

УДК 576.8(098) + 576.872

БИОХИМИЯ

Академик АН Армянской ССР М. А. Тер-Карпетян, Д-р А. Геворкян

**Состояние аминокислот растворимой фракции биомассы
S. albicans в конце экспоненциальной фазы роста**

(Представлено 12/VI 1969)

В последние годы уделяется большое внимание извлекаемым «мягкими» способами (экстракция холодной и теплой водой, 80%-ным этанолом, разбавленными растворами уксусной, трихлоруксусной и хлорной кислот) составным компонентам клеток, известным под общим названием «свободные» метаболиты или «запасной фонд» («metabolic pools» или «pool» у зарубежных авторов) (1, 2).

Запасной фонд является местом накопления метаболитов, проникнувших в клетку извне (экзогенные), а также метаболитов, образующихся в результате распада клеточных структур или взаимопревращения экзогенных и эндогенных субстратов (эндогенные).

Изучение состава легкоизвлекаемых компонентов (аминокислоты, нуклеотиды, сахара и др.) и его изменений имеет первостепенное значение для понимания процессов обеспечения живой клетки, в частности микробной, энергией и необходимыми кирпичиками-мономерами для построения клеточных структур (2).

Однако до настоящего времени нет точных сведений об истинном механизме распределения и накопления аминокислот запасного фонда в структурных компонентах клетки, таких, как мембрана, разные органеллы. Очевидно, присоединение аминокислот к клеточным структурам происходит посредством связей ковалентного типа (пептидного и др.), но не имеется и данных о значимости той или иной формы физических связей (водородной, электростатической, ван-дер-ваальсовых сил), обеспечивающих присоединение аминокислот к компонентам клеток различной степени полимеризации.

Нет также точных представлений о взаимоотношениях аминокислот запасного фонда с водной фазой внутреннего пространства клеток, иными словами, о том, какому физико-химическому понятию соответствует так называемое «свободное» состояние аминокислот в весьма сложной структуре клеточной воды.

В настоящее время по причине отсутствия объективных данных на эти вопросы понятие запасного фонда (или «свободных») аминокислот остается скорее функциональным, чем физико-химическим (2).

В поисках решения этого важнейшего вопроса и с целью выяснения некоторых сторон взаимоотношений между исключенными в полимеризацию аминокислотами и структурными компонентами клетки, в том числе и ее водной фазой, мы изучали возможность фракционирования запасного фонда аминокислот путем его последовательного извлечения ацетоном и этанолом.

Моделью для исследований служил дрожжевой организм *S. albicans* (штамм № 86, полученный из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР). Посевным материалом служила двухдневная культура на агаре, которая выращивалась в синтетической среде следующего состава (г/л): глюкоза—100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —3,10, KH_2PO_4 —1,23, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,625, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —0,125, NaCl —0,125, биотин—8 мкг на 1 л водопроводной воды. Полученная биомасса подвергалась пастеризации в 2%-ном растворе глюкозы и использовалась в качестве исходной культуры (Нсх) для проведения опытов. Опыты ставились в той же синтетической среде (дополненной смесью витаминов группы В), где источником азота служило одно из следующих соединений: сульфат аммония (NH_4^+), глутаминовая кислота (Глу), аргинин (Арг), пролин (Про), орнитин (Ори), цитруллин (Цит), глутамин (Глу— NH_2), аспарагиновая кислота (Асп), треонин (Тре), изолейцин (Илей), аспарагин (Асп— NH_2), аланин (Ала), валин (Вал), лейцин (Лей), серин (Сер), глицин (Гли), лизин (Лиз); эти вещества брались в количествах, равных по азоту (3).

Полученная в конце цикла роста биомасса в свежем виде подвергалась двойной экстракции сначала холодным ацетоном, двумя порциями по 50 и 20 мл в течение 1 и 1/2 часа соответственно (экстракты объединялись), затем кипящим 80%-ным спиртом 1 час. Известно, что ацетон является более слабым растворителем для аминокислот, чем этанол (4).

Количественное определение аминокислот проводилось методом хроматографии на бумаге. В качестве проявителя использовался нингидрин.

