

УДК 577.1:576.8.097

БИОХИМИЯ

Академик АН Армянской ССР М. А. Тер-Карапетян, Ю. Г. Попов

Адаптация *Candida chevalieri* к треонину
 и *Candida guilliermondii* к метионину

(Представлено 24/IV 1971)

Адаптация дрожжевых организмов к питательным веществам лучше всего изучена на примере пентоз (1, 2). Данные по адаптации дрожжей к трудноусвояемым источникам азота встречаются реже (3, 4). В нашей лаборатории адаптация такого рода обнаружена при культивировании *Candida chevalieri* в среде с DL-валином в качестве единственного источника азота (5).

Нами была предпринята аналогичная попытка адаптировать *Candida chevalieri* (шт. № 66) к DL-треонину и *Candida guilliermondii* (шт. № 71) к DL-метионину. При инкубировании указанных культур в синтетической среде, содержащей 1% глюкозы и, в качестве единственного источника азота, соответственно, треонин или метионин, потребление глюкозы начиналось после продолжительной лаг-фазы и завершалось лишь к 60—90 часам. В присутствии сульфата аммония в этих же условиях весь сахар оказывался израсходованным уже к 25—30 часам (рис. 1).

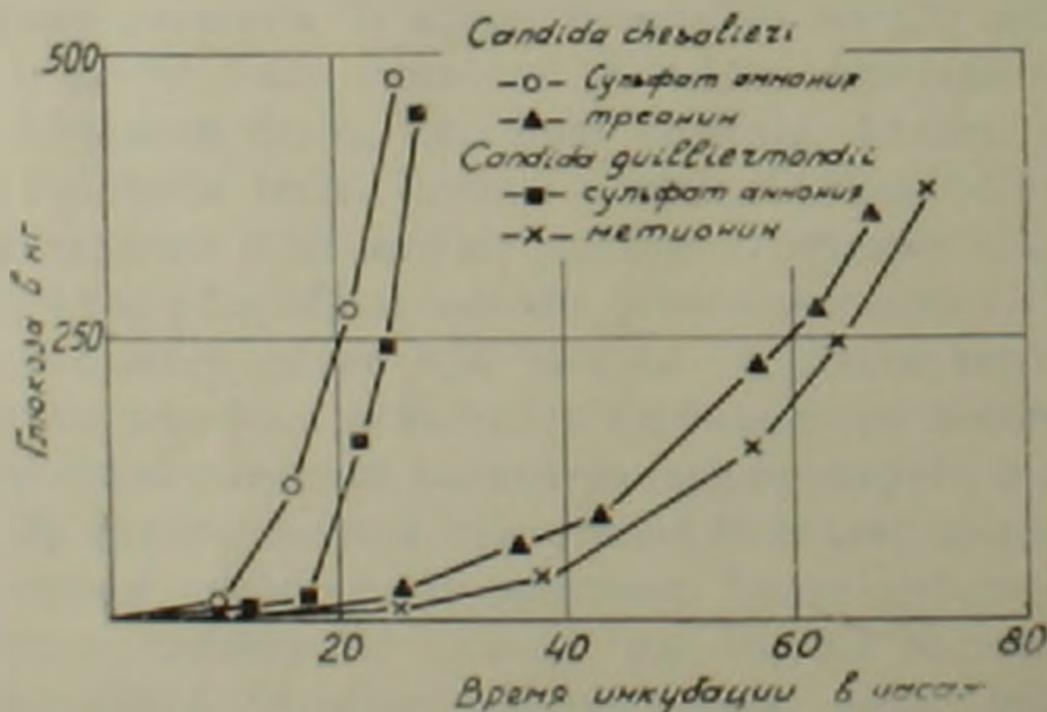


Рис. 1. Динамика потребления глюкозы музейными культурами *C. chevalieri* и *C. guilliermondii* в присутствии сульфата аммония, треонина или метионина

Это наблюдение послужило основанием для проведения серии опытов по выявлению возможности приспособления *S. chevalieri* к треонину и *S. guilliermondii*—к метионину.

Для обнаружения явления адаптации проводились последовательные пересевы дрожжевых клеток из среды с законченным циклом роста в новую среду, содержащую треонин или метионин как единственный источник азота. Факт адаптации устанавливался по сокращению лаг-фазы и ускорению темпов потребления глюкозы среды и синтеза биомассы.

