

УДК 576.314:621.039.85

**СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ
В УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ ДРОЖЖАХ В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ**

Т. В. ГУСЕЛЬНИКОВА, А. П. БЕЛОВ

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Показано, что добавка в среду культивирования дрожжей рода *Candida* смесей, содержащих аминокислоты и пептиды, приводит к увеличению содержания белка в клетке. Наибольшие изменения в содержании белка и свободных аминокислот обусловлены присутствием низкомолекулярных пептидов.

Дрожжи способны утилизировать ряд азотсодержащих соединений — нитраты, нитриты, аммиак, мочевины, аминокислоты, пептиды, амины, пуриновые и пиримидиновые основания [8]. Известно, что количество общего белка клетки определяется природой используемого штамма и зависит от условий культивирования [5]. При росте на различных источниках азота дрожжи синтезируют разное количество белка, причем большее, если соединения азота хорошо ассимилируемые [6]. Ранее было показано, что у дрожжей синтез белковых веществ наиболее энергично совершается при наличии в среде комбинации аминокислот [4], а наилучшим питательным субстратом для дрожжей *S. cerevisiae* является смесь ами-

нокислот, содержащаяся в пептоне или автолизате [3]. Выращивание дрожжей и грибов на средах с гидролизатом казеина в качестве источника азотного питания обеспечивает большее содержание белка в биомассе, чем выращивание их на минеральном азоте [9]. Кроме того, имеются указания, что низкомолекулярные белковые фракции обладают стимулирующим рост действием [2] и повышают синтез митохондриальных дрожжевых белков [7]. Недостаток азотного питания в среде культивирования приводит к снижению синтеза белка [5].

Целью настоящей работы было изучение возможности изменения содержания белка в биомассе углеводородокисляющих дрожжей при добавке в среду роста компонентов, содержащих пептиды и аминокислоты.

Методика

В работе использовали дрожжи *Candida maltosa* из коллекции института ВНИИсинтезбелок, характеризующиеся низким содержанием сырого протеина и истинного белка в биомассе. Дрожжи выращивали в периодической культуре до конца логарифмической фазы роста на среде $V=100$ мг, в которую входили $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 10 г/л, K_2HPO_4 — 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,7 г/л, типовые микроэлементы и биотин. В качестве источника углерода использовали октадекан в количестве 1 об. % или 1^{14}C -октадекан с удельной активностью 80 мкКи на 1 г.

В опытных вариантах аммоний в среде культивирования полностью или частично заменяли дрожжевым автолизатом, смесью аминокислот, аналогичной по их составу в дрожжевом автолизате, гидролизатом казеина, аминокислотнопептидной фракцией с молекулярной массой (ММ) меньше 500 Дн и пептидной фракцией с ММ $10^3 \dots 10^4$ Дн, взятыми нами из лаборатории комплексной переработки биомассы дрожжей ВНИИсинтезбелок.

Дрожжевые автолизаты получали из дрожжей *Candida maltosa* при выращивании их в условиях, описанных выше, в вариантах с мечеными по углероду и немечеными субстратами. Автолиз проводили в течение 14 ч при 55 °С согласно [1]. Фракционирование автолизата осуществляли на колонке сефадекса G-15 (диаметр колонки — 12 мм, высота — 1400 мм, скорость потока — 15 мл/ч, объем фракции — 2,5 мл).

В работе использовали стандартный меченый белковый гидролизат фирмы «Амершам» (США), содержащий следующие аминокислоты (мас. %): аланин — 9,5, аргинин — 6,9, аспарагиновая кислота — 10,0, глутаминовая кислота — 9,0, глицин — 5,8, изолейцин — 5,8, лейцин — 12,7, лизин — 4,8, фенилаланин — 7,4, пролин — 5,3, серин — 3,2, треонин — 5,7, тирозин — 5,8, валин — 5,9. Удельная активность аминокислот по углероду была одинаковой.

Дрожжи выращивали до конца логарифмической фазы роста, центрифугировали и дважды промывали холодной водой. Из аликвоты биомассы экстрагировали свободные аминокислоты 5 % раствором трихлоруксусной кислоты. Остаток после экстракции свободных аминокислот гидролизовали в 6 и HCl при 110 °С в течение 48 ч. После нейтрализации гидролизата 10 н. NaOH в нем определяли содержание а-аминоазота с помощью нингидрина [10]. Поскольку при гидролизе образцов биомассы происходит частичная деструкция аминокислот, в каждой партии гидролизуемых образцов содержалось несколько проб с известным количеством альбумина.

