

УДК 577:576.8.097

Академик АН Армянской ССР М. А. Тер-Карапетян, В. Г. Джанибекова

Аминотрансферазная активность дрожжей рода *Candida*

(Представлено 8/X 1968)

В механизме обмена аминокислот важнейшую роль играют реакции переаминирования и их катализаторы—аминотрансферазы, которые мало известны у дрожжевых организмов. В настоящее время обнаружены некоторые свойства аминотрансферазных систем, катализирующих перенос NH_2 -группы ряда аминокислот на 2-оксоглутарат у пивных и пекарских дрожжей (¹), у отдельных штаммов *Candida utilis* (*Torulopsis utilis*) (²), у *Saccharomyces fragilis* (³), и у *Saccharomyces cerevisiae* (⁴). В частности показана высокая активность аминотрансферазных систем, реагирующих с такими аминокислотами-донаторами NH_2 , как аспарагиновая кислота, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, тирозин, триптофан, орнитин и др. (³), а также β -метиласпартат (⁴).

В ряде работ описано выделение из пекарских и пивных дрожжей препарата аспартат-2-оксоглутарат аминотрансферазы, строго специфичной к акцептору (⁵).

Вышеупомянутые исследования освещают лишь только роль аминотрансфераз, катализирующих обратимую реакцию переноса NH_2 -группы определенных α -аминокислот на 2-оксоглутарат, и в несколько меньшей степени на пируват. Фактически не исследованы аминотрансферазы, действующие с другими кетокислотами, такими как фенилпируват, гидроксипируват, глиоксалат, 2-оксобутират и др., которые могут служить исходным скелетом для синтеза естественных аминокислот.

В этом отношении особый интерес представляет обнаруженная у *C. utilis* довольно активная аминотрансферазная система, осуществляющая обратимую реакцию переноса NH_2 -группы между γ -аминомасляной кислотой и 2-оксоглутаратом (⁶). Последняя система принадлежит к категории ω -аминотрансфераз (⁷), о наличии которых у *C. guillietmondii membranaefaciens* была выдвинута обоснованная рядом косвенных фактов гипотеза (⁸).

По реакциям переаминирования в дрожжевых организмах нет систематических исследований, в частности, по выявлению набора аминио-

трансфераз у отдельных культур, отличающихся как по систематической принадлежности, так и по условиям жизнедеятельности; более того, нет данных, определяющих взаимную роль восстановительного аминирования, переаминирования и, возможно, других реакций в синтезе аминокислотного фонда дрожжевых клеток.

Настоящая работа преследует цель—изучить в бесклеточных препаратах семи представителей рода *Candida*, активность аминотрансферазных систем, катализирующих обратимую реакцию переноса NH_2 -группы от 18 естественных и структурных аминокислот на 2-оксоглутарат и выявить некоторые стороны специфики набора аминотрансфераз отдельных штаммов, реагирующих с аминокислотами-донаторами NH_2 , принадлежащими к алифатическим гомологическим рядам.

Методика. Исследовались бесклеточные экстракты из семи штаммов дрожжей представителей рода *Candida* *C. guilliermondii* 71, *C. guilliermondii membranaefaciens* 72, *C. utilis* 106, *C. pulcherrima* 95, *C. chevalieri* 66, *C. tropicalis* ДН-3, полученных из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР. *C. tropicalis* КЗ-10 получена из АрмНИИЖИВ.

Для получения экстрактов дрожжи выращивали в синтетической среде следующего состава: глюкоза—20 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —6,24 г, KH_2PO_4 —2,46 г, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —1,25 г, NaCl —0,25 г, $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —0,25 г, биотин—16 мкг, водопроводная вода—до 1 л при 30° , в условиях аэробноза на круговой качалке со скоростью вращения 160—200 об/мин. в течение 18—20 час., в 750 мл колбах.

Выращенные и собранные центрифугированием дрожжи, отмывали от остатков среды холодной дистиллированной водой и растирали на холоду с песком с фосфатным буфером М/10, рН—7,6, гидромодуль (буфер/Р прессованных дрожжей) 5—6. После отделения осадка при 6000 об/мин в течение 20 мин, надосадочная жидкость подвергалась анализу против 0,02 М КСl 12 час. и использовалась в качестве источника ферментного препарата, общий азот последнего определялся микрометодом Кьельдаля.

Реакционная смесь содержала 20 мкмоль нейтрализованной аминокислоты, (0,2 мл), 40 мкмоль нейтрализованной кетокислоты, (0,2 мл), фосфатный буфер М/10 рН—7,6—8, (0,2 мл), пиридоксаль фосфат—20 мкг (0,1 мл). Общий объем смеси составлял 1 мл.