Состав культуральной среды, способ подготовки посевного материала и методика проведения эксперимента в основных чертах были те же, что и в предыдущей работе (6). Различие состояло в том, что для опытов по адаптации культуры брались непосредственно с сусло- или NH₄ агара. Посевной материал вносился в опытные колбы в количестве 5—10 мл клеток (порядка сотых долей миллиграмма) на 50 или 100 мл среды. Такой разреженный посев исключал вероятность адаптации в результате отбора мутантных клеток. Кроме того, при адаптации *S. guilliermondii* к метионину количество потребленной глюкозы каждый раз определялось после пропускания пробы через колонку с катионитом для удаления метионина, дающего реакцию на сахар (7). В силу ауксотрофности культуры *S. guilliermondii* добавлялся биотин из расчета 0,8 мкг на 100 мл среды (8). Сульфат аммония и аминокислоты вносились в среду в равных по азоту количествах (г/л): сульфат аммония—3,10, треонин—5,67, метионин—7,10.

Результаты одного из серии опытов по адаптации *S. chevalieri* к треонину и *S. guilliermondii* к метионину путем последовательных пересевов приведены в табл. 1.

Как показывают полученные данные, начиная со II—III пассажей *S. chevalieri* в среду с треонином, потребление глюкозы резко ускорялось и устанавливалось на максимуме к V—VI пассажам, не достигая, впрочем, темпов потребления глюкозы музейной культурой в среде с сульфатом аммония. Период полного израсходования глюкозы в среде с треонином в условиях опыта сокращался у адаптируемой культуры по окончании адаптации с 60—70 часов до 35—40 часов.

Из приведенных данных видно также, что в течение I пассажа в среде с метионином музейная культура *S. guilliermondii* после длительной лаг-фазы в 40—50 часов постепенно начинает потреблять глюкозу, полное израсходование которой заканчивается к 90 часам. Завершение процесса адаптации при последовательных пересевах в новую среду с метионином наблюдается между VI—VII пассажами, при этом период полного израсходования глюкозы адаптированной культурой в среде с метионином сокращается, по сравнению с музейной, почти вдвое (с 85—90 час. до 45—50 час.).

Как и следовало ожидать, параллельно сокращению лаг-фазы и ускорению потребления глюкозы увеличивалась скорость синтеза биомассы. Данные одного из опытов по динамике потребления глюкозы и роста

Таблица 1

Динамика потребления глюкозы при последовательных пассажах *C. chevalieri* в среду с DL-треонином и *C. guilliermondii* в среду с DL-метионином. В скобках указывается количество глюкозы (мг) перед началом опыта в 50 мл среды

Пассаж <i>C. chevalieri</i> в среду с	Продолжительность инкубации, час	Потребленная глюкоза, мг	Пассаж <i>C. guilliermondii</i> в среду с	Продолжительность инкубации, час	Потребленная глюкоза, мг	
NH ₄ ⁺ (527)	15	68	NH ₄ ⁺ (506)	27	156	
	20	288		31	296	
	24	46		34	510	
DL-треонином	I (527)	0	I (506)	43	8	
		50		70	46	
		381		77	180	
	II (527)	25	II (525)	91	466	
		105		51	10	
		515		63	55	
	III (481)	160	DL-метионином	92	375	
		250		99	500	
		310		III (525)	39	0
		424			65	319
	IV (481)	68	IV (503)	70	425	
		298		35	0	
		352		48	150	
		455		57	350	
	V (481)	100	V (503)	37	43	
		205		46	167	
		352		60	465	
		475		VI (503)	33	53
	VI (481)	85	47		337	
		257	VII (506)	31	46	
	468	VII (490)				43
	64		51	133		
	111	VIII (490)			18	104
	280		27	250		
405	36	421				

биомассы музейных и адаптированных культур *C. chevalieri* и *C. guilliermondii* на сульфате аммония и, соответственно, на треонине или метионине приведены в табл. 2. Коррелятивная связь между указанными показателями очевидна.

На основании полученных данных можно предположить, что свойство усваивать треонин или метионин приобретает соответствующими культурами путем индукции в присутствии указанных аминокислот, действующих как специфический субстрат. Образование биомассы за счет мутантных клеток фактически исключается, так как даже при допущении частоты мутаций порядка $10^{-3} - 10^{-5}$ мутантные клетки за данный

Динамика потребления глюкозы и синтеза биомассы музейными и адаптированными культурами *S. chevalieri* и *S. guilliermondii*