В некоторых образцах биомассы определяли содержание общего азота микрометодом Кьельдаля и истинного белка — методом Барнштейна. Содержание углерода аминокислот и пептидов в автолизате определяли с помощью тонкослойной ионообменной хроматографии на пластинках. Аликвоту раствора автолизата наносили на предварительно уравновешенную пластинку, элюировали Na -цитратным буфером ($\text{C}=0,2$; $\text{pH} = 2,5$) на высоту 15 см. Смолу с пластинки переносили в сцинтилляционные флаконы и обрабатывали 0,2 мл 12 % NH_4OH . Радиоактивность измеряли в сцинтилляторе „PCS” фирмы «Амершам» (США).

В некоторых образцах биомассы определяли содержание общего азота микрометодом Кьельдаля и истинного белка — методом Барнштейна. Содержание углерода аминокислот и пептидов в автолизате определяли с помощью тонкослойной ионообменной хроматографии на пластинках. Аликвоту раствора автолизата наносили на предварительно уравновешенную пластинку, элюировали Na -цитратным буфером ($\text{C}=0,2$; $\text{pH} = 2,5$) на высоту 15 см. Смолу с пластинки переносили в сцинтилляционные флаконы и обрабатывали 0,2 мл 12 % NH_4OH . Радиоактивность измеряли в сцинтилляторе „PCS” фирмы «Амершам» (США).

Результаты

При добавке изученных соединений в среду культивирования дрожжей объем клеток оставался неизменным. Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют о тенденции увеличения содержания белка в дрожжах в присутствии изученных соединений по сравнению с контролем. При этом наибольшие изменения обнаружены в вариантах с гидролизатом казеина и дрожжевым автолизатом (фракция аминокислот и пептидов). Искусственная смесь аминокислот и пептидная фракция с молекулярной массой больше 10^3 Дн не приводят к изменениям в содержании белка относительно контроля.

Полная или частичная замена аммонийного азота дрожжевым автолизатом¹ приводит к увеличению содержания белка в биомассе

¹ В полученных для опыта автолизатах дрожжей, выращенных на меченых и немеченых субстратах, основная масса углерода автолизата приходится (по результатам ионообменной хроматографии) на пептиды (около 40 %) и аминокислоты (около 42 %).

Содержание белка (% абсолютно сухого вещества) в биомассе дрожжей
(в числителе, сырой протеин N-6,25; в знаменателе — белок по Барнштейну)
при разном уровне азотного питания

Вариант	Концентрация N в среде культивирования, % от азота $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$			
	5	25	50	100
Контроль (100 % азота $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	—	$42,9 \pm 1,9$ $38,3 \pm 1,5$	—	—
Смесь аминокислот	$42,5 \pm 2,0$	$44,1 \pm 2,8$	—	$48,1 \pm 3,7$
	$38,5 \pm 2,9$	$40,3 \pm 2,1$	—	$40,1 \pm 3,0$
Гидролизат казеина	$43,0 \pm 1,7$	$44,5 \pm 1,8$	$46,9 \pm 1,1$	$53,1 \pm 2,5$
	$38,7 \pm 1,6$	$40,7 \pm 1,5$	$42,4 \pm 1,4$	$47,1 \pm 2,9$
Аминокислотнопептидная фракция с ММ < 500 Дн	$44,6 \pm 1,9$	$45,3 \pm 2,2$	$47,3 \pm 2,4$	$52,5 \pm 2,5$
	$40,7 \pm 2,2$	$41,4 \pm 2,0$	$43,7 \pm 2,8$	$48,8 \pm 2,4$
Пептидная фракция с ММ 10^3 — 10^4 Дн	$42,3 \pm 1,7$	$43,9 \pm 2,0$	$43,7 \pm 2,3$	$42,9 \pm 2,6$
	$38,3 \pm 2,0$	$38,5 \pm 1,8$	$39,2 \pm 2,5$	$38,9 \pm 1,9$

Примечание. Приводятся данные по трем независимым повторным опытам.

дрожжей (табл. 2). Изменения в содержании белка носят экстремальный характер. При замене 10 % минерального азота автолизатом доля белкового азота в клетке увеличивается на 9—10 %. При этом возрастает доля меченого углерода ^{14}C -октадекана, включающегося в биомассу, что может быть обусловлено окислением дезаминированных аминокислот в цикле Кребса.