В каждой серии эксперимента инкубировались три контроля, один без кетокислоты, один без аминокислоты, один только с ферментным препаратом и буфером. Срок инкубации—4 часа при 38° .

После окончания инкубации пробы кипятили в течение 3 минут для прекращения реакции. Образовавшаяся глутаминовая кислота определялась методом количественной хроматографии на бумаге.

В качестве донаторов NH_2 -группы были взяты DL формы следующих аминокислот: аспарагиновая кислота, лейцин, валин, α -аланин, изолейцин, норлейцин, норвалин, треонин, лизин, серин, гистидин, метионин, глицин, фенилаланин, тирозин, α -аминомасляная кислота, аргинин, ци-

стени. В качестве акцептора использовался нейтрализованный раствор 2-оксоглутарата.

Активность ферментного препарата оценивалась по количеству образовавшейся глутаминовой кислоты и рассчитывалась по следующей формуле:

$$Q_{\text{глу}} = \frac{g_{\text{глу}}}{N \times t} \cdot 100,$$

где $Q_{\text{глу}}$ — активность препарата, $g_{\text{глу}}$ — количество глутаминовой кислоты, синтезированной во время опыта в $\mu\text{кг}$, N — содержание азота в экстракте, поставленном на инкубацию, в мг , и t — продолжительность инкубации в часах.

Сравнительная активность разных аминотрансфераз каждой культуры оценивалась условно по отношению к активности аспартат-2-оксоглутарат аминотрансферазы, взятой за 100.

Значение $Q_{\text{глу}}$ не дает точного представления о количестве ферментов, содержащихся в отдельных культурах, так как клетки последних отличаются при гомогенизации по разрушаемости, экстрагируемости активных систем и содержанием азота в бесклеточных препаратах. Результаты оценки активности аминотрансфераз у семи штаммов из рода *Candida*, переносящих NH_2 -группу от 18 аминокислот на 2-оксоглутарат, приведены в табл. 1.

Полученные данные показывают наличие у всех исследуемых штаммов богатого набора аминотрансфераз, действующих с 2-оксоглутаратом. Однако, у одной и той же культуры найдены значительные расхождения в активности аминотрансфераз, реагирующих с разными аминокислотами.

У всех исследуемых культур наиболее активны аминотрансферазные системы, переносящие NH_2 -группу от следующих аминокислот: аспарагиновой кислоты, лейцина, валина, изолейцина, норвалина, норлейцина. Системы, реагирующие с последними двумя субстратами, а также с рядом моноаминомонокарбоновых α -аминокислот нормального ряда фактически не обнаружены у *C. guilliermondii membranaefaciens*.

Аминотрансферазные системы, реагирующие с другими аминокислотами, отличаются меньшей активностью или неравномерным проявлением ее у отдельных культур. Так, если метионин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза активна у *C. guilliermondii*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis* ДН-3, то она показывает среднюю активность у других культур. Тирозин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза наиболее активна у *C. guilliermondii*, менее активна у других культур. Метионин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза активна у *C. guilliermondii*, показывает среднюю активность у всех других культур.

Наряду с этим, все исследуемые представители бедны или даже лишены аминотрансферазных систем, переносящих NH_2 -группу глицина, серина, фенилаланина, лизина, фермента последнего обнаруживает активность только у *C. pulcherrima* и *C. tropicalis* КЗ-10. Фермента цистеина

Аминотрансферазная активность бесклеточных экстрактов из разных представителей рода *Candida*

