

Г. М. ШАВЛОВСКИЙ, Е. М. ЛОГВИНЕНКО, В. М. ТРАЧ

**ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ РИБОФЛАВИНСИНТЕТАЗЫ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ФЛАВИНОГЕНЕЗА
У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ДРОЖЖЕЙ CANDIDA**

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 2 V 1971)

Причины образования больших количеств рибофлавина дрожжами *Candida* при их выращивании в средах с низким содержанием железа до сих пор окончательно не выяснены. Ранее нами было установлено (¹⁻³), что при возникновении сверхсинтеза рибофлавина у *C. guilliermondii* происходят заметные сдвиги в метаболизме пуринов, которые должны иметь следствием усиление снабжения флавиногенеза предшественниками изоаллоксазинового кольца. В настоящем сообщении приводятся данные о возрастании в клетках некоторых видов *Candida* при дефиците железа активности рибофлавинсинтетазы (РФС)—фермента, завершающего построение молекулы рибофлавина (РФ).

В исследованиях использовали штаммы *C. guilliermondii* ATCC 9058 и *C. melibiosii* 179, обладающие высокой флавиногенной активностью, а также штаммы *C. utilis* 106 и *C. pulcherrima* 95, которые образуют небольшие количества рибофлавина (⁴). Дрожжи выращивали в условиях, описанных нами ранее (⁵). Клетки собирали центрифугированием, промывали дистиллированной водой и высушивали в тонком слое при 22—25° в течение 17—20 час. Активность РФС определяли по методу Плюта (⁶), белок — по Лаури (⁷). Рибофлавин и люмазин инкубационной смеси разделяли при помощи метода хроматографии на бумаге в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — H₂O (200:30:75). Рибофлавин элюировали из хроматограмм водой и его концентрацию определяли в флуориметре ЭФ-ЗМ. За единицу РФС-активности (Е) принимали такое количество фермента, которое необходимо для синтеза 1 μмоля рибофлавина за 1 мин. при 37°. Удельную активность РФС выражали числом единиц на 1 мг белка. 6,7-Диметил-8-рибитиллюмазин был синтезирован Т. К. Пашкевич на кафедре технологии органического синтеза Уральского политехнического института им. С. М. Кирова. В работе использовали хроматографически чистый люмазин*.

Сначала были испытаны три метода получения препаратов РФС из дрожжей *C. guilliermondii*. Высушенные клетки суспендировали в 2% растворе NaHCO₃, содержащем 0,01 М Na₂SO₃, в соотношении 1:4 и автолизировали либо 17 час. при комнатной температуре (⁸), либо 2 часа при 37°. В обоих случаях после автолиза к пробам прибавляли 4 объема 0,05 М фосфатного буфера (pH 7), содержащего 0,01 М Na₂SO₃. Остатки клеток удаляли центрифугированием. Супернатанты диализировали против 1 л 0,05 М фосфатного буфера (pH 7), содержащего 0,01 М Na₂SO₃ в течение 17 час. при 20—24° и осветляли центрифугированием. В отдельных опытах использовали препараты разрушенных протопластов. Протопласты получали по модифицированному методу Леона и Малера (⁹); в качестве осмотического стабилизатора вместо сорбита использовали

* Авторы благодарят проф. З. В. Пушкареву и Т. К. Пашкевич за синтез и предоставление препарата 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина.

0,6 М раствор KCl. Разрушение проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера — Эльвейема в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 0,01 М Na₂SO₃. Гомогенаты диализовали против 1 л 0,05 М фосфатного буфера (рН 7), содержащего 0,01 М Na₂SO₃, и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 20 мин. Супернатанты использовали для проведения реакции.

Было установлено, что экстракты, полученные из дрожжей указанными выше методами, мало отличались между собой по содержанию белка и РФС-активности. В дальнейших экспериментах белок из дрожжей экстрагировали при 37° в течение 2 час. Активность РФС поддержива-

Таблица 1

Активность РФС у дрожжей *S. guilliermondii*, выращенных в присутствии высоких и низких концентраций железа

Фаза роста	Время культивирования, час.	0,2 мкг Fe на 1 мл		0,01 мкг Fe на 1 мл	
		Е/мг белка, $\times 10^{-5}$	мол. РФ на 1 г биомассы в час	Е/мг белка $\times 10^{-5}$	мол. РФ на 1 г биомассы в час
Логарифмическая	20	1,10	0,19	—	—
Замедленного роста	36	3,60	0,30	9,00	0,74
Стационарная	48	2,86	0,24	19,50	1,89
Стационарная	72	2,60	0,20	13,75	1,23

