

УДК 577.1 : 576.8.097

Академик АН Армянской ССР М. А. Тер-Карапетян, С. М. Инджикян

Адаптация *Candida chevalieri* к валину

(Представлено 25/VII 1968)

Способность дрожжевых организмов адаптироваться к новым источникам углерода в результате индуцированного синтеза карбогидраз была хорошо изучена за последние годы (¹).

Реже встречаются в литературе данные по адаптации дрожжевых организмов к новым источникам азота. К таковым относятся усвоение цистеина и гомоцистеина у автотрофных по метионину мутантов *Saccharomyces cerevisiae* (²), гаммааминомасляной кислоты у *Candida utilis* (³).

Адаптивный характер этих изменений устанавливался по ускорению латентного периода (лаг-фаза) в процессе размножения соответствующих организмов (^{4,5}) и, в одном случае, по постепенному усилению дыхания клеток в течение цикла роста культуры (³).

Ранее нами было показано, что среди исследуемых представителей дрожжей рода *Candida*, *C. chevalieri* (штамм №66) при разреженном посеве (менее 1 мг в 100 мл) в синтетическую среду, содержащую 1% глюкозы и валин в качестве единственного источника азота, начинает расщеплять глюкозу и размножаться не раньше 25—30 часов, в то время как в присутствии сульфата аммония к этому времени весь сахар оказывается уже израсходованным (⁶⁻⁸).

Указанное наблюдение и послужило основанием для систематического изучения возможности приспособления *C. chevalieri* к валину.

Для достижения этой цели применялись два известных приема: удлинение сроков инкубации культуры в синтетической среде, содержащей валин в качестве единственного источника азота, и пересев клеток, полученных в конце одного цикла роста (до полного израсходования сахара, что составляет около 8—10 поколений на цикл), в новую среду последовательно от 6 до 13 раз.

В настоящей работе изложены результаты двух из нескольких серий опытов, проведенных по адаптации *C. chevalieri* к DL-валину в вышеуказанных условиях инкубации.

Опыты проводились в синтетической среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу, а источника азота—сульфат аммония (ос-

новная среда) или DL-валина. Состав культуральной среды, способ подготовки посевного материала, постановка и условия опытов были описаны в предыдущих работах нашей лаборатории (8,9).

Опыты проведены в 50—100 мл среды, и ввиду ауксоавтотрофного характера испытуемой культуры (10), добавка витаминов группы В в среду не проводилась.

Таблица 1

Динамика расщепления глюкозы при выращивании *S. chevallieri* в присутствии DL-валина
Посев по пассажирам: 0,5—1,0 мг в 100 мл среды

Пассажи (циклы)	Варианты*	Расщепленная глюкоза за указанные сроки инкубации											
		Опыт I Начало 18/XII 1961						Опыт III Начало 10/XII 1962					
		0	15	24	42	48	70	0	15	24	40	46	64
I	Инкубация (час)	0	15	24	42	48	70	0	15	24	40	46	64
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$	457	50	430				540	110	446			
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Вал}_1$	457	0	0	32	65	393	540	0	0	33	82	457
II	Инкубация (час)	0	14	21	36	44	60	0	15	26	33	47	56
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$	470	45	279	460			485	75	480			
	$\text{Вал}_1 \rightarrow \text{Вал}_2$	470	0	27	62	124	462	485	0	0	50	182	442
III	Инкубация (час)	0	15	24	41	48	—	0	15	26	42	49	—
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$	507	55	434				505	115	472			
	$\text{Вал}_2 \rightarrow \text{Вал}_3$	507	0	27	188	481		505	0	52	222	437	
IV	Инкубация (час)	Культура выращивалась в течение 48 часов до полного израсходования глюкозы. Прделан посев для следующего пассажа						0	16	26	43	—	—
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$							485	67	421			
	$\text{Вал}_3 \rightarrow \text{Вал}_4$							485	12	85	437		
V	Инкубация (час)	0	14	20	24	36	—	0	18	24	39	—	—
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$	507	45	255	492			485	272	477			
	$\text{Вал}_4 \rightarrow \text{Вал}_5$	507	0	27	107	477		485	27	82	465		
VI	Инкубация (час)	0	15	20	34	—	—	0	24	28	33	—	—
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Вал}^{**}$	495	0	0	35	—	—	510	386	503			
	$\text{Вал}_5 \rightarrow \text{Вал}_6$	495	5	25	458			510	152	292	453		
VII	Инкубация (час)							0	24	26	29	31	—
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$							485	441	478			
	$\text{Вал}_6 \rightarrow \text{Вал}_7$							485	203	—	345	441	
VIII	Инкубация (час)							0	14	26	32	—	—
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$							520	22	509			
	$\text{Вал}_7 \rightarrow \text{Вал}_8$							520	10	189	439		

* Индексы, поставленные с символом Вал, обозначают очередность пассажей.