Данные в Q-глу

Аминокислоты-донаторы NH ₂	<i>C. guilliermondii</i>		<i>C. guilliermondii membranaefaciens</i>		<i>C. tropicalis DH-3</i>		<i>C. tropicalis K 3-10</i>		<i>C. pulcherrima</i>		<i>C. chevalieri</i>		<i>C. utilis</i>	
	1	2*	1	2*	1	2*	1	2*	1	2*	1	2*	1	2*
Лей	78	79	74	74	13	150	112	115	21	175	33	33	40	44
Вал	68	68	66	60	125	14	142	116	19	149	22	24	30	34
α-Ала	27	26	6	5	25	25	20	21	38	34	22	24	33	41
Лиз	0	0	2	2	сл.	сл.	5	5	26	25	0	0	сл.	сл.
Илей	76	78,7	60	62	130	127	100	101	188	153	21	27	38	42
Гис	24	27	12	11	15	15	12	12	80	82	10	8	11	7
Мет	71	76	36	36	72	61	49	56	117	123	14	15	13	13
Асп	82	87	74	74	166	180	125	12	224	187	23	25	33	41
Арг	0	0	сл.	сл.	сл.	сл.	7	6	30	38	2	2	сл.	сл.
Тре	20	20							117	117				
Н-лей	62	71	сл.	сл.	77	73	73	75	129	133	13	12	38	32
α-АМК	44	47	сл.	сл.	10	11	13	14	61	58	10	11	32	28
Н-вал	88	68	сл.	сл.	76	64	70	75	90	86	16	15	40	40
Гли	0	0	сл.	сл.	0	0	0	0	12	9	0	0	сл.	сл.
Сер	сл.	сл.	сл.	сл.	0	0	0	0	6	5	сл.	0	2	2
Ф-ала	0	0	сл.	сл.					9	8	сл.	сл.	21	20
Цис-	53	52	сл.	сл.	0	сл.	0	0	5	4	0	0	10	12
Тир	46	46	сл.	сл.	13	13	20	21	36	39	7	5	5	8

* Среднее из трех опытов

показывает довольно высокую активность у *C. guilliermondii* и *C. utilis* и слабую у *C. pulcherrima* и *C. utilis*, ферза аргинина имеет слабую активность у *C. pulcherrima*, *C. chevalieri* и *C. tropicalis* КЗ-10, и весьма слаба или отсутствует у других культур.

Вызывает также интерес тот факт, что среди исследуемых культур *C. pulcherrima* обладает как наиболее богатым набором, так и наиболее активными или легкоэкстрагируемыми из гомогенатов аминотрансферазными системами.

Одним из наиболее примечательных фактов, установленных у исследуемых культур, является то, что аланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза показывает относительно высокую активность лишь только у *C. utilis* и *C. chevalieri* и слабую—у других культур. Таким образом, для рода *Candida* синтез глутамата за счет NH_2 -группы α -аланина не является ведущим путем усвоения азота.

Полученные результаты довольно хорошо согласуются с ранее установленными фактами медленных темпов выращивания исследуемых культур, в частности *C. guilliermondii membranaefaciens*, в среде с глюкозой, содержащей α -аланин как единственный источник азота (⁹).

