (о. с.) имела следующий состав на 1 литр водопроводной воды: глюкоза—10 г,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —3,1 г или аспарагин 3,2 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —1,23 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ —0,625 г,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ —0,125 г,  $\text{NaCl}$ —0,125 г.

О. с. использовалась с добавлением и без добавления биотина в дозе 8 мкг на один литр среды. Методы очищения ингредиентов среды, приготовления и стерилизации сред были описаны в нашей предыдущей работе<sup>(8)</sup>.

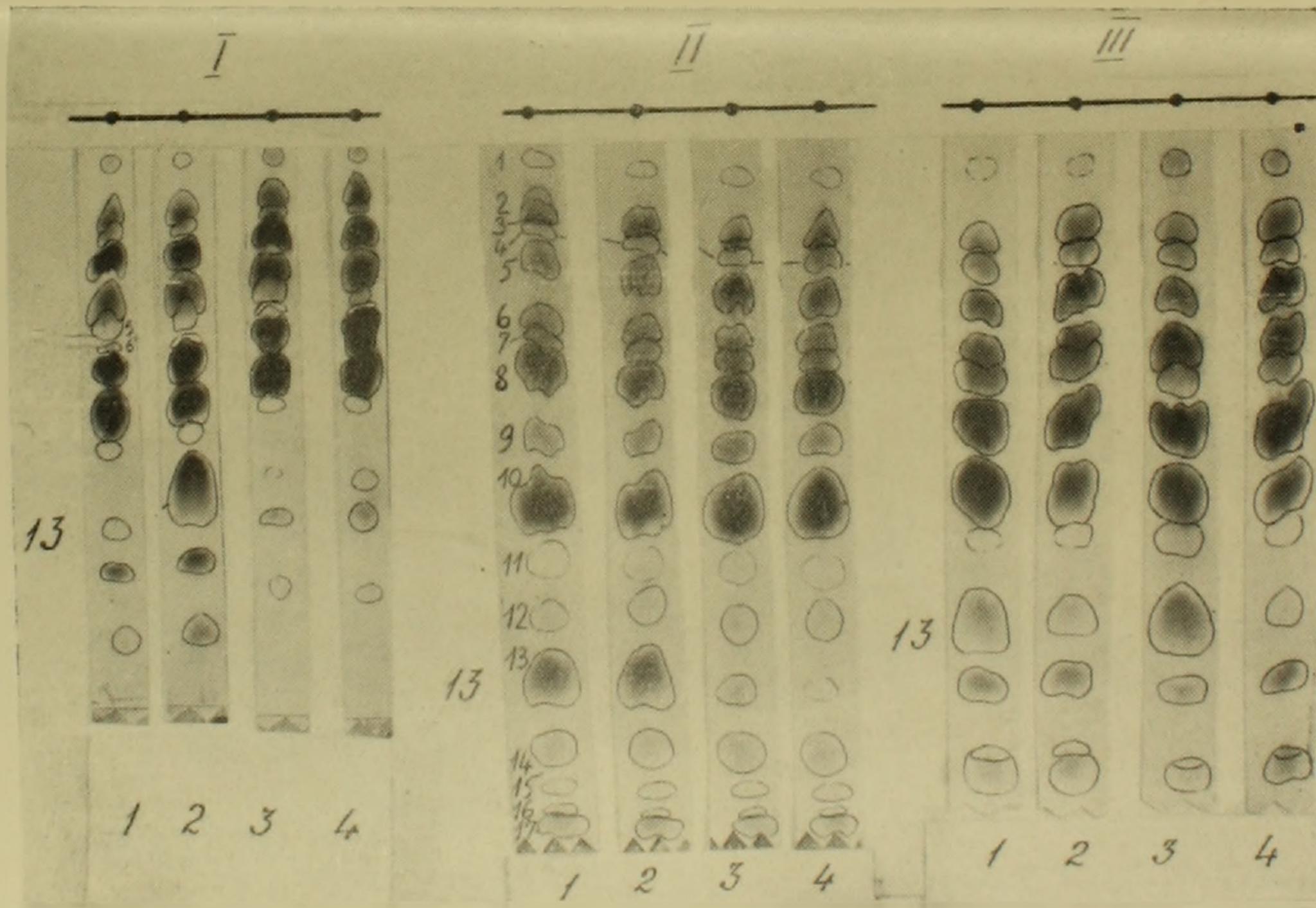
Для подготовки посевного материала музейная культура выращивалась в о. с. до истощения глюкозы, затем она подвергалась голоданию в дистиллированной воде в течение 24 часов. Голодающая культура вносились в виде водной суспензии в расчете 5—8 мг (сухого вещества) на 100 мл культуральной среды, помещенной в 750-миллилитровые конические колбы на каждый вариант. Инкубация колб производилась при оптимальной для каждой культуры температуре на круговой качалке (200 об/мин.), что обеспечивало обильное аэрирование растущей культуры. Инкубация продолжалась до расходования 85—90% исходной глюкозы в вариантах с витаминами, что требовало 16—24 час.; в этот момент в вариантах без витаминов расход глюкозы не превышал 10% от исходного количества. Полученная биомасса после тщательного промывания холодной дистиллированной водой высушивалась при 85°C, затем экстрагировалась 80% кипящим этанолом в течение 1 часа.