лась в таких препаратах на постоянном уровне в течение не менее 5 час. инкубации с субстратом. Наиболее детально была изучена РФС-активность клеток *S. guilliermondii*, выросших в присутствии высоких и низких концентраций железа.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, при переходе культуры из логарифмической фазы в фазу замедленного роста в среде с высоким содержанием железа происходит трехкратное увеличение удельной активности РФС. В клетках из стационарной фазы (48 час. роста) активность этого фермента несколько снижалась и далее поддерживалась на

Таблица 2

Влияние экзогенного железа на РФС-активность дефицитных по железу клеток *S. guilliermondii* в процессе их выращивания *

Возраст культуры, час.	Прибавление железа	Биомасса мг сух. веса на 1 мл	Рибофлавин среды, мкг/мл	Активность РФС, Е/мг белка $\times 10^{-5}$
36	Не прибавляли	1,15	6,88	13,1
46	Не прибавляли	1,55	15,40	23,3
46	Прибавляли	2,15	12,00	16,4
60	Не прибавляли	1,50	22,20	14,9
60	Не прибавляли	4,00	12,10	12,6

* Железо прибавляли к части колб с культурой в концентрации 1 мкг/мл после 36 час. выращивания.

одном и том же уровне. В железонедостаточных клетках активность РФС увеличивалась по мере нарастания дефицита железа в клетках и достигала максимума в ранней стационарной фазе роста (48 час. культивирования). В этих условиях удельная активность фермента была в 5—7 раз выше, чем в клетках, выращенных в среде с высоким содержанием железа; в отдельных опытах имело место десятикратное увеличение активности РФС. По мере старения культуры удельная активность РФС заметно понижалась, однако оставалась на высоком уровне даже в клетках, в которых синтез флавинов практически прекращался.

У другого сверхсинтетика рибофлавина *C. melibiosii* была обнаружена подобная закономерность (табл. 2): клетки, активно синтезирующие флавины, имели в 4 раза большую РФС-активность, чем клетки с высоким содержанием железа.

Были определены значения константы Михаэлиса — Ментен для РФС в неочищенных экстрактах из клеток *C. guilliermondii*, выросших до стационарной фазы при высоком и низком содержании железа в среде; они оказались довольно близкими между собой [$K_m(+Fe) = 1,5 \cdot 10^{-5} M$; $K_m(-Fe) = 1,0 \cdot 10^{-5} M$], а также к K_m очищенного препарата РФС из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ($1,3 \cdot 10^{-5} M$), полученного Пляутом и сотрудниками (9). Поэтому в следующем эксперименте изучили, влияет ли экзогенное железо непосредственно на активность РФС. Железо в виде соли Мора (10^{-4} мол/л) прибавляли к препарату РФС, полученному из клеток *C. guilliermondii*, выращенных в условиях недостатка железа. Одновременно проводили инкубацию РФС без экзогенного железа. Было установлено, что в обоих вариантах активность фермента является одинаковой, т. е. что прибавление железа непосредственно в реакционную смесь не изменяет активности РФС.

Затем исследовали вопрос, может ли железо принимать участие в метаболической инактивации РФС. С этой целью к части колб с 36-часовой культурой *C. guilliermondii*, выросшей в среде, дефицитной по железу, прибавляли экзогенное железо (1 мкг/мл) и продолжали инкубацию этих и контрольных клеток, не получивших железа, еще в течение 24 час. Определяли активность РФС, а также биомассу и содержание рибофлавина в среде в разные сроки инкубации дрожжей.

Из данных табл. 2 видно, что в процессе выращивания клеток в среде, содержащей недостаточное количество железа, активность РФС сначала возрастала, а затем падала в соответствии с закономерностью, отмеченной ранее. После первых 10 час. инкубации клетки достигали стационарной фазы и больше не росли; они активно синтезировали рибофлавин в течение всех 24 час. опыта.

В течение первых 10 час. после прибавления железа к культуре активность РФС возрастала в меньшей степени, чем в предыдущем варианте. В этот период клетки, начиная более активно расти, продолжали синтезировать еще большие количества рибофлавина. После следующих 14 час. инкубации удельная активность РФС уменьшалась до более низкого уровня, чем у клеток, не получивших экзогенного железа. Возможно, что это было обусловлено торможением синтеза РФС и разбавлением содержащегося в клетках фермента вновь образованными белками; за этот период времени биомасса возрастала в два раза, а рибофлавин почти не синтезировался.