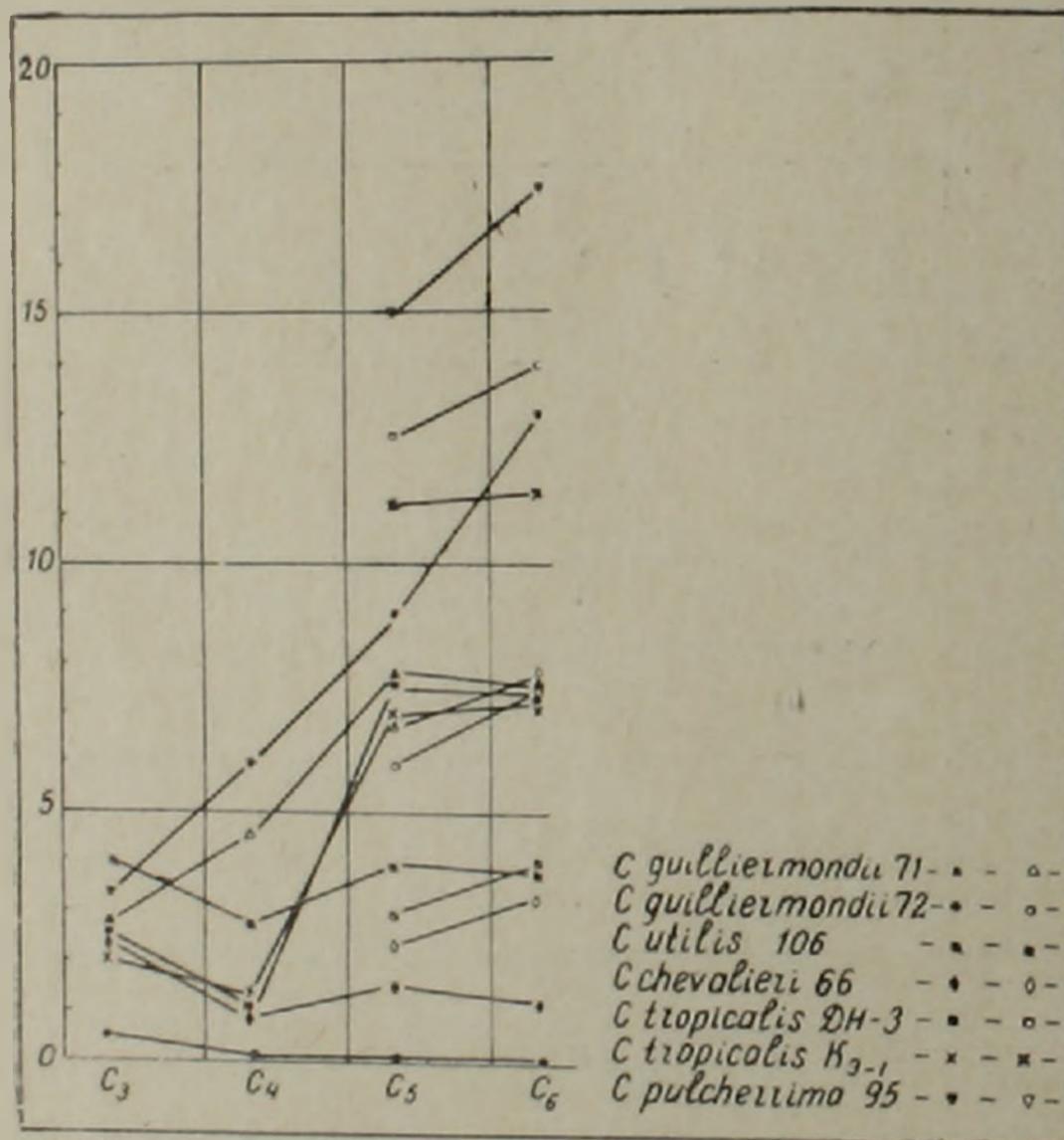


Рис. 1. Заполненные знаки относятся к аминокислотам с нормальным скелетом; незаполненные знаки относятся к аминокислотам с разветвленным скелетом

Весьма примечателен характер набора аминотрансферазных систем, присутствующих у отдельных представителей рода *Candida*. Выявлены значительные различия в распределении у отдельных штаммов систем, катализирующих перенос на 2-оксоглутарат аминной группы аминокислот, отличающихся друг от друга по структуре углеродного скелета.

Фиг. 1 иллюстрирует коррелятивную связь между набором аминотрансферазных систем отдельных представителей, реагирующих с гомологическими рядами α -аминокислот с нормальным и разветвленным скелетом.

Графическое изображение показывает, что отдельные штаммы сильно отличаются по набору аминотрансфераз, специфически действующих на гомологический ряд аминокислот с нормальным и разветвленным скелетом. Среди всех культур *C. guilliermondii membranaefaciens* наглядно отличается низкой активностью, фактически отсутствием аминотрансфераз, реагирующих с α -аминокислотами C_3 — C_6 нормального ряда. Эти данные полностью совпадают и в определенной степени способствуют пониманию ранее описаного явления весьма замедленных темпов роста этой культуры в среде, содержащей в качестве единственного источника азота α -аминокислот C_3 — C_6 ряда (в т. ч. α -АМК) (8).

Интерес представляет и то, что аминокислоты, обладающие разветвленными цепочками с 5—6 атомами углерода (валин и лейцин), довольно сильно подвергаются переаминированию в присутствии 2-оксоглутарата, что указывает на абсолютную специфичность энзиматических систем к структуре соответствующих субстратов.

C. utilis отличается среди всех штаммов тем, что в нем не найдены большие расхождения в активности аминотрансфераз, действующих на аминокислоты с нормальной и разветвленной C_5 — C_6 цепочками.

У исследуемых двух штаммов *C. tropicalis* аминотрансферазные системы, действующие на валин, лейцин, норвалин и норлейцин, показывают равные активности, что можно считать хорошим примером внутривидовой специфичности в распределении этих систем.

В противоположность этому, набор аминотрансфераз *C. guilliermondii* совершенно отличается от такового *C. guilliermondii membranaefaciens* как по специфичности к субстратам C_3 — C_6 нормального ряда, так и уровню относительной активности. Эти расхождения особенно наглядны по отношению норвалина и норлейцина. Наоборот, к α -аминокислотам C_5 — C_6 разветвленного ряда (валин, лейцин) упомянутые два штамма проявляют сходные показатели активности.

Из исследуемых культур *C. pulcherrima* отличается постепенным повышением активности аминотрансферазных систем с удлинением углеродного скелета субстрата, что служит среди исследуемых культур характерным признаком этого штамма.

