

УДК 576.8.095.3+621.039.85

ОБНОВЛЕНИЕ УГЛЕРОДА У ДРОЖЖЕЙ В УСЛОВИЯХ АЗОТНОГО ГОЛОДАНИЯ

А. Г. СИУШЕВА, Е. Г. ДАВИДОВА, В. В. РАЧИНСКИЙ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Ранее нами было показано, что во время роста дрожжей в статических условиях существенного обновления углерода биомассы не происходит [5]. Общий фонд углерода дрожжевой популяции отличается высокой степенью стабильности. За период одной генерации (4 ч) деградирует только 2,5 % углерода биомассы дрожжей. Весьма устойчивыми оказались все основные группы ее органических компонентов [6]. За 6 ч роста при наличии всех питательных элементов не удалось обнаружить заметной деградации основных компонентов биомассы и вывода углерода сформировавшихся ранее клеток в окружающую среду. Отсутствовал также и интенсивный обмен углерода между исследованными группами веществ, в том числе между белками и общим фондом аминокислот клетки. Исключение из питательной среды азота, согласно нашим данным [5], а также данным других авторов [8, 9], приводит к повышению интенсивности деградации органических компонентов биомассы. Например, зафиксирована значительная деградация белка у одноклеточных [1, 9]. Показано, что в таких условиях увеличивается активность протеиназ дрожжевой клетки [7]. Давно существует мнение, что при отсутствии азота в питательной среде одноклеточные организмы могут использовать азот фонда аминокислот клетки. Поэтому представляло интерес проследить обновление углерода основных групп органических компонентов дрожжевой клетки при азотном голодании.

Для этой цели нами изучалось изменение содержания меченого углерода в основных группах органических компонентов дрожжевой биомассы во время инкубации предварительно выращенных на 1-6-¹⁴C-глюкозе дрожжей в жидкой питательной среде, содержащей немеченую глюкозу, при наличии или отсутствии азота в среде, а также накопление меченого углерода в исследуемых группах веществ при инкубации немеченых дрожжей с меченой ¹⁴C глюкозой.

Методика

Дрожжи *Candida guilliermondii* выращивали в стационарных условиях в жидкой питательной среде следующего минерального состава: K₂SO₄—0,2; NH₄H₂PO₄—3; (NH₄)₂HPO₄—0,5; MgSO₄—0,2 г; CuSO₄—0,08 мг; KJ—0,2; FeCl₃—0,4; MnSO₄—0,8; NaMoO₄—0,4, ZnSO₄—0,8 мг в 1 л H₂O. Источником углерода служила глюкоза (1,5 % по массе), pH среды 5,5, температура 32°, время выращивания 24 ч. Полученные дрожжевые клетки тщательно отделяли от питательной среды центрифугированием, отмывали и переносили в инкубационные колбы. Минеральный состав среды инкубации был в контроле аналогичен указанному выше составу питательной среды дрожжей, а в опытных вариантах NH₄H₂PO₄ и (NH₄)₂HPO₄ были заменены KN₂PO₄ и K₂HPO₄, т. е. в среде инкубации этого варианта азот отсутствовал. Инкубацию проводили в тех же условиях, что и при выращивании дрожжей. В том случае, когда исследовали обновление углерода, дрожжи культивировали на меченой ¹⁴C глюкозе, а в инкубационную среду вносили немеченую глюкозу в той же концентрации или вообще не вносили источник углерода. Для определения уровня синтеза органических компонентов биомассы в выбранных условиях инкубации дрожжи выращивали на немеченой глюкозе, а в среду инкубации вносили меченую глюкозу. Использовали 1-6-¹⁴C-глюкозу производства фирмы «Изотоп». Удельная активность углерода глюкозы составляла 198000 ± ±1200 расп/мин на 1 мг.

Во время инкубации определяли содержание меченого углерода в основных группах органических компонентов биомассы: высокомолекулярных компонентах-белках, нуклеиновых кислотах и полисахаридах, в фонде аминокислот, липидах органических кислотах и углеводах, а также в индивидуальных компонентах фонда аминокислот.