** $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Вал}$ вариант проведен для проверки свойства музейной культуры.

Адаптация культуры к валину оценивалась по интенсивности расщепления глюкозы в жидкой среде, общему количеству и экономическому коэффициенту синтеза биомассы $\left(\frac{\text{синтезированная биомасса}}{\text{расщепленная глюкоза}} \times 100 \right)$, а также по росту на агаровой синтетической среде, содержащей глюкозу и DL-валин.

1. *Расщепление глюкозы в присутствии валина.* Результаты двух серий опытов приведены в табл. 1.

Полученные данные показывают, что в условиях наших опытов, в течение первого пассажа в среде с валином исходная музейная культура после прохождения длительной лаг-фазы (около 30 часов), постепенно начинает расщеплять глюкозу.

При последовательных пересевах культуры из среды с законченным циклом роста в новую среду с валином, наблюдается постепенное сокра-

Таблица 2

Динамика расщепления глюкозы и синтеза биомассы музейной и адаптированной культурами *S. chevalieri*
Посев по пассажам: 6—10 мг в 100 мл среды

№ и дата пассажей	Продолжительность инкубации, час	Посев с музейной культуры			Посев с адаптированной культуры из указанного пассажа		
		Расщепленная глюкоза, мг	Синтезированная биомасса, мг	Экономический коэффициент, %	Расщепленная глюкоза, мг	Синтезированная биомасса, мг	Экономический коэффициент, %
IX (13/I 1963)	13	—	—	—	Посев из VIII пассажа		
	17	135	54	40	150	65	43
	22	190	91	48	250	115	46
	26	330	146	44	1000	316	32
	37	998	326	33	—	—	—
XII (31/I 1963)	10	25	11	44	Посев из XI пассажа		
	12	35	16	46	80	32	42
	26	255	115	45	135	48	36
	37	746	348	47	900	371	41
	41	905	373	41	—	—	—
XIII (12/II 1963)	10	25	8	32	Посев из XII пассажа		
	12	35	12,5	35	70	24,5	35
	27	245	112	46	125	44	35
	41	926	383	41	929	364	39

шение лаг-фазы и ускорение темпов расщепления глюкозы. После завершения процесса адаптации, что в условиях наших опытов происходит между 6 и 8 пассажами, продолжительность лаг-фазы культуры и скорость расщепления глюкозы достигают величин, близких к наблюдаемым в среде с сульфатом аммония.

Во всех пассажах, являющихся этапами приспособления исследуемой культуры, были изучены также темпы роста биомассы, о чем будет доложено ниже.

2. *Свойства адаптированной к валину культуры C. chevalieri.* Свойства адаптированной культуры синтезировать биомассу и темпы ее роста оценивались путем культивирования посевного материала, полученного в конце VIII, IX, X, XI и XII пассажей в жидкой среде с валином. В качестве контроля в такой же среде выращивалась музейная (неадаптированная) культура. Показатели обеих культур иллюстрируют коррелятивную связь между динамикой расщепления глюкозы и накоплением биомассы в трех циклах из указанной серии опытов. Темпы расщепления глюкозы и накопления биомассы фактически совпадают как у музейных, так и у адаптированных к валину культур из IX, XII и XIII пассажей.

При последовательных пассажах в синтетической среде с валином адаптированная культура полностью сохраняет свойство синтезировать биомассу с высоким экономическим коэффициентом.

Хранение культуры, адаптированной в 1963 году, на синтетической среде с агаром, содержащей валин, не вызвало никакого угнетения темпов роста как на этой же твердой среде, так и при периодических пересевах в жидкой среде. Адаптированная культура (опыт от 12/II 1963), в отличие от музейной, обильно растет на синтетической агаровой среде с валином в первые два дня после посева. Такой же рост у музейной культуры обычно наблюдается на сусло-агаре.

Одним из признаков, доказывающих наличие адаптации к валину, является темп роста культуры, оцениваемый по времени удвоения биомассы. Последняя рассчитывалась с помощью формулы, подобной той, которая применяется для определения времени деления клеток:

$$G_M = \frac{\log 2}{\log P_2 - \log P_1} \times t,$$

где t —интервал времени, P_1 —начальная биомасса и P_2 —биомасса в конце данного интервала.