Таким образом, в опыте с прототрофной культурой *C. guilliermondii*, которая может активно расти, мы не обнаружили инактивации РФС под влиянием прибавленного к клеткам железа. Однако в аналогичном опыте с дефицитными по железу клетками цитозин-зависимого мутанта *C. guilliermondii* V—II, которые не могли размножаться вследствие дефицита цитозина, активность РФС после 14 час. инкубации клеток с железом уменьшалась в 2—2,5 раза. Следовательно, пока нельзя исключить возможности, что этот металл принимает какое-то участие в регуляции активности РФС путем инактивации фермента.

В следующих экспериментах мы попытались выяснить, является ли увеличение активности РФС в дефицитных по железу клетках дрожжей характерной особенностью сверхсинтетиков рибофлавина, или оно встречается также и у других видов дрожжей, не синтезирующих большого количества флавина, к которым, в частности, относятся дрожжи *C. utilis* и *C. pulcherrima*. Оказалось (табл. 3), что богатые железом клетки *C. utilis* и *C. pulcherrima* в фазе замедленного роста (соответственно 22 и 36 час. культивирования) проявляли относительно высокую активность

РФС. В стационарной фазе наступало резкое падение удельной активности этого фермента, что коррелировало с уменьшением белка в экстрактах. Это явление могло быть обусловлено либо плохой экстракцией фермента из клеток в стационарной фазе роста, либо инактивацией РФС. Клетки *C. utilis* и *C. pulcherrima*, содержащие недостаточное количество железа, обладали более низкой РФС-активностью по сравнению с клетками из фазы замедленного роста, выросшими в среде с высоким со-

Т а б л и ц а 3

Активность РФС некоторых видов дрожжей рода *Candida*, выросших в присутствии высокой и низкой концентрации железа в среде

Вид дрожжей	Фаза роста	Время культивирования, час.	Активность РФС, Е/мг белка $\times 10^{-3}$	
			при содержании железа в среде 0,2 $\mu\text{г/мл}$	при содержании железа в среде, 0,01 $\mu\text{г/мл}$
<i>C. melibiosi</i>	Стационарная	48	3,92	16,9
<i>C. utilis</i>	Замедленного роста	22	7,00	—
<i>C. utilis</i>	Стационарная	48	0,75	2,5
<i>C. pulcherrima</i>	Замедленного роста	36	6,25	—
<i>C. pulcherrima</i>	Стационарная	48	1,40	2,03

держанием железа. Таким образом, дефицит железа не вызывал повышения активности РФС у этих видов дрожжей.

РФС катализирует лишь одну из ряда реакций, в ходе которых гуаниловые соединения превращаются в флавиновые нуклеотиды. Природа ранних реакций флавиногенеза до сих пор не изучена; не ясно также, какая из них лимитирует темпы всего процесса. Поэтому пока трудно оценить роль повышения активности РФС в осуществлении сверхсинтеза рибофлавина у дрожжей *Candida*.

Институт биохимии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
30 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. M. Shavlovsky, H. P. Ksheminskaya, E. M. Logvinenko, Antonie van Leeuwenhoek, **35**, Suppl., Yeast Symposium, H. 1, 1969. ² Г. М. Шавловский, Е. М. Логвиненко, М. Н. Стасив, Биохимия, **34**, 150 (1969). ³ Г. М. Шавловский, О. М. Логвиненко, О. Ф. Качан, Укр. биохим. журн., **42**, 410 (1970).
- ⁴ Г. М. Шавловский, Г. П. Кшеминская, И. И. Терек, Прикл. биохим. и микробиол., **2**, 649 (1966). ⁵ Г. М. Шавловский, Е. М. Логвиненко, Биохимия, **32**, 59 (1967). ⁶ G. W. E. Plaut, J. Biol. Chem., **238**, 2225 (1963). ⁷ O. H. Lowry, N. I. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ⁸ S. A. Leon, H. R. Mahler, Arch. Biochem. and Biophys., **126**, 305 (1968). ⁹ G. W. E. Plaut, R. L. Beach, T. Aogaiichi, Biochemistry, **9**, 771 (1970).