Фракционирование биомассы дрожжей проводили по описанной ранее методике [4]. Для разделения аминокислот использовали метод тонкослойной ионообменной хроматографии на пластинах Фиксион согласно рекомендациям [3]. Радиоактивность полученных фракций устанавливали при помощи радиометра Марк II. Для этой цели все фракции растворяли в соответствующих растворителях, отбирали аликвоты по 0,1 мл, которые вносили в сцинтиллятор, приготовленный на основе диоксана, и их использовали для измерения радиоактивности. Радиоактивность определяли в абсолютных единицах (расп/мин) по стандартным кривым гашения. Расчет производили при помощи компьютера ПДС-3, присоединенного к радиометру.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные о распределении меченого углерода между основными группами органических компонентов дрожжевой биомассы во время инкубации дрожжей, предварительно выращенных на 1-6-¹⁴С-глюкозе, в среде, содержащей немеченую глюкозу. Они свидетель-

ствуют о том, что при наличии в питательной среде источника углерода и полного набора необходимых минеральных компонентов уровень общей активности ¹⁴С в исследуемых фракциях остается постоянным. Это означает, что существенной деградации органических компонентов биомассы уже сформировавшихся клеток, а также перераспределения углерода между этими фракциями не происходит, т. е. интенсивное обновление углерода выросших на меченой глюкозе дрожжевых клеток отсутствует.

Однако, как видно из данных табл. 1, лимит азота приводит к снижению уровня активности ¹⁴С во фракции высокомолекулярных веществ на 29 %. Обнаружена также тенденция к уменьшению активности во фракции «свободных» аминокислот на более поздних стадиях инкубации (после 5 ч). Снижение содержания ¹⁴С в высокомолекулярных веществах сопровождается увеличением его содержания во фракции липидов (активность ¹⁴С в последнем случае достигает 26 %). Следовательно, в условиях азотного голодания имеет место деградация высокомолекулярных веществ, основная доля которых входит в состав

Т а б л и ц а 1

Изменение содержания меченого углерода во время инкубации ¹⁴С-дрожжей в зависимости от наличия в среде азота и источника углерода

Время, ч	Биомасса, мг/мл	Высокомолекулярные вещества		Аминокислоты		Липиды		Углеводы + органические кислоты		
		расп/мин	%	расп/мин	%	расп/мин	%	расп/мин	%	
Среда с азотом и глюкозой										
0	1,60	100 340 ±1200	58,9	18 640 ±720	10,9	12 890 ±150	7,57	38 420 ±540	22,6	
5	2,85	100 400 ±950	56,5	21 620 ±530	12,2	14 160 ±120	8,0	41 510 ±640	23,4	
24	4,60	100 410 ±1200	58,0	19 250 ±660	11,3	14 510 ±180	8,5	36 700 ±650	21,4	
Среда без азота с глюкозой										
0	1,58	98 720 ±1300	58,0	16 780 ±1100	9,87	13 100 ±160	7,70	41 320 ±890	24,3	
5	3,38	77 240 ±1100	50,2	17 480 ±1000	11,3	15 740 ±180	10,2	43 580 ±820	28,3	
24	4,83	69 690 ±1000	49,6	14 240 ±1000	10,1	16 480 ±170	11,7	39 930 ±790	28,5	
Среда с азотом без глюкозы										
0	1,62	97 670 ±1400	57,6	17 780 ±730	10,6	11 990 ±530	7,08	42 000 ±640	24,8	
5	1,34	86 200 ±1100	55,2	18 040 ±590	11,6	11 560 ±160	7,40	40 360 ±660	25,8	
24	1,66	79 420 1 400	54,6	16 900 1 000	11,6	11 580 200	7,96	37 580 530	25,8	
Среда без азота и глюкозы										
0	1,60	96 530 ±1200	57,3	18 000 ±1100	10,7	11 870 ±160	7,04	42 020 ±850	24,9	
5	1,56	74 260 ±1100	54,0	17 360 ±990	12,6	10 200 ±160	7,42	35 830 ±780	26,0	
24	1,65	72 340 ±1500	54,7	17 960 ±1300	13,5	9 790 ±280	7,40	32 300 ±580	24,4	

Содержание ^{14}C в индивидуальных аминокислотах общего пула ^{14}C -дрожжей после 5-часовой инкубации в среде с меченой глюкозой или без нее