Для обнаружения состава свободных аминокислот спиртовые экстракты подвергались хроматографированию как непосредственно, так и после гидролиза в 20%  $\text{HCl}$  для расщепления пептидов. Проверка показала, что относительное количество ГАМК существенной разницы не имеет между исходным экстрактом и его гидролизатом.

В табл. 1 представлены средние данные из 6 опытов, показывающие условия выращивания, при которых изучено накопление ГАМК в биомассе у трех исследуемых культур.

На фиг. 1 представлены результаты, полученные при одной из 6—8 повторностей, проведенных с каждой культурой. Они показывают, что накопление ГАМК в фракции растворимых аминокислот находится в тесной зависимости как от источников азота, так и от биотина.

У *C. guilliermondii* и *C. pulcherrima* ГАМК накапливается, в основном, при усвоении аммиака, но почти или вовсе отсутствует в случае усвоения аспарагина в качестве единственного источника азота; у *C. tropicalis* шт. КЗ—10, ГАМК присутствует в составе растворимых аминокислот в равной степени при усвоении как аммиака, так и аспарагина.



Фиг. 1. Аминокислоты спирторастворимой фракции после гидролиза, I—*C. guilliermondii*; II—*C. pulcherrima*; III—*C. tropicalis* КЗ—10.

Варианты опытов; 1—аммиак без биотина; 2—аммиак с биотином; 3—аспарагин без биотина; 4—аспарагин с биотином. Пятно 13—гаммааминомасляная кислота.

Эти факты указывают на значительное расхождение в путях усвоения азота аммиака и аспарагина исследуемыми культурами.

Для синтеза ГАМК путь прямого аминирования оказывается более эффективным у первых двух культур, чем у *C. tropicalis* шт. КЗ-10.

Таблица 1

Влияние аммиака и аспарагина на расщепление глюкозы, синтез биомассы и экономический коэффициент синтеза биомассы

Культуры	Расщепленная глюкоза, мг		Синтез биомассы, мг		Биомасса / глюкоза, %	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Аспарагин	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Аспарагин	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Аспарагин
<i>C. guilliermondii</i> О. С.	71	95	28	25	21	22
О. С. + биотин	802	862	329	330	41	41
<i>C. pulcherrima</i> О. С.	57	464	17	177	31	34
О. С. + биотин	891	843	313	313	37	37
<i>C. tropicalis</i> КЗ-10 О. С.	34	129	6	26	18	20
О. С. + биотин	917	900	293	333	32	37