Как показывают данные, приведенные в табл. 3, музейная и адаптированная культуры, внесенные в среду с DL-валином, сильно отличаются по темпам роста в первые 8—10 часов от начала инкубации, после чего время удвоения музейной культуры (I пассаж) постепенно приближается к времени удвоения адаптированной культуры.

Последние данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что свойство усваивать валин как единственный источник азота приобретается путем индукции в присутствии специфического субстрата. Образование биомассы в среде с валином за счет мутантов, могущих существовать в исходной культуре, фактически исключается, так как даже при допущении частоты мутации такого высокого порядка, как 10^{-3} — 10^{-5} , мутантные клетки не были бы в состоянии обеспечить накопление полученных количеств биомассы за данный период инкубации.

Это предположение, основанное на косвенных фактах, подтвердилось при разреженном посеве музейной культуры на синтетическую сре-

ду с агаром, содержащим в качестве единственного источника азота или сульфат аммония или DL-валин*. В обоих вариантах (в 15 повторностях, каждый) выросло фактически одинаковое число колоний ($20 \pm 1,50 \pm 2$), в присутствии аммония на второй, а в присутствии валина на 3—4 день

Таблица 3

Динамика синтеза биомассы музейной и адаптированной к валину культуры *S. chevalieri*

№№ и дата пассажей	Продолжительность инкубации, час	Посев с музейной культуры (I пассаж)		Посев с адаптированной культуры	
		Биомасса	G _m -биомассы	Биомасса	G _m -биомассы
X (19/I 1963)	0	7,7	—	7,1	—
	6	10,1	15,3	12,9	6,9
	10	14,8	8,3	32,7	3,0
	24	163,8	4,0	464,6	3,6
XI (25/I 1963)	0	9,0	—	9,2	—
	8	13,2	14,5	32,2	4,4
	10	14,8	12,0	49,1	3,3
	12	20,1	4,5	85,8	2,5
	24	89,8	5,5	401,2	5,4
XII (31/I 1963)	0	10,8	—	9,0	—
	7	18,0	9,4	20,6	5,8
	10	21,8	11,0	41,6	3,0
	12	26,8	6,6	56,8	4,4
	26	125,8	6,2	380,0	5,1
XIII (12/II 1963)	0	6,3	—	5,8	—
	8	11,8	8,8	22,2	4,1
	10	14,2	7,5	30,1	4,5
	12	18,5	5,2	49,8	2,8
	27	118,8	5,6	370,0	5,2

после посева. Это позволяет допустить, что колонии на валин-агаре образовались путем адаптации подавляющего большинства (фактически всех) клеток музейной культуры.

Совокупность вышеприведенных фактов указывает на индуктивный характер приспособления культуры *S. chevalieri* к усвоению валина в качестве единственного источника азота.

Была испытана также возможность обратимости свойства усвоения валина, приобретенного в процессе инкубирования музейной культуры в присутствии данной аминокислоты, действующей как специфический субстрат, путем последовательного пересева адаптированной культуры в среду, содержащую сульфат аммония в качестве единственного источника азота (основная среда). Было проведено 6 пассажей, что соответствовало приблизительно 80—100 поколениям клеток.

* Опыты проведены при участии Ю. Г. Попова.

Для сравнения были поставлены 3 параллельные варианта, посевной материал которых был выращен в тех же условиях: посев музейной культуры в средах с аммонием и с валином и адаптированной—в среду с аммонием.

Данные одного из опытов, сведенные в табл. 4, показывают, что свойство расти в среде с валином необратимо при возвращении культуры в исходные условия азотного питания.

Таблица 4

Динамика расщепления глюкозы и синтеза биомассы адаптированной культурой после 6 пассажей в среду с аммонием (опыт от 15/V 1968 г.)

Посевной материал: 0,5 мг в 100 мл среды; исходная глюкоза—11130

В а р и а н т ы	Время инкубации, час	Расщепленная глюкоза, мг	Синтезированная биомасса, мг
Среда с NH_4^+ —Музейная культура	16	255	95
	20	703	253
	24	1102	391
Среда с валином —Музейная культура	30	30	13,2
	34	50	19,0
	45	260	89,7
	52	610	222,0
	68	1102	348,0
—Адаптированная культура	18	10	4,5
	22	35	11,6
	26	50	15,8
	30	190	41,0
	34	524	124,0
	40	1110	324,0
—Адаптированная культура после пассажей на аммоний	18	30	11,0
	22	55	24,5
	26	190	68,0
	30	540	132,0
	34	930	285,0

Наблюдаемые явления можно истолковать как пример длительной модификации, наступающей в присутствии валина, действующего как специфический субстрат. Подобный пример длительной модификации, но касающийся моносахаридов, приведен также по отношению *Saccharomyces cerevisiae* адаптированной к D-галактозе и *Aerobacter aerogenes* адаптированной к L-арабинозе (5). В описанном нами примере, изменение не устраняется после 6 пассажей в исходную среду с аммонием.

