

ТРАНСПОРТ АММОНИЯ У ДРОЖЖЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЖИРНО-КИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ

А. А. ЕФРЕМЕНКО, А. П. БЕЛОВ

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Ингибирование церуленином синтеза жирных кислот в дрожжах *C. blankii* и введение экзогенных жирных кислот позволяют в значительной степени изменить жирно-кислотный состав липидов. Модификация липидного состава приводила к изменениям кинетики транспорта аммония (^{14}C -метиламина). Предполагается, что жирно-кислотный состав мембран во многом определяет температурный максимум роста культуры дрожжей.

Термотолерантность микроорганизмов остается в наше время мало изученным явлением. Она весьма широко распространена у одноклеточных грибов, но довольно редко встречается у дрожжей [2]. Термофилия и термотолерантность у грибов связаны с их способностью синтезировать длинноцепочечные (C_{20} и более) жирные кислоты, количество которых с повышением температуры культивирования возрастает, что позволяет поддерживать функциональную способность мембран [6]. В дрожжах же длинноцепочечные жирные кислоты (свыше C_{18}) практически отсутствуют [8].

Показано [1], что функционирование транспортных систем аммония, локализованных в плазматической мембране, зависит от состава липидов. Следовательно, кинетические параметры транспорта аммония (метиламина) в клетку могут служить в определенной степени интегральными характеристиками плазматической мембраны. Целью настоящей работы явилось изучение изменения липидного состава дрожжей при внесении в питательную среду экзогенных жирных кислот на фоне ингибирования их синтеза и определение кинетических параметров транспорта аммония.

МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовали термотолерантные дрожжи *Candida blankii* и *Candida rugosa* из коллекции института ВНИИсинтез-белок. Дрожжи выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 50 мл питательной среды до середины экспоненциальной фазы роста. Состав питательной среды следующий (г/л): глюкоза — 10, Na_2HPO_4 — 3,4, KH_2PO_4 — 6,8, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 10, MgSO_4 — 0,7 с добавлением типовых микроэлементов и биотина [1]. Церуленин вносили в среду из расчета его конечной концентрации 2 мкг/мл,

а экзогенные жирные кислоты — 0,2%. При добавлении в питательную среду жирных кислот использовали детергент Бридж 58 (соотношение кислота:детергент — 1:3). Культивирование проводили при температурах 39 и 30 °С (в зависимости от условий эксперимента).

Фракционирование липидов на клас-сы осуществляли методом препаративной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках фирмы Мерк в системе гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1,5). Состав жирных кислот культуры анализировали методом газожидкостной хроматографии [3].

Для построения кривых Аррениуса клетки инкубировали при температурах от 2 до 44 °С с шагом в 3 °С в MES-Tris буфере (рН 6,5) при концентрации ¹⁴С-метиламина 70 мкм. При каждой заданной температуре фиксировалась динамика накопления клетками

¹⁴С-метиламина с целью определения скорости мембранного транспорта.

Радиоактивность фракций липидов измеряли жидкостно-сцинтилляционным методом на радиометре «ЛКВ-1219» (Швеция) с использованием кривых гашения для ¹⁴С.

Результаты

При определении влияния липидного состава мембран на их функциональные свойства в питательную среду добавляли экзогенные жирные кислоты для модификации жирно-кислотного состава липидов дрожжей и антибиотик церуленин, который специфически блокирует синтез жирных кислот [4, 5]. Из табл. 1 видно, что липиды термотолерантных дрожжей характеризуются низким (менее 1 %) содержанием пальмитолеиновой кислоты. Ингибирование нативного синтеза жирных кислот церуленином и введение в среду роста пальмитиновой кислоты (C_{16:0}) приводили к значительному снижению в составе липидов доли олеиновой кислоты (C_{18:1}), не оказывая при этом влияния на содержание линолевой кислоты (C_{18:2}). Внесение экзогенной олеиновой кислоты сопровождалось снижением доли линолевой кислоты и резким снижением доли пальмитата в составе липидов. Обогащение липидов дрожжей пальмитиновой или олеиновой кислотой не влияло на содержание пальмитолеиновой кислоты, присутствующей у *S. blankii* в следовых количествах (<1 %).