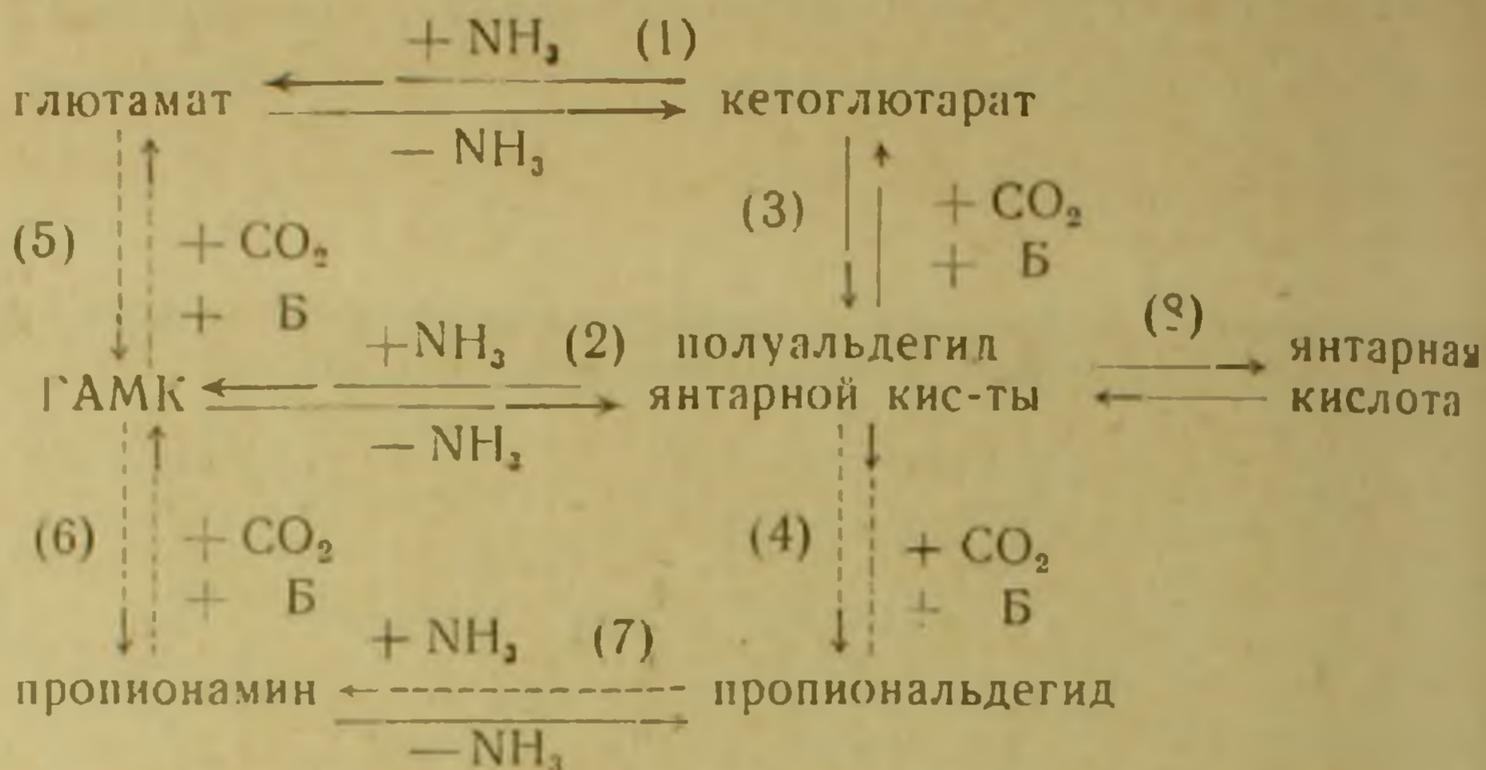
Другие, не менее важные, особенности обнаружены у различных культур по влиянию биотина на накопление ГАМК. У *C. guilliermondii* происходит резкое повышение количества ГАМК в спирторастворимой фракции в присутствии биотина, в то время как у *C. tropicalis* ГАМК накапливается, в основном, в отсутствие этого витамина. Это указывает на то, что у двух исследуемых культур биотин или действует на различные звенья путей метаболизма ГАМК, или противоположно влияет на направленность обратимых реакций синтеза и распада ГАМК.

У *C. pulcherrima*, у которой потребность в биотине значительно меньше выражена, чем у двух предыдущих культур (8-9), накопление ГАМК происходит почти в равной степени, независимо от присутствия биотина. Здесь можно предполагать, что биотин или не контролирует пути синтеза и распада ГАМК, или же запасы биотина клетки достаточны для нормального накопления ГАМК.

Вышеприведенные примеры показывают, что у отдельных представителей рода *Candida* (принадлежащих в данном случае разным видам) имеются определенные расхождения в путях, ведущих к накоплению ГАМК.

В качестве одной из возможных рабочих гипотез для дальнейших исследований выдвигается нижеследующая схема, где ГАМК рассматривается как истинный промежуточный метаболит, уровень которого в за-

пасном фонде аминокислот определяется реакциями его синтеза и распада с учетом роли биотина в процессах фиксации углекислого газа.



Здесь надо признать, что у отдельных культур преобладают те или иные пути. Так, например, снижение количества ГАМК в присутствии биотина у *S. tropicalis* шт. КЗ--10 можно объяснить стимулированием реакции (3), которая ведет к синтезу кетоглутаровой кислоты из полуальдегида янтарной кислоты, а затем глутамата или же прямой фиксацией углекислого газа на ГАМК (реакция 5), ведущей также к образованию глутамата; повышение количества ГАМК в присутствии биотина у *S. guilliermondii* можно объяснить усилением синтеза полуальдегида янтарной кислоты (примерно путем реакции 8 или 4) и дальнейшим аминированием последнего. Другим путем повышения количества ГАМК может быть усиление реакции 6 и т. д.