Аминокислоты, экстрагируемые ацетоном и этанолом в биомассе *S. albicans*, выращенной в среде, содержащей различные источники азота. Результаты исследований приведены в табл. 1.

В каждом варианте аминокислота среды (источник азота), накопленная в большом количестве в синтезируемой биомассе, считается экзогенной, а все другие аминокислоты того же варианта, NH_2 -группа которых происходит из аминокислоты-источника азота или синтезируется из NH_4^+ и осколков глюкозы, считаются эндогенными. Из не менее 14 эндогенных аминокислот и 2-х амидов в таблице приведены данные относительно 8 аминокислот, определение которых является наиболее достоверным. Для сравнения приведен также аминокислотный состав экстрактов исходной голодающей культуры. По этим же аминокислотам на рис. 1—3 указаны значения отношения ацетон/этанол экстрактов в ис-

Таблица 1

Данные в миллиграммах на 100 г абсолютно сухой биомассы

Аминокислоты-источники азота	Экзогенные аминокислоты		Эндогенные аминокислоты															
			Глу	Ори	Лиз	Арг	Ала	Вал	Илей	Тре								
	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте	В ацетоновом экстракте	В спиртовом экстракте		
Исх.	—	—	20	96	—	47	5	45	6	21	11	44	7	14	16	19	10	18
NH ₄	—	—	173	231	51	148	62	192	61	179	139	128	49	16	42	22	59	29
Глу	886	398	—	—	45	35	145	90	40	15	138	47	73	20	109	29	109	32
Арг	140	435	188	141	18	51	65	214	—	—	210	84	75	14	137	70	100	35
Про	1131	190	118	274	13	18	31	88	31	89	179	131	76	13	78	28	95	43
Ори	112	442	114	268	—	—	16	86	27	69	75	116	19	17	21	18	25	25
Лиз	121	1448	24	327	5	259	12	247	—	106	29	147	14	61	51	29	19	42
Глу—NH ₂	—	—	272	157	60	89	122	171	67	98	265	110	113	37	140	43	146	63
Асп	—	—	365	167	31	80	89	117	74	42	217	71	49	10	53	17	93	26
Тре	325	360	55	176	—	—	21	97	8	50	35	55	46	40	203	101	—	—
Илей	301	125	127	214	6	28	43	141	12	35	102	119	68	34	301	125	22	32
Асп—NH ₂	249	207	220	168	39	96	53	121	32	45	139	67	48	11	60	9	58	31
Ала	465	394	152	301	16	106	20	141	10	82	—	—	37	Следы	87	Следы	51	44
Вал	651	105	83	179	9	35	28	94	7	26	173	161	—	—	57	18	38	31
Илей	295	74	97	170	14	26	25	78	6	16	50	63	80	20	—	—	24	23
Сер	158	121	197	248	28	94	58	175	14	69	247	100	85	33	153	34	88	45
Лиз	113	147	155	269	60	45	33	138	16	71	128	101	48	32	60	29	51	40
Лиз	56	766	12	251	—	—	—	—	—	—	25	101	31	71	44	14	9	36

ходной культуре, а также в биомассах, синтезированных за счет NH_4^+ и всех аминокислот.

Данные показывают три типа распределения экзогенных аминокислот между ацетоновым и этаноловым экстрактами: все диаминокислоты—лизин, орнитин, цитруллин, аргинин—экстрагируются, в основном, этанолом; большинство моноаминомонокарбоновых кислот—валин, лей-