Таким образом, ингибирование синтеза жирных кислот в дрожжах *S. blankii* и внесение экзогенных жирных кислот не приводило к появлению в составе липидов пальмитолеиновой кислоты. Однако последняя присутствовала в термотолерантных дрожжах *S. rugosa*, температурный максимум роста которых несколько ниже.

Таблица 1

Жирно-кислотный состав липидов термотолерантных дрожжей *S. blankii* и *S. rugosa*, выращенных при 39 °С

Условия культивирования	Содержание кислоты, %						
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{16:2}	C _{17:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}
<i>S. blankii</i>							
Контроль	14,2	0,95	1,30	0,80	1,60	59,4	21,7
	± 1,2	± 0,08	± 0,20	± 0,2	± 0,2	± 0,7	± 0,5
Церуленин + C _{16:0}	61,8	0,65	0,95	Сл.	1,40	13,1	22,1
	± 2,8	± 0,21	± 0,20		± 0,30	± 0,9	± 0,4
Церуленин + C _{18:1}	1,80	Сл.	Сл.	0,70	Сл.	88,1	9,30
	± 0,40			± 0,19		± 4,1	± 1,30
<i>S. rugosa</i>							
Контроль	22,3	16,4	3,80	Сл.	2,10	29,7	26,0
	± 1,4	± 0,9	± 0,90		± 0,20	± 2,3	± 0,9

Примечание. C_{16:0} — пальмитиновая, C_{16:1} — пальмитолеиновая, C_{16:2} — гексадекановая, C_{17:0} — маргариновая, C_{18:0} — стеариновая, C_{18:1} — олеиновая, C_{18:2} — линолевая.

Таблица 2

Состав липидов дрожжей *S. blankii*, выращенных в условиях, влияющих на липидный обмен

Фракция липидов	Контроль, ^{14}C -глюкоза		Церулений + $(1-^{14}\text{C})-\text{C}_{16}$		Церулений + $(1-^{14}\text{C})-\text{C}_{18}$		Церулений + ^{14}C -глюкоза + C_{16}	
	%	расп/мин \times мкг	%	расп/мин \times мкг	%	расп/мин \times мкг	%	расп/мин \times мкг
ФЛ	53,0	258 \pm 42	2,8	18 \pm 10	19,2	85 \pm 12	10,9	832 \pm 64
МАГ	1,7	8 \pm 2	2,6	17 \pm 4	4,5	20 \pm 3	2,8	208 \pm 24
ДАГ	1,8	9 \pm 3	2,2	14 \pm 4	1,9	8 \pm 3	3,8	29 \pm 7
СТ	12,2	60 \pm 10	2,6	17 \pm 4	15,9	55 \pm 7	22,2	1700 \pm 99
ЖК	3,2	16 \pm 4	16,0	104 \pm 12	12,6	56 \pm 11	9,0	720 \pm 84
X	2,2	11 \pm 3	13,6	88 \pm 9	5,0	22 \pm 4	6,0	480 \pm 51
ТАГ	17,7	86 \pm 11	52,0	338 \pm 49	4,7	21 \pm 6	26,6	2020 \pm 94
В	3,5	17 \pm 4	1,4	9 \pm 4	13,5	60 \pm 8	8,0	640 \pm 85
ЭСТ	2,3	11 \pm 4	4,6	30 \pm 5	22,7	56 \pm 7	10,6	848 \pm 82

Примечание. ФЛ — фосфолипиды, МАГ — моноацилглицерины, ДАГ — диацилглицерины, СТ — стерины, ЖК — жирные кислоты, X — неидентифицированное пятно, ТАГ — триацилглицерины, В — воска, ЭСТ — эфиры стеринов.