Продолжительность инкубации <i>S. chevalieri</i> , час	Музейная в среде с				Адаптированная в среде с DL-треонином		Продолжительность инкубации <i>S. guilliermondii</i> , час	Музейная в среде с				Адаптированная в среде с DL-метионином	
	NH ₄ ⁺		DL-треонином		потребленная глюкоза, мг	синтезированная биомасса, мг		NH ₄ ⁺		DL-метионином		потребленная глюкоза, мг	синтезированная биомасса, мг
	потребленная глюкоза, мг	синтезированная биомасса, мг	потребленная глюкоза, мг	синтезированная биомасса, мг				потребленная глюкоза, мг	синтезированная биомасса, мг	потребленная глюкоза, мг	синтезированная биомасса, мг		
15,0	15	7	38	3	27	4	13,5	55	20	4	2	10	2
20,0	165	70	43	5	43	19	19,0	217	76	31	5	47	7
25,0	364	175	48	9	63	26	24,0	290	109	42	10	100	27
28,0	472	228	88	11	110	29	26,5	354	135	54	15	140	50
38,5	—	—	129	46	278	119	37,5	—	—	197	95	455	160
41,5	—	—	175	62	382	152	43,0	—	—	234	109	—	—
43,0	—	—	195	70	422	165	48,5	—	—	342	137	—	—
46,0	—	—	244	99	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50,0	—	—	343	114	—	—	—	—	—	—	—	—	—
58,0	—	—	487	171	—	—	—	—	—	—	—	—	—

период инкубации не могли бы обеспечить накопление полученных количеств биомассы.

Это предположение подтвердилось при густом посеве музейной и адаптированной культур *S. guilliermondii* на среду с агаром, содержащую в качестве единственного источника азота метионин. Если допустить существование мутантных клеток, то следовало ожидать, что в случае густого посева на агаризованную среду с метионином эти клетки образовали бы более крупные колонии, число которых должно было возрасти в течение инкубации. Однако в наших опытах в одной и той же пробе выросшие колонии всегда были одинакового размера.

Проверка витаминных потребностей адаптированной культуры *S. guilliermondii*, ее способности сбраживать различные сахара, а также ряд морфологических наблюдений показали, что изменение в усвоении метионина не связано с изменением наследственных особенностей организма.

Для уточнения характера наблюдаемых изменений необходимо было установить, являются ли они массовыми и обратимыми или нет. Положительные ответы окончательно подтвердили бы предположение об индуктивном характере изменений, возникающих у культур *S. chevalieri* и *S. guilliermondii* под действием треонина и метионина, действующих как специфические субстраты.

В связи с этим был проведен посев музейных культур *S. chevalieri* и *S. guilliermondii* на агаризованные синтетические среды с сульфатом аммония и, соответственно, с треонином или метионином. У исследуемых культур в обоих вариантах выросло одинаковое число колоний, с некоторой задержкой роста на средах, содержащих в качестве единственного источника азота треонин или метионин.

Проверка обратимости свойства усваивать треонин культурой *S. chevalieri* также подтвердила правильность первоначального предположения. Деадаптация проводилась путем пассажей адаптированной культуры на агаризованную среду с сульфатом аммония. Было проведено XV

Таблица 3

Динамика потребления глюкозы музейными, адаптированными и деадаптируемыми культурами *S. chevalieri* и *S. guilliermondii*

Количество глюкозы перед началом опыта в 50 мл среды с *S. chevalieri*—592 мг, с *S. guilliermondii*—556 мг

Продолжительность инкубации <i>S. chevalieri</i> , час	Потребленная глюкоза (мг) в среде с						Продолжительность инкубации <i>S. guilliermondii</i> , час	Потребленная глюкоза (мг) в среде с					
	NH_4^+		DL-треонином					NH_4^+		DL-метионином			
	музейная	адаптированная	деадаптируемая, после IV пассажа на NH_4^+	деадаптируемая, после IX пассажа на NH_4^+	деадаптируемая, после XV пассажа на NH_4^+	музейная		адаптированная	деадаптируемая, после I пассажа на NH_4^+	деадаптируемая, после VIII пассажа на NH_4^+	деадаптируемая, после XXI пассажа на NH_4^+		
19	181	0	154	146	116	54	18	136	0	20	31	25	0
23	499	0	168	160	140	85	24	526	26	67	88	82	56
29	—	15	216	202	160	128	29	—	53	135	156	129	137
39	—	86	500	442	184	155	40	—	106	483	510	454	493
43	—	141	—	496	432	186	64	—	340	—	—	—	—
48	—	207	—	—	476	364	73	—	493	—	—	—	—
52	—	343	—	—	—	423	—	—	—	—	—	—	—

пассажей. Далее, для сравнения свойств музейной, адаптированной к треонину и деадаптируемых культур были поставлены параллельные варианты: посев музейной культуры в жидкие среды с сульфатом аммония и с треонином (контроль), адаптированной и деадаптируемых, но после различного числа пассажей на NH_4^+ -агаре,—в среду с треонином. Как показывают сведенные в табл. 3 данные одного из опытов по динамике потребления глюкозы у перечисленных культур, начиная с IV пассажа на среде с NH_4^+ -агаром темпы потребления глюкозы деадаптируемыми культурами на треонине постепенно снижаются, почти достигая уровня музейной культуры к XV пассажу.

Нами были продолжены и опыты по деадаптации *S. chevalieri* к валину (5). Длительное пассажирование на среде с NH_4^+ -агаром—до XV

пассажа, привело к частичной потере свойства усваивать валин в качестве единственного источника азота.