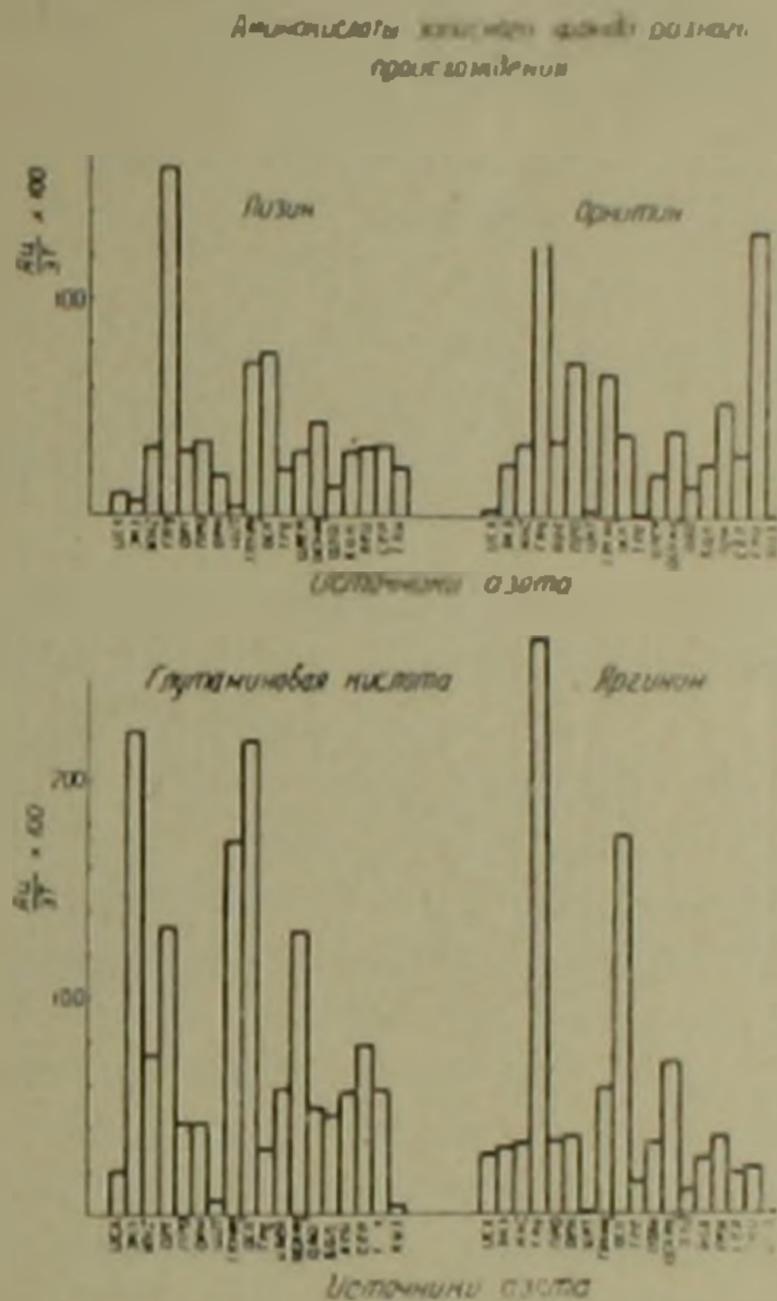


Рис. 1

цин, изолейцин и моноаминодикарбоновые кислоты—глутаминовая, аспарагиновая, а также аспарагин и пролин—экстрагируются, в основном, ацетоном; некоторые моноаминомонокарбоновые кислоты—глицин, серин, треонин, иногда и аланин—распределяются в равной степени между двумя экстрактами, даже несколько больше в этаноловой фракции.

Такое же распределение имеет место для аминокислот, синтезируемых за счет сульфата аммония, за исключением глутамата и треонина, первый из них больше содержится в этаноловом, а второй—в ацетоновом экстракте.

При эндогенном образовании за счет других аминокислот—источников азота распределение этих 8 аминокислот приобретает иной характер. Высокие концентрации глутаминовой кислоты в ацетоне наблюдаются только в биомассе, выращенной в присутствии глутамин, аспарагиновой кислоты, аспарагина, аргинина; для всех других источников основная доля глутамата экстрагируется этанолом.

Диаминокислоты, синтезируемые за счет большинства аминокислот—источников, в основном остаются в этаноловом экстракте, за ис-

ключением лизина, синтезируемого за счет глутамата, орнитина — за счет глутамата и глицина, аргинина — за счет глутамата и аспартата; концентрация этих диаминокислот в названных случаях значительно выше в ацетоновых экстрактах. Что касается моноаминомонокислот — аланина, валина, лейцина, — то их основная доля извлекается, как