Тем не менее пассажи на исходную среду продолжаются в нашей лаборатории с целью определения стойкости вышеописанной модификации.

Ереванский государственный университет
Институт микробиологии Академии наук Армянской ССР

Candida chevalieri-ի ադապտացիան վալինի նկատմամբ

Ուսումնասիրվել է վալինի նկատմամբ *C. chevalieri*-ի հարմարողականության գինամիկան որպես ածխածնի աղբյուր գլյուկոզ և ազոտի միակ աղբյուր վալին պարունակող սինթետիկ միջավայրում:

Վալինի յուրացման ձևեր բերված հատկությունը արտահայտվում է նրա առկայության գլյուկոզի ճեղքման և կուլտուրայի աճման գինամիկայի արագացումով. լազ-ֆազը աստիճանաբար կրճատվում է տվյալ ամինաթթուն պարունակող միջավայրում կուլտուրայի հաջորդական անցումների (պասսաժ) ընթացքում: Ադապտացիան համարվում է ավարտված 6—8 անցումների միջև, երբ գլյուկոզի ճեղքման և կուլտուրայի աճման լազ-ֆազի տևողությունը հասնում է մի մեծության, որը մոտ է ամոնիում սուլֆատ պարունակող միջավայրում ստացված արդյունքներին:

Ցույց է տրված հարաբերակցական կապ գլյուկոզի ճեղքման և բջումասայի կուտակման գինամիկաների միջև:

Վալին պարունակող սինթետիկ միջավայրում հաջորդական անցումների ընթացքում ադապտված կուլտուրան լիովին պահպանում է բարձր տեսեսական զսրձակցով բիոմասսա սինթեզներու իր հատկությունը:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս առաջադրելու հիպոթեզ այն մասին, որ վալինը որպես ազոտի միակ աղբյուր յուրացնելու հատկությունը ձևեր է բերվում ինդուկցիայի միջոցով սպեցիֆիկ սուբստրատի առկայությամբ: Վալին պարունակող միջավայրում բիոմասսայի առաջացումը ի հաշիվ մոտասնտների, որոնք կարող են զոյություն ունենալ ելակետային կուլտուրայում, փաստորեն բացատրվում է:

Կուլտուրան ազոտային սննդառության սովորական պայմանների մեջ վերադարձնելիս (ամոնիում պարունակող միջավայր) 6 հաջորդական անցումների ընթացքում, չի նկատվել վալինի միջավայրում աճելու հատկության հակադարձելություն:

Հետազոտվող երևույթները կարելի է մեկնաբանել որպես երկարատև մոդիֆիկացիայի օրինակ, որը երևան է գալիս վալինի առկայությամբ. տվյալ դեպքում վերջինս զսրձում է որպես սպեցիֆիկ սուբստրատ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ի Ս Կ Լ Ե Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ G. N. Cohen, J. Monod, Bacteriol Rev., 21, 3, 169 (1957). ² S. Pomper, J. Bact. 65, 6, 666 (1953). ³ R. Pietruszko, L. Fowden, Annals of Bot., 25, 100, 491 (1961). ⁴ C. N. Hinshelwood, The chemical kinetics of the Bacterial cell, Oxford, 1947. ⁵ A. C. R. Dean, C. N. Hinshelwood, Growth, function and regulation in bacterial cells, London, 1966. ⁶ M. A. Тер-Карапетян, Е. Н. Макарова, С. М. Инджикян. Тезисы LXII науч. сес. Ереванского Гос. Унив., 66, 1962. ⁷ С. М. Инджикян. Тезисы I Всес. Биохим. съезда, 1, 167, 1964. ⁸ М. А. Тер-Карапетян, С. М. Инджикян, С. В. Чубарян. Биол. Журн. Армении, 21, 1, 3, 1968. ⁹ М. А. Тер-Карапетян, С. М. Инджикян, ДАН Арм. ССР, т. 43, 117, (1966). ¹⁰ М. А. Тер-Карапетян, Е. Н. Макарова, «Известия АН Арм. ССР» (биол. науки), 16, 5, 15 (1963).