В условиях ингибирования синтеза жирных кислот наблюдались определенные изменения состава общих липидов клеток дрожжей (табл. 2). Так, экзогенная пальмитиновая кислота включалась в триацилглицерины (ТАГ). Синтез ТАГ при этом усиливался, о чем судили по увеличению включения в ТАГ меченого углерода из глюкозы. В то же время экзогенная меченая олеиновая кислота по сравнению с пальмитиновой стимулировала включение меченого углерода в эфиры стеринов. При этом синтез стеринов не возрастал, в связи с чем можно предположить, что эфиры стеринов образуются преимущественно из ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, необходимо отметить, что Δ^{12} -десатураза олеиновой кислоты и Δ^{12} -десатураза пальмитиновой кислоты не различались, следовательно, в дрожжах одновременно могут присутствовать две независимые десатуразы. Эти сведения согласуются с литературными данными [7].

Выявленные изменения в жирно-кислотном составе липидов, обусловленные модификацией экзогенными жирными кислотами, нуждаются в дальнейшем изучении.

Установлено [1], что транспорт метиламина зависит от липидного состава мембран. Поэтому для характеристики функционального состояния мембран дрожжей *in vivo* использовали кинетические характеристики транспорта метиламина и зависимость транспорта от температуры (кривые Аррениуса). Из приведенных в табл. 3 и на рис. 1 данных следует, что обогащение липидов дрожжей *S. blankii* пальмитиновой кислотой не сопровождалось значительными изменениями K_m (460 и 430 мкм соответственно в контроле и при добавлении кислоты). Однако при этом уменьшалось значение V_{max} (с 71 мкмоль \cdot мин $^{-1} \cdot$ мг $^{-1}$ в конт-

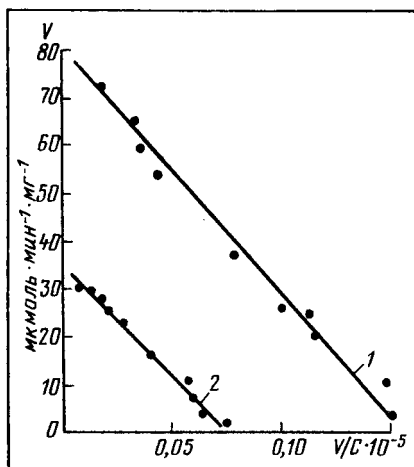
Кинетика транспорта метиламина в клетки дрожжей

Концентрация ^{14}C -метиламина, мкмоль	Скорость транспорта метиламина, мкмоль·мин $^{-1}$ ·мг $^{-1}$	
	Контроль	Церулений + C_{16}
20	2,97 ± 0,19	1,46 ± 0,29
60	8,23 ± 0,33	4,02 ± 0,41
120	14,8 ± 1,2	7,17 ± 0,64
200	21,6 ± 1,8	10,4 ± 1,1
400	33,3 ± 2,7	15,8 ± 1,4
1000	49,0 ± 3,1	22,9 ± 1,9
1500	54,8 ± 4,2	25,5 ± 1,6
2000	58,3 ± 5,6	27,0 ± 1,7
3200	—	28,9 ± 2,7
4000	64,3 ± 6,3	29,6 ± 2,7
Коэффициент корреляции	0,97	0,99

рольных клетках до 32 мкмоль·мин $^{-1}$ ·мг $^{-1}$ в клетках, обработанных церуленином). Таким образом, уменьшение длины цепи жирных кислот в мембранах дрожжевой клетки сопровождается снижением активности транспортных систем аммония.

Для получения более полной картины зависимости транспорта метиламина от состояния липидов мембран были построены кривые

Рис. 1. Поглощение ^{14}C -метиламина клетками дрожжей *S. blankii* при различных условиях липидного обмена.



1 — контроль, $V_{\text{max}} = 71,7$ мкмоль·мин $^{-1}$ × мг $^{-1}$, $K_m = 0,46 \cdot 10^{-3}$ М; 2 — обогащение пальмитиновой кислотой, $V_{\text{max}} = 32,8$ мкмоль·мин $^{-1}$ ·мг $^{-1}$, $K_m = 0,43 \times 10^{-3}$ М.