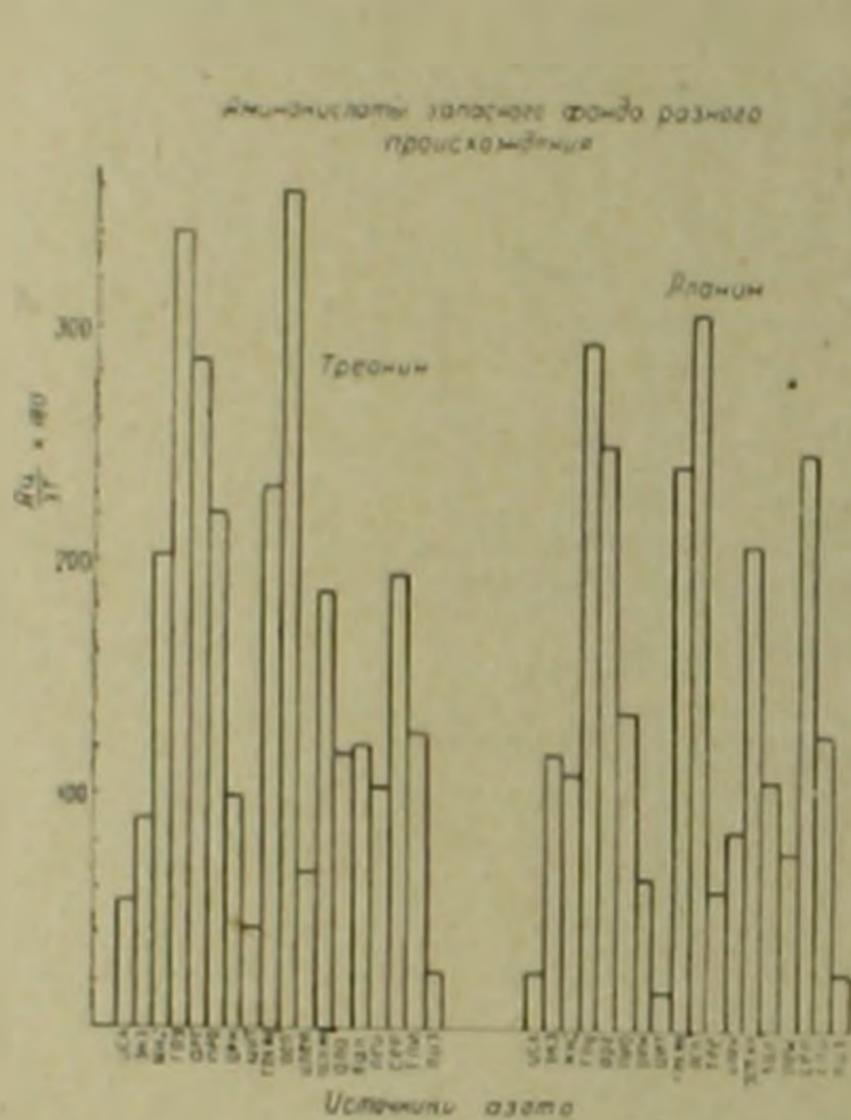


Рис. 2

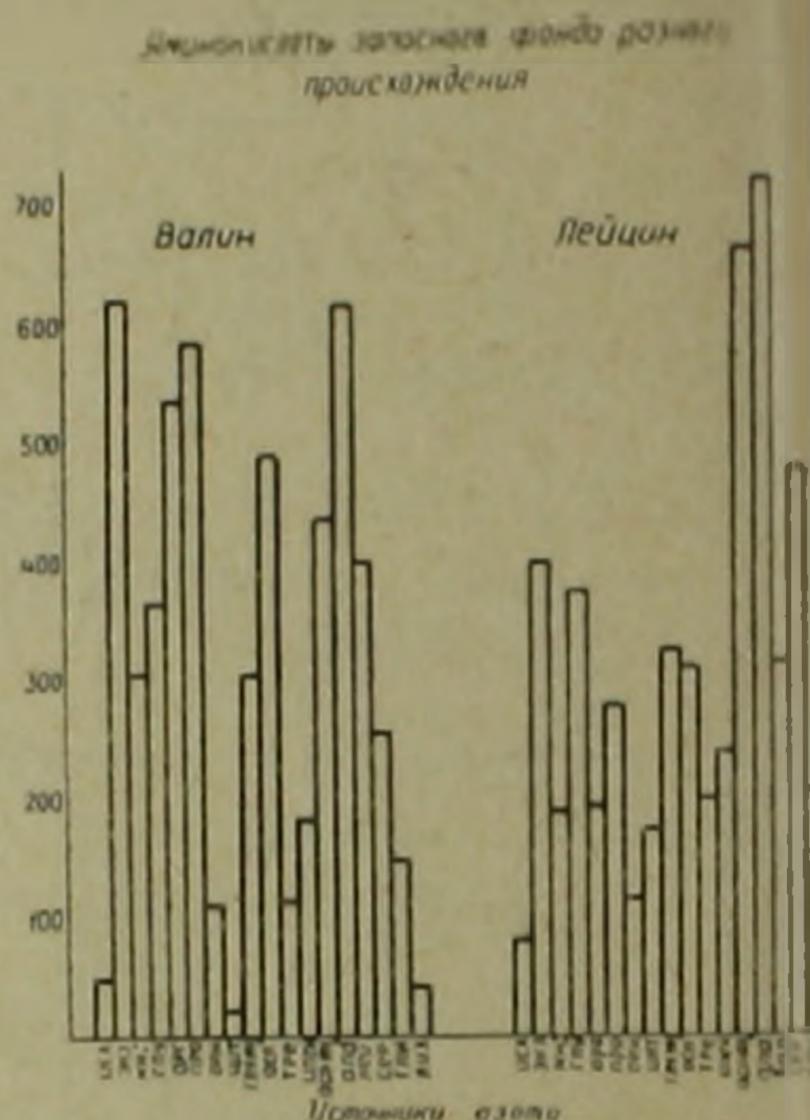


Рис. 3

и при их экзогенном образовании, ацетоном, кроме вариантов, где они образуются за счет малоэффективных для их синтеза источников азота, а именно: при образовании аланина из орнитина, цитруллина, треонина, лейцина, лизина; валина — из лизина и т. д.

Совокупность полученных результатов показывает особый характер распределения растворимых аминокислот между ацетоновым и этаноловым экстрактами. Распределение аминокислот не зависит как от их общего количества, так и от уровня накопления отдельных соединений; оно не ограничивается также растворимостью отдельных аминокислот в том или другом растворителе. Так, например, для глутамата при суммарном количестве 116 мг (в исходной культуре) ацетон/этанол отношение равно 21%, тогда как при 1284 мг (в случае экзогенного происхождения) и 532 мг (при образовании из аспарагиновой кислоты) оно достигает 223 и 219% соответственно; для орнитина при общем количестве 554 мг (экзогенное происхождение) ацетон/этанол отношение равно 25%, при 198 мг (из NH_4^+) — 34%, при 80 мг (из глутамата) — 129%; лизин при общем количестве 822 мг (экзогенный) дает ацетон/этаноловое отношение, равное 7%, при 254 мг (из NH_4^+) — 32%, при 235 мг (из глутамата) — 161% и т. д.