Для доказательства обратимости свойства усваивать метионин, приобретенного при инкубировании в среде с метионином культурой *C. guilliermondii*, адаптированная культура также многократно пересевалась на агаризованную среду, содержащую сульфат аммония в качестве единственного источника азота. Результаты опыта по динамике потребления глюкозы деадаптируемыми культурами I, VIII и XXI пассажей (табл. 3) показали, что способность усваивать метионин необратима.

Полученные данные показывают, что исследованные культуры, по-видимому, отличаются друг от друга по механизму адаптации к треонину и метионину. Различия в механизме адаптации имеются не только между видами, но и в пределах одного вида, о чем свидетельствует пример *C. chevalieri*, адаптированной к валину и треонину.

Ереванский государственный университет

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Մ. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, ՅՈՒ. Դ. ԳՈՂՈՎ

Candida chevalieri-ի ադապտացիան քրեոնինի և Candida guilliermondii-ի ադապտացիան մեթիոնինի նկատմամբ

C. chevalieri և *C. guilliermondii* 1% գլյուկոզ պարունակող միջավայրում աճեցնելիս, հրր ազոտի միակ աղբյուր ծառայում են համապատասխանաբար, թրեոնինը կամ մեթիոնինը, գլյուկոզի ծախսումն սկսվում է երկարատև լազ-ֆազա-ից հետո: Աճման ցիկլի վերջում կատարված հաջորդական փոխացանքսերի ընթացքում լազ-ֆազան կրճատվում է, իսկ միջավայրի գլյուկոզի ծախսման և կենսազանգվածի կուտակման արագությունը՝ մեծանում: Երկու կուլտուրաների մոտ էլ ադապտացիան ավարտվում է V—VII պասաժներում: Ադապտացված կուլտուրաների կողմից, թանգարանայինների համեմատությամբ, միջավայրի շաքարը ծախսվում է գրեթե կրկնակի անգամ ավելի արագ, չհասնելով սակայն ամոնիակ սուլֆատի առկայությամբ գլյուկոզի ծախսման արագությանը:

Ադապտացված կուլտուրաների մոտ հարաբերակցական կապ է նկատվել գլյուկոզի ծախսման և կենսազանգվածի կուտակման դինամիկայի միջև:

Մուտանտ քչիջների հաշվին կենսազանգվածի նկատված քանակության կուտակման հնարավորությունը մեր կողմից բացառվում է: Մեթիոնինի յուրացման հատկության ձեռք բերումը *C. guilliermondii* ժառանգական մյուս հատկանիշների վրա չի ազդում:

Ստացված արդյունքները վկայում են, որ նշված կուլտուրաների կողմից թրեոնին և մեթիոնին յուրացնելու հատկությունը ձեռք է բերվում համապատասխան ամինաթթվի առկայությամբ, որը տվյալ դեպքում ծառայում է որպես սուլֆիդի սուրստրատ:

C. chevalieri կողմից թրեոնին յուրացնելու հատկության հետադարձելիության ստուգումը հաստատեց մեր ենթադրությունը: Հետադարձ ադապտացիան իրականացվել է ադապտացված կուլտուրան ամոնիակ սուլֆատ պարունակող ազարե միջավայրում փոխացանքսեր կատարելու միջոցով և ա-

վարտվել է XV պատժում: Իսկ *C. guilliermondii* կողմից մեթիոնին յուրացնելու հատկությունը, պարզվեց, որ հետադարձ չէ անգամ XXI պատժում: Ատացված տվյալները ցույց են տալիս, որ հետազոտված կուլտուրաները թրեոնինի և մեթիոնինի նկատմամբ ադապտացվելու մեխանիզմի տեսակետից միմյանցից տարբերվում են:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 Ю. Н. Карасевич, Микробиология, т. 27, 2, 145 (1958). 2 М. А. Тер-Каралетян, А. А. Элизян, ДАН Арм. ССР, т. 40, № 3 (1965). 3 S. Pomper, J. Bact., 65, 6, 666 (1953). 4 R. Pietruszko, L. Fowden, Annals of Bot., 25, 100, 491 (1961). 5 М. А. Тер-Каралетян, С. М. Инджикян, ДАН Арм. ССР, т. 48, № 2 (1969). 6 М. А. Тер-Каралетян, С. М. Инджикян, С. В. Чубарян, Биол. журн. Армении, т. 21, 1, 3 (1968). 7 Е. В. Щербакова, Тр. Одес. технол. и-та пищ. пром., т. 9, 2 (1959). 8 М. А. Тер-Каралетян, Е. Н. Макарова, «Известия АН Арм. ССР» (биол. науки), т. 16, 5, 15 (1963).