Особенности интенсификации или торможения реакции аминирования и переаминирования указывают на другие возможные пути регуляции уровня ГАМК в дрожжевых клетках (реакции 1, 2, 7).

Все вышеизложенное говорит о важнейшем значении проведения сравнительных биохимических исследований для выявления особенностей механизма действия различных источников азота и витаминов у отдельных представителей родов и видов микроорганизмов, что приведет к новым представлениям об их межвидовых и внутривидовых отношениях.

Армянский научно-исследовательский институт животноводства и ветеринарии Министерства сельского хозяйства Армянской ССР.

Институт микробиологии Академии наук Армянской ССР

**Բիոսինի և ազոտի ազրյուրների ազդեցությունը  $\gamma$ -ամինոկարապթիկ կուսակման վրա՝ կապված խոնորասնկերի կուլտուրայի սուսանճահասկությունների հետ**

*Candida* սեզի բազիլաթիվ ներկայացուցիչների օրինակի վրա մեր կողմից նախապես չստատովել է, որ խոնորասնկային բջիջների տգատ ամինոթթուների կազմը կախված է ինչպես օրգանիզմի բնույթից, այնպես էլ ազոտային սնուցման ազրյուրներից:

Ներկա աշխատանքը նվիրված է *Candida* սեզի մի քանի ներկայացուցիչների մոտ ազատ  $\gamma$ -ամինոկարապթիկ կուտակման վրա բիոտինի ազդեցության առանձնահատկություններին՝ ազոտի տարրեր ազրյուրների (ամոնիակ և ասպարազին) սուկայության սլայմաններում:

Կատարված հետազոտությունները բերել են հետևյալ հիմնական եզրակացություններին՝

1.  $\gamma$ -ամինոկարապթիկ կուտակումն ազատ ամինոթթուների ֆրակցիայում կախված է ինչպես ազոտի ազրյուրներից, այնպես էլ բիոտինի ներկայությունից:

2. *C. guilliermondii*-ի և *C. pulcherrima*-ի մոտ  $\gamma$ -ամինոկարապթու կուտակվում է հիմնականում ամոնիակի յուրացման ղեպքում և համարյա բացակայում է, երբ որպես ազոտի միակ ազրյուր է ծառայում ասպարազինը:

3. *C. guilliermondii*-ի մոտ բիոտինի ներկայությամբ տեղի է ունենում  $\gamma$ -ամինոկարապթիկ քանակի խիստ բարձրացում՝ սպիրտալուծելի ֆրակցիայում, այն ժամանակ, երբ *C. tropicalis* K3—10-ի մոտ  $\gamma$ -ամինոկարապթու կուտակվում է հիմնականում այդ վիտամինի բացակայության ղեպքում: *C. pulcherrima*-ի մոտ  $\gamma$ -ամինոկարապթիկ կուտակումը տեղի է ունենում անկախ վիտամինի ներկայությունից, միայն ամոնիակի յուրացման ղեպքում:

4. Կարապթիկ սինթեզը և ճեղքումը ներկայացնող հիպոթետիկ սխեման ցույց է տալիս, որ տարրեր կուլտուրաների մոտ կարող է ղեկավարել ճեղքման և սինթեզի այս կամ այն ուղին:

**ЛИТЕРАТУРА — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն**

<sup>1</sup> А. Шейльс, В. Мумс, С. Шейльс, *Feder. Proc.*, 5, 152, 1946. <sup>2</sup> Л. Лундгал, Е. Сандегрен, *Acta chem. Scand.* 4, 1150, 1950. <sup>3</sup> Л. Рид, *J. Biol. chem.* 183, 451, 1950. <sup>4</sup> М. А. Тер-Карапетян, *ДАН СССР* 122, (5), 870 (1958) <sup>5</sup> Г. Хальворсон, В. Фрай, Д. Швемин, *J. Gen. Physiol.* 38, (4), 549, 1955. <sup>6</sup> Р. Пиетрушко, Л. Фауден, *Annals Bot.* 25, (100), 491, 1961. <sup>7</sup> М. А. Тер-Карапетян, Е. Н. Макарова, С. О. Инджикян, Тезисы докл. XLII Научн. сессии Ерев. госунта, 66, 1962. <sup>8</sup> М. А. Тер-Карапетян, Е. Н. Макарова, „Изв. АН Арм. ССР“ (биол. науки) 17, 1, 27, (1964). <sup>9</sup> М. А. Тер-Карапетян, Тезисы I-го Всесоюзного биохимического съезда (г. Ленинград), вып. 11, 195, 1964.