Ереванский государственный университет

Институт микробиологии Академии
наук Армянской ССР

Candida ցեղի խմորասնկերի ամինատրանսֆերազային ակտիվությունը

Ուսումնասիրվել է *Candida* խմորասնկերի 7 ներկայացուցիչների ամինատրանսֆերազային սխտեմների ակտիվությունը անբջիջ պրեպարատներում, որոնք կատալիզում են 18 բնական ամինաթթուների NH_2 խումբը 2-օքսազլյուտարատի վրա փոխանցելու ունակցիան:

Ազյուսակից երևում է, որ ուսումնասիրված կուլտուրաներում ամենից ավելի ակտիվ են այն ամինատրանսֆերազային սխտեմները, որոնք փոխանցում են ասպարադինաթթվի, վալինի, լեյցինի, իզուլեյցինի, նորվալինի և նորլեյցինի NH_2 խումբը:

Candida ցեղի բոլոր ուսումնասիրվող ներկայացուցիչները ազդատ կամ նույնիսկ զուրկ են գլիցինի, սերինի, ֆենիլալանինի, լիզինի NH_2 խումբը փոխանցող ամինատրանսֆերազային սխտեմներից: Այն ամինատրանսֆերազները, որոնք ունակցում են մնացյալ ամինաթթուների հետ, աչքի են ընկնում պակաս ակտիվությամբ և կամ նրա անհամաչափ բաշխումով առանձին կուլտուրաների մոտ:

Ուշագրավ է հետևյալ փաստը՝ ալանին-2-օքսոզլյուտարատ ամինատրանսֆերազը ուսումնասիրվող բոլոր կուլտուրաներից համեմատաբար բարձր ակտիվություն է ցուցաբերում միայն *C. utilis*-ի և *C. chevalierii*-ի մոտ, իսկ թույլ է մյուս կուլտուրաներից ստացված պրեպարատներում: Այսպիսով *Candida* ցեղի մի շարք ներկայացուցիչների համար գլյուտամինաթթվի սինթեզը ի հաշիվ α -ալանինի NH_2 խմբի, չի հանդիսանում ազոտի յուրացման առաջատար ուղին:

Կորագծերից երևում է, որ գոյություն ունեն զգալի տարբերություններ առանձին շտամների միջև՝ նորմալ և ճյուղավորված կմախքով ամինաթթուների հոմոլոգ շարքերի վրա առանձնահատուկ ազդեցություն զործող ամինատրանսֆերազների կոմպլեքսի տեսակետից:

Ուսումնասիրվող կուլտուրաներից *C. pulcherrima*-ն օժտված է ինչպես ավելի հարուստ, այնպես էլ ավելի ակտիվ ամինատրանսֆերազային սխտեմներով: *C. guilliermodii membranaefaciens*-ը աչքի է ընկնում ամինատրանսֆերազային թույլ ակտիվությամբ հանդեպ C_2 — C_3 նորմալ շարքի ամինաթթուները, մինչդեռ վալին և լեյցին ճյուղավորված շղթայով ամինաթթուները ուժեղ կերպով ենթարկվում են վերաամինացման 2-օքսոզլյուտարատի ներկայությամբ, որը ցույց է տալիս կնդիմային սխտեմների բացարձակ սպեցիֆիկությունը համապատասխան սուրստրատների կառուցվածքի նկատմամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ P. P. Cohen, Fed. Proc. 1, 273, 1942, in R. M. Herbst, Adv. Enzymol. 2, 75, 1946. ² P. Roine, IV Intern. Congr. Microbiol., Proceedings, p. 557, 1947. ³ L. Bigger-Gehring, J. Gen. Microbiol., 13, 45, 1955. ⁴ C. P. Mardashev (Mardashev), Pure & Appl. Chem., 7, 689, 1963. ⁵ H. Holzer, U. Gerlach, G. Jacobi, M. Gnoth, Biochem. Ztschr., 329, 529, 1958. ⁶ R. Pietruzcko, L. Fowden, Ann. Botany, 25, 491, 1961. ⁷ A. Meister, J. Biol. Chem. 206, 587, 1954. ⁸ Մ. Ա. Եր-Կարապետյան, Ս. Մ. Ինձջուկյան, ԺԱՆ ԱրմՍՍՐ, տ. 43, 117 (1966). ⁹ Մ. Ա. Եր-Կարապետյան, Ս. Մ. Ինձջուկյան, Ս. Վ. Կլեբարյան, Բիոլ. թ. Արմենի, 21 (1), 3 (1968).