Решающими факторами в распределении аминокислот между двумя

примененными растворителями являются, в основном, их происхождение и полярность.

Глутаминовая кислота занимает особое место, так как ее ацетон/этанол отношение в исходной культуре, а также при синтезе из NH_4^+ и из целого ряда моноамино- и диаминокислот низкое, в то время как при ее экзогенном образовании или при образовании за счет глутамина, аспартата, аспарагина и аргинина, т. е. за счет метаболитов, весьма тесно связанных с ней по путям взаимопревращений, наибольшая ее доля накапливается в ацетоновой фракции.

Вышеизложенные факты еще раз подтверждают, что внутри клетки нет единой формы «свободного» состояния аминокислот-мономеров, а имеется ряд систем:

— аминокислота — вода („собственный“ раствор);

— аминокислота — вода — $\left[\begin{array}{c} \text{микро} \\ \text{или/и} \\ \text{макро} \end{array} \right]$ — молекулярные структуры;

— аминокислота — $\left[\begin{array}{c} \text{микро} \\ \text{или/и} \\ \text{макро} \end{array} \right]$ — молекулярные структуры и др.

Это указывает на значение заряда отдельных аминокислот как и их распределении и степени их связывания внутри клетки, так и в извлекаемости аминокислот при помощи различных растворителей.