Аминокислоты	Среда с глюкозой				Среда без глюкозы			
	с азотом		без азота		с азотом		без азота	
	расп/мин	%	расп/мин	%	расп/мин	%	расп/мин	%
Аргинин	1450±35	6,7	1960±110	11,2	685±22	3,8	1232±70	7,1
Гистидин	2790±68	12,9	1398±80	8,0	1370±44	7,6	1350±77	7,8
Лизин	1690±41	7,8	1240±71	7,1	667±22	3,7	1128±64	6,5
Фенилаланин+								
+ тирозин	1990±49	9,2	1835±100	10,5	1298±42	7,2	1090±62	6,3
Лейцин	1550±31	7,18	880±51	5,06	1080±35	6,03	763±43	4,4
Метонин	1016±24	4,7	680±39	3,9	1260±41	7,0	416±24	2,4
Валин	800±19	3,7	540±31	3,1	990±32	5,5	677±39	3,9
Аланин+глицин	2720±67	12,6	1130±65	6,45	3626±120	20,1	920±52	5,3
Глутаминовая+								
+треонин+серин	4780±110	22,1	3670±210	21,0	5320±170	29,5	5225±290	30,1
Аспарагиновая	1820±44	8,4	2430±14	13,9	1150±38	6,4	3490±190	20,1
	950±23	4,4	1750±100	10,0	577±19	3,2	1080±61	6,2
Сумма	21620±530	100	17840±1000	100	18040±590	100	17360±990	100

белка клетки (до 70 %). Эти данные согласуются с выводами других авторов, что у одноклеточных при азотном голодании деградации подвергается 20—30 % общего белка клетки, а не менее 70 % белка клетки в любых условиях остается стабильным. При деградации высокомолекулярных веществ культура, очевидно, обеспечивается необходимым количеством азота, о чем свидетельствует тот факт, что в условиях среды без азота при высокой исходной концентрации биомассы (1,58 мг/мл) ее прирост такой же, как и в контроле (наличие азота в среде). Биомасса в обоих случаях увеличилась в 3 раза.

При отсутствии источника углерода в среде инкубации процесс существенно меняется (табл. 1). Прежде всего не наблюдается прироста биомассы, ее концентрация в среде остается без изменения. Это означает, что культура переходит в так называемое «состояние покоя». При наличии всех необходимых минеральных питательных элементов в среде инкубации отсутствие углерода приводит к некоторому снижению уровня активности ^{14}C во всех исследуемых фракциях. Оно, однако, составляет не более 18 %, причем существенного изменения относительного содержания меченого углерода фракции не наблюдается. Отсутствие азота в среде и в данном случае способствует деградации высокомолекулярных веществ, а также снижению активности ^{14}C во фракции липидов и углеводов. Не затрагивается только фонд аминокислот. Это означает, что фонд аминокислот, очевидно, не может использоваться клеткой как запасной фонд азота или углерода. Кроме того, следует отметить, что интенсивность деградации высокомолекулярных веществ, обусловленная отсутствием азота в питательной среде, на фоне углеродного голодания несколько ниже, чем при наличии источника углерода в среде инкубации. Этот факт

также свидетельствует, что некоторые компоненты высокомолекулярной фракции могут служить в качестве источника азота для новых биосинтезов. Они, однако, не могут использоваться клеткой как источник углерода для биосинтеза, а скорее всего участвуют только в энергетическом обмене для обеспечения минимума энергии, необходимой для сохранения жизнеспособности клетки.

При отсутствии азота и углерода в питательной среде в выбранных нами условиях инкубации уровень активности ^{14}C в фонде аминокислот существенно не меняется. Но вместе с тем отмечается значительное изменение относительного содержания меченых ^{14}C аминокислот, содержащихся в этом фонде (табл. 2). Азотное голодание приводит к значительному (в 2 раза) снижению содержания аланина. Уменьшается также количество валина, лейцина и гистидина, но в меньшей степени. Содержание аспарагиновой кислоты и аргинина увеличивается, а глутаминовой кислоты остается практически неизменным. Аналогичная картина наблюдается и при отсутствии источника углерода. В этих условиях степень снижения содержания ^{14}C -аланина и степень повышения содержания ^{14}C -аспарагиновой кислоты в варианте среды без азота значительно увеличиваются. Обнаруженное перераспределение меченого углерода между индивидуальными аминокислотами фонда клетки, вызываемое отсутствием азота в среде, возможно, свидетельствует о появлении дополнительных путей синтеза аминокислот, например, образования аргинина и аспарагиновой кислоты из аланина. Можно предположить, что дополнительный синтез аминокислот из аланина вызван тем, что количество азота, который высвобождается при деградации высокомолекулярных веществ, недостаточно для нового синтеза компонентов фонда аминокислот, а также аминокислот, необ-