Для определения влияния концентраций автолизата от 1 до 5 % на скорость биосинтеза белка мы использовали меченный ^{14}C белковый гидролизат. Полученные кинетические кривые (рис. 1) свидетельствуют, что внесение гидролизата в среду культивирования дрожжей практически не приводит к увеличению скорости белкового синтеза относительно контро-

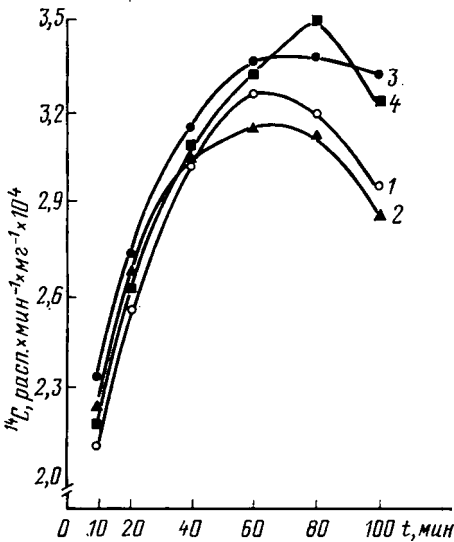


Рис. 1. Динамика включения гидролизата в белок дрожжей *Candida maltosa*.

1 — контроль (без добавок автолизата); 2, 3 и 4 — добавка автолизата в концентрации соответственно 1, 3 и 5 % от количества подаваемого в среду минерального азота.

роля. Наблюдаемые незначительные изменения могут быть обусловлены перестройкой систем транспорта и метаболизма аминокислот.

В целях выяснения действующего начала в такой многокомпонентной системе, как дрожжевой автолизат, нами было проведено его фракционирование методом гель-фильтрации (рис. 2). В подобранных нами условиях удается разделить автолизат на 4 фракции. На долю I фракции, представленной соединениями с ММ больше $1,5 \cdot 10^3$ Дн и совпадающей по объему выхода с голубым декстраном, приходится 11,8 % углерода автолизата, на долю II — 17,7, III — 60,6 и IV — 9,9 %.

Методом ионообменной хроматографии установлено, что II фракция автолизата представлена на 29,1 % пептидами и соединениями, локализующимися в зоне ами-

нокислот, но не окрашивающимися нингидрином, III фракция содержит 54,3 % пептидов и 43,9 % аминокислот, IV фракция — 78,2 % аминокислот и 17,5 % соединений, локализуемых в зоне пептидов, но также не окрашивающихся нингидрином.

Для выяснения степени усвоения полученных фракций автолизата дрожжи выращивали на среде, в которой 10 % минерального азота было заменено азотом фракций (вариант 1), или фракции автолизата добавляли в среду культивирования в количествах, пропорциональных их содержанию в автолизате (вариант 2).

Опыты показали, что фракции автолизата усваиваются дрожжами в различной степени (табл. 3). Фракция I потреблялась дрожжами в наименьшей степени, а III и IV — в наибольшей. Однако в случае проведения эксперимента по варианту 1 только 30 % углерода IV фракции автолизата включилось в биомассу. Следовательно, потребление смеси пептидов и аминокислот осуществляется более интенсивно, чем потребление аминокислот. Необходимо также изучение компонентного состава культуральной жидкости с целью идентификации метаболитов, выделяющихся в среду при потреблении аминокислот.

В табл. 4 приведены результаты опытов, в которых изучалось влияние различных фракций дрожжевого автолизата на содержание и распреде-

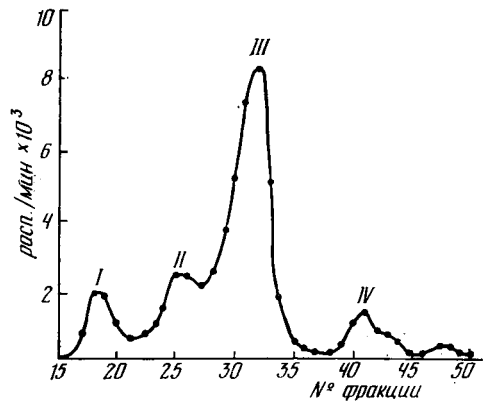


Рис. 2. Фракционирование дрожжевого автолизата на колонке с сефадексом G-15.

I—IV — фракции автолизата.