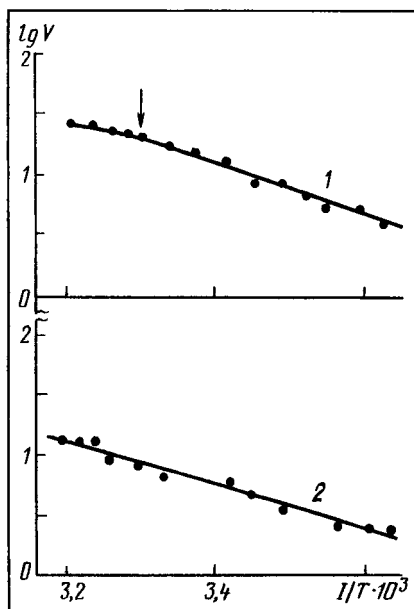


Рис. 2. Зависимость Аррениуса транспорта метиламина у дрожжей *S. blankii*, выращенных в различных условиях липидного обмена.

1 — контроль; 2 — церулений + C_{16} .

Аррениуса в интервале температур от 2 до 44 °С, выращенных в условиях обогащения пальмитиновой кислотой (рис. 2, 1). У контрольных клеток точки температурного излома отмечены при $30,0 \pm 0,5$ °С. Однако в мембранах клеток дрожжей, обогащенных пальмитиновой кислотой, фазового перехода в данном интервале температур не обнаружено (рис. 2, 2). Полученные данные согласуются с аналогичными данными для дрожжей *C. blankii*, выращенных при пониженной температуре (30 °С) [1]. Отсутствие термотропного перехода может свидетельствовать о неизменном состоянии липидов, окружающих данный фермент в плазматической мембране. Следовательно, дрожжи с повышенным содержанием С₁₈-жирных кислот обладают определенными преимуществами в плане термостабильности мембран.

Заключение

Совместное введение в питательную среду церуленина и жирных кислот позволяет желаемым образом модифицировать жирно-кислотный состав липидов дрожжей, обогащая их соответствующими жирными кислотами и значительно изменяя свойства плазматической мембраны. С₁₈-кислоты термотолерантных дрожжей обуславливают более высокую с точки зрения термоустойчивости структуру мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Градова Н. Б., Белов А. П., Гусельникова Т. В. Радиондикаторное изучение влияния азотсодержащих соединений на транспорт аммония и метаболизм белка у мезофильных штаммов дрожжей. — Деп. в ВНИИЦ 5 января 1989 г., № 02.89.0.005677. — 2. Иннис У., Ингрэм Д. Жизнь микроорганизмов при низких температурах. — Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981, с. 114—117. — 3. Султанович Ю. А., Нечаев А. П., Грамолин С. Л. и др. Хроматографический анализ жиров и масел. —

Прикладная газовая хроматография (медицина, фармация, продукты питания, виноделие, хроматографические материалы). Тбилиси, 1985, с. 70—81. — 4. Daum G., Gamberith G., Palttauf G. — Biochim. et Biophys. Acta, 1979, vol. 573, p. 413—415. — 5. Greenspan M. D., Mackow R. C. — Lipids, 1977, vol. 12, p. 729—731. — 6. Hammonds P., Smith S. H. — Trans. Br. Mycol. Soc., 1986, vol. 86, N 4, p. 551—560. — 7. Kasai R., Yamada T., Hasegawa I. a. o. — Biochim. et Biophys. Acta, 1985, vol. 836, p. 397—401. — 8. Weet J. D. N.-Y.: Plenum Press, 1980, p. 1—179, 300—316.

Статья поступила 1 декабря 1989 г.

SUMMARY

Inhibition by cerulenin of fatty acids synthesis in *C. blankii* yeasts and introduction of exogenic fatty acids allowed to change considerably the fat-acid composition of lipids. Modification of lipid composition resulted in variations in ammonium (¹⁴C-methylamine) transportation kinetics. It is supposed that fat-acid composition of membranes defines to a large extent the temperature maximum of yeast growth.