Накопление меченого углерода при инкубации дрожжей с 1-6-¹⁴C-глюкозой
в зависимости от наличия азота в среде

Время, ч	Био- масса, мг/мл	Высокомолекуляр- ные вещества		Аминокислоты		Липиды		Углеводы + органи- ческие кислоты	
		расп/мин	%	расп/мин	%	расп/мин	%	расп/мин	%
Среда с азотом (начальная биомасса 1,45 мг/мл)									
5	2,44	250 400	42,2	72 620	12,3	20 400	3,44	249 000	42,0
		±1600		±4400		±190		±2600	
24	3,16	502 700	66,0	71 720	9,42	34 140	4,49	152 600	20,0
		±2100		±4300		±310		±2300	
Среда без азота (начальная биомасса 1,54 мг/мл)									
5	2,47	126 730	22,8	48 910	8,80	21 350	3,84	358 500	64,0
		±800		±2900		±190		±5300	
24	3,22	347 400	47,9	58 050	8,0	45 800	6,31	274 550	37,8
		±1700		±3500		±420		±4100	

ходимых для построения новых белковых молекул. В таком случае следует ожидать существенного изменения в направленности биосинтетических процессов при отсутствии азота в питательной среде.

Для проверки этого предположения исследовали синтез основных групп органических компонентов дрожжевой биомассы при отсутствии азота в среде инкубации. Условия были такими же, как при изучении обновления углерода органических компонентов биомассы дрожжей, т. е. в данном случае мы рассматривали вторую сторону процесса — прослеживали путь углерода при использовании немеченого его источника.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что отсутствие азота в питательной среде действительно сильно меняет направленность биосинтетических процессов (табл. 3 и 4). Несмотря на то, что в наших условиях отсутствие азота не сказывалось на размерах прироста биомассы (табл. 3), оно приводило к существенному снижению синтеза высокомолекулярных ве-

ществ и аминокислот, входящих в общий фонд аминокислот клетки. В то же время пропорционально увеличивалась интенсивность синтеза липидов, углеводов и органических кислот. Использование питательной среды без азота, как видно из данных табл. 4, обусловило значительное уменьшение интенсивности синтеза и уровня накопления практически всех аминокислот, составляющих аминокислотный фонд клетки, за исключением глутаминовой кислоты и лейцина, в результате их относительное содержание в фонде сильно увеличивалось.

Следует обратить внимание на факты сохранения уровня синтеза глутаминовой кислоты в условиях азотного голодания, а также ее наличия в фонде ранее сформировавшихся клеток, о чем свидетельствуют данные, полученные при исследовании обновления углерода аминокислот (табл. 2). Можно предположить, что назначение глутаминовой кислоты в фонде дрожжевой клетки не исчерпывается только тем, что она является предшественником в синтезе

Таблица 4

Включение ¹⁴C в индивидуальные аминокислоты пула дрожжей после их инкубации
с 1-6-¹⁴C-глюкозой в течение 5 ч

Аминокислоты	Среда с азотом		Среда без азота	
	расп/мин	%	расп/мин	%
Аргинин	4066±250	5,63	1470±87	3,0
Гистидин	6100±370	8,4	978±58	2,02
Лизин	3780±230	5,2	782±46	1,62
Фенилаланин+тирозин	6608±400	9,1	1610±95	3,3
Лейцин	3560±220	4,9	3030±180	6,2
Метионин	1160±70	1,6	684±41	1,4
Валин	2900±180	4,0	830±49	1,7
Аланин+глицин	11330±690	15,6	5040±290	10,3
Глутаминовая+треонин+серин	21700±1300	29,8	23180±1400	47,4
Аспарагиновая	7625±640	10,5	5480±320	11,2
χ	3480±210	4,8	5820±350	11,9
Сумма	72620±4400	100	48910±2900	100

других аминокислот, эта кислота имеет и какую-то другую функцию.