Таким же образом можно представить, что расположение в клетке микро- или макромолекулярных структур, имеющих суммарно положительный или отрицательный заряд, может контролировать распределение аминокислот с определенной полярностью, связывая даже одну и ту же аминокислоту разными типами связей.

На основании вышеизложенного можно заключить, что выдвинутая рядом исследователей (⁵⁻¹⁰) концепция о наличии в клетке двух запасных фондов—внешнего и внутреннего, каждый из которых включает все аминокислоты, независимо от их полярности, недостаточно отражает истинное состояние аминокислот-мономеров в клетке и подлежит пересмотру. Для правильного разрешения этого вопроса необходимо учесть не только полярность аминокислот, но также количество и суммарную полярность клеточных структур, способных связывать аминокислоты или являющихся «участками» их взаимопревращения или синтеза.

Ереванский государственный университет

Институт микробиологии

Академии наук Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Մ. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Զ. Ա. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ

Ամինաթթուների վիճակը *C. albicans*-ի բիոմասայի լուծելի ֆրակցիայում
անման էխսպոնենցիալ փուլի վերջում

Ներկայումս մեծ ուշադրություն է դարձվում բնականում ամինաթթուների վիճակի վրա (ազատ կամ կապված ըլլալի միջոց. և մակրոմոլեկուլների հետ). սա մի օգուկ է՝ սպիտակուցային ֆոսֆատազային մեջ երանջ ենթարկումը հասկանալու և կարգավորելու համար:

Բջիջների պահեստային ֆոնդում ամինաթթուների կապվածության աստիճանը որոշելու համար *C. albicans*-ի բջիջների ամինաթթուները ֆրակցիոն էքստրակցիայի են ենթարկվել «կրթում սառը աջատեսով, ապա՝ էթանոլով, կատարված փորձերը ցույց են տվել, որ այդ բջիջների պահեստային ֆոնդում ամինաթթուների բաշխումը կատարվում է հիմնականում 3 ձևով՝ մոնոամինադիկարբոնաթթուները (ասպարգինա- և գլուտամինաթթուներ) գերազանցապես էքստրակցիայի են ենթարկվում աջատեսով, դիմինաթթուները (լիզին, օրնիթին, արգինին)՝ էթանոլով, իսկ մոնոամինամոնոկարբոնաթթուները գրեթե հավասար չափով են բաշխվում աջատեսային և էթանոլային էքստրակցիայի միջև: Մյուս կողմից, ամինաթթուների էքստրակցիայի գերակշռումը այս կամ այն լուծիչով կախված չէ բջիջ ներսում նրանց կոնցենտրացիայից, այլ որոշվում է նրանց մազոմով և բեկոակտիվությամբ:

Այսպիսով, երկու պահեստային ֆոնդերի հասկացողությունը, որ սահմանել են մի շարք հեղինակներ, ավելի շուտ ֆունկցիոնալ է, քան ֆիզիկա-քիմիական, նիշտ չի արտահայտում ամինաթթուների վերաբերյալ բջիջ ներսում և ենթակա է վերանայման:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Կ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Ք Յ ՈՒ Ն

- ¹ E. F. Gale, Adv. Prot. Chem., 8, 285 (1953). ² J. T. Holden (ed.), Amino acid pools (Symposium), Duarte, Calif., 1962. ³ M. A. Ter-Karapetjan, Дж. А. Геворкян, Биол. журнал Армении, т. 22 (4), № 3 (1969). ⁴ E. J. Cohn, J. T. Edsall, Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions, N. Y., 1943. ⁵ D. B. Cowle, B. P. Walton, Biochim. Biophys. Acta, 21, 2, 211 (1956). ⁶ D. B. Cowle, F. T. McClure, Biochim. Biophys. Acta, 31, 1, 236 (1959). ⁷ H. O. Halvorson, D. B. Cowle, Symp. CSA, Proc. Symp., Prague, 1960. ⁸ R. J. Britten, F. T. McClure, (ed. Holden), Amino acid pools (Symposium), Duarte, Calif., 1962. ⁹ R. J. Britten, F. T. McClure, Bacteriol. Revs., 26, 3, 222 (1962). ¹⁰ R. J. Britten, Recent Progr. Microbiol., Symp., Intern. Congr. Microbiol., Montreal, 1962.