Таблица 2
Содержание и распределение аминного азота в клетках дрожжей при добавках дрожжевого автолизата (данные по трем независимым повторным опытам)

Показатель	Концентрация дрожжевого автолизата в среде. % к азоту $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$				
	1	5	10	20	100
Аминный азот, мг/г:					
белка	61,7±7,5	66,5±6,5	76,0±10,1	76,3±7,5	71,3±4,5
свободных аминокислот	14,7±2,1	12,6±2,6	7,2±0,8	7,6±1,0	6,3±0,4
суммарный	76,4	79,1	83,2	83,9	77,6
Белковый азот, % к сумме	80,8	84,1	91,3	90,9	91,9
Азот свободных аминокислот, % к сумме	19,2	15,9	8,7	9,1	8,1
C* биомассы, % к ^{14}C -октадекану в среде роста	38,6	39,2	46,9	48,9	45,2

Таблица 3
Распределение меченого углерода фракций дрожжевого автолизата (% к активности введенного ^{14}C) в вариантах 1 и 2

Анализируемый объект	Фракция автолизата							
	I		II		III		IV	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Культуральная жидкость	45,2	74,0	28,0	55,9	25,6	31,7	70,2	22,7
Биомасса	43,8	17,8	57,8	33,4	58,7	54,5	18,7	58,9
Свободные аминокислоты	11,0	8,2	14,2	10,7	15,9	13,8	11,2	18,4

Содержание и распределение аминокислотного азота в дрожжах при добавлении в среду разных фракций дрожжевого автолизата (данные по трем независимым повторным опытам)

Показатель	Контроль	Фракция автолизата			
		I	II	III	IV
Аминокислотный азот белка, мг/г	60,5±6,5	61,2±8,5	64,2±6,9	76,5±8,2	74±10
Суммарный аминокислотный азот, мг/г	75,2	71,5	70,0	80,8	80,7
Белковый азот, % к сумме аминокислотного азота	80,5	85,6	91,7	94,7	91,9

ление аминокислотного азота в дрожжевой клетке. Наибольшие изменения в белковом обмене вызывает III фракция, которая состоит из пептидов и аминокислот. При этом содержание аминокислотного азота белка увеличивается на 16 %, а доля белкового азота от суммы аминокислотного азота клетки возрастает на 14 %. Фракция IV автолизата также приводит к увеличению содержания аминокислотного азота белка, но в меньшей степени, чем III фракция.

Таким образом, полученные нами данные (табл. 1 и 4) свидетельствуют в пользу предположения, что низкомолекулярные пептидные компоненты изученных соединений приводят к регуляторным и трофическим перестройкам систем метаболизма азотсодержащих компонентов дрожжевой клетки. Это, в свою очередь, ведет к увеличению содержания белка в дрожжевой клетке при добавке в среду культивирования соединений, представленных аминокислотами и пептидами. Повышение содержания белка в дрожжевой клетке имеет практическое значение, поскольку позволяет улучшить качество белково-витаминных добавок, полученных из углеводородокисляющих дрожжей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаян Т. Л., Безруков М. Г., Латов В. К., Беликов В. М., Белавт у е в а Е. М., Титова Е. Ф. Автолиз дрожжей. — *Current Microbiology*, 1981, vol. 5. № 3, p. 163—168. — 2. Давт я н М. А., Авакян А. С., Навасар дян Л. А. Стимулирование роста дрожжей клеточным экстрактом. — *Биолог, журн. Армении*, 1984, т. 37, № 7, с. 571—577. — 3. Коновалов С. А. Биохимия дрожжей. — М.: Пищепромиздат, 1962, с. 99—166. — 4. Залесский В., Иерусалимский К. К вопросу об образовании белковых веществ в дрожжах. — *Тр. Император. Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей*, 1916, т. 34, вып. 1, с. 5—12. — 5. Шкидченко А. Н. Динамика содержания белка и свободных внут-

рикеточных аминокислот у дрожжей *Candida utilis* при различных способах культивирования. — *Изв. АН СССР, сер. биол. наук*, 1977, № 4, с. 571—576. — 6. Barton - Wright E. C. — *J. Institute Brewing*, 1951, vol. 57, N 6, p. 415—426. — 7. Beal lie B. S., Finzi E. — *Proc. 5th Int. Symp. Yeast. Toronto*, 1981, p. 351—355. — 8. Brown C. M. — In: *Microorganisms and nitrogen sources*. Ed. I. W. Payne, Chichester, 1980, p. 511—535. — 9. Kleber H., Aurich H. Z. — *Allg. Microbiol.*, 1968, Bd. 8, N 1, S. 9—18. — 10. Yemm E. W., Cocking H. C. — *Analyst.*, 1955, vol. 80, N 948, p. 209—213.

Статья поступила 20 мая 1988 г.

SUMMARY

It is shown that addition of mixtures containing amino acids and peptides into the medium of *Candida* yeast results in higher protein content in the cell. The greatest changes in the amount of protein and free amino acids are due to the presence of low-molecular peptides.