Таким образом, отсутствие азота в питательной среде вызывает деградацию высокомолекулярных компонентов дрожжевой клетки. Деградирует, однако, не более 30 % высокомолекулярных веществ, в том числе белков клетки. Существенного снижения уровня фонда аминокислот клеток, сформировавшихся до азотного голодания, не наблюдается. Имеет место только изменение относительного содержания его компонентов — значительно снижается содержание аланина, валина, лейцина и увеличивается — аспарагиновой кислоты и аргинина. Содержание глутаминовой кислоты остается постоянным. Наличие перераспределения меченого углерода между аминокислотами фонда при незначительном снижении содержания меченого углерода в самом фонде позволяет заключить, что в условиях отсутствия азота в питательной среде возникают процессы, направленные на обеспечение какого-то необходимого уровня аминокислот в самом фонде, например, синтез аспарагиновой кислоты и аргинина из аланина и др. Исходя из этих, а также полученных ранее данных [2] о наличии интенсивного обмена аланина, локализованного в вакуолях, можно предположить, что отмеченные процессы обусловлены необходимостью обеспечения определенного уровня вакуолярного фонда аминокислот клетки.

Отсутствие азота в питательной среде существенно меняет направленность биосинтетических процессов клетки — снижается интенсивность синтеза высокомолекулярных веществ и фонда аминокислот и увеличивается интенсивность синтеза липидов и фонда углеводов и органических кислот. Оно приводит к резкому уменьшению синтеза всех аминокислот, входящих в состав аминокислот фонда клетки, за исключением глутаминовой кислоты. Это указывает на особую роль последней в метаболизме углерода дрожжевой клетки. Основная часть аминокислот общего фонда клетки не только в нормальных условиях роста, но и при азотном и углеродном голо-

дании не используется клеткой для новых синтезов высокомолекулярных веществ, в том числе белков. Они не могут служить в условиях азотного голодания компенсирующим источником азота. В качестве такого источника клетка, очевидно, использует какую-то фракцию высокомолекулярных веществ, возможно, некоторых белков или других азотсодержащих веществ. Накопления меченого углерода в общем аминокислотном фонде клетки вследствие деградации высокомолекулярных компонентов не наблюдается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакалкин Г. Я., Кальнов С. Л., Зубатов А. С., Лузиков В. И. Дегградация внутриклеточных белков на разных фазах роста дрожжей *S. cerevisiae*. — Биохимия, 1976, т. 41, № 6, с. 1121—1125.
2. Белов А. П., Давидова Е. Г. Исследование субклеточной компартиментализации аминокислот у дрожжей. — Тез. докл. I Всесоюз. биохимич. съезда. Л.: Наука, 1979, т. 3, с. 7. — 3. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1973. — 4. Кретова Л. Г., Давидова Е. Г. Радиометрический контроль баланса углерода при фракционировании биомассы дрожжей. — Изв. ТСХА, 1976, вып. 6, с. 22—26. — 5. Рачинский В. В., Давидова Е. Г., Кретова Л. Г. Исследование метаболического изотопного обмена углерода в системе «биомасса—среда с углеводородом». — Изв. АН СССР, сер. биол., 1973, вып. 1, с. 80—85. — 6. Рачинский В. В., Давидова Е. Г., Кретова Л. Г. Исследование обновления органических фракций дрожжей в логарифмической фазе роста. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1978, вып. 5, с. 786—790. — 7. Holser H. — Acta biol. et med. ger., 1977, vol. 36, N 5, p. 1523—1539. — 8. Pine M. I. — J. Bact., 1970, vol. 103, N 1, p. 207—212. — 9. Saheki T., Holser H. — Biochim. et biophys. acta, 1975, vol. 384, N 1, p. 203—215.

Статья поступила 28 июля 1982 г.

Summary

Absence of nitrogen in nutritive substrate increases the intensity of degradation of highmolecular components of yeast biomass. Decrease in general resource of aminoacids is not observed, but relative content of its components changes. During nitrogenous hunger the direction of the biosynthesis processes changes considerably: the intensity of synthesis of biopolymers and aminoacids gets lower, and the synthesis of lipids, carbohydrates and organic acids increases. The bulk of carbon of aminoacids general resource cannot be used for new synthesis of biopolymers.