

Г 658

ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ДРУЖБЫ
АКАДЕМИЯ НАУК УССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ИНСТИТУТ ДРОЖЖЕЙ
им. А. В. ПАЛЛАДИНА

ЧИТАЛЬНА ЗАЛА
ЛДУФКи

На правах рукописи

Г Р А Ч
Владимир Михайлович

**НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМЫ
РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА РИБОФЛАВИНСИНТЕТАЗЫ
У ДРОЖЖЕЙ**

03. 00. 04 — биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев—1979

АБАС АНДРАШ
ЛЮБЧИЦА

Работа выполнена в Ордена Трудового Красного Знамени Институте биохимии им. А. В. Палладина АН Украинской ССР

Научный руководитель — доктор биологических наук, профессор ШАВЛОВСКИЙ Г. М.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, старший научный сотрудник ДЕГТЯРЬ Р. Г.
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ДИКАНСКАЯ Э. М.

Ведущая организация — Львовский Ордена Ленина Государственный Университет им. Ив. Франко, кафедра биохимии

Защита состоится 20.07.1979 1979 г. в 14 часов на заседании специализированного совета Д 016. 07. 01 при Институте биохимии им. А. В. Палладина АН УССР (250030 г. Киев-30, ул. Леонтовича 9).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии им. А. В. Палладина АН УССР

Автореферат разослан 20.07.1979 1979 г.

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО СОВЕТА

КИРСЕНКО О. В.

Общая характеристика работ.

Актуальность проблемы. Микробиологический синтез в последнее время привлекает большое внимание исследователей ввиду того, что микроорганизмы широко используются для получения ряда биологически-активных соединений: витаминов, коферментов, ферментов, антибиотиков и других важных для медицины и народного хозяйства веществ. Дешевизна питательного сырья и несложность технологического оборудования создают большую перспективу для использования микробов в народном хозяйстве. Витамин В₂ /рибофлавин/ и его производные - флавиновые коферменты - получают в промышленных масштабах как химическим, так и микробиологическим способами. Однако, разработка рациональных методов микробиологического производства флавинов тормозится тем, что до сих пор не полностью изучены биохимические механизмы возникновения сверхсинтеза этих веществ. Для раскрытия механизмов регуляции флавиногенеза и причин нарушения его при сверхсинтезе целесообразно использовать дрожжи, которые являются богатым источником большинства витаминов группы В. Такие виды дрожжей, как *Pichia /Candida/ guilliermondii*, *Torulopsis candida* и *Schwanniomyces occidentalis* относятся к тем микроорганизмам, у которых легко достигается переключение умеренного синтеза рибофлавина к сверхсинтезу этого витамина при изменении концентрации железа в среде. Кроме того, дрожжи могут хорошо расти на парафинах нефти, спиртах и других видах непищевого сырья и синтезировать довольно большие количества витамина В₂.

Познание механизмов регуляции биосинтеза рибофлавина позволит определить условия максимального накопления флавинов, создать новые принципы селекции высокопродуктивных штаммов для микробиологической промышленности.

Состояние вопроса, цель и задачи исследований. Биохимические механизмы, лежащие в основе сверхсинтеза флавинов у дрожжей в условиях недостаточного обеспечения железом, выяснены не полностью. Ряд авторов высказали гипотезу о том, что сверхсинтез рибофлавина у дрожжей, вызванный дефицитом железа, может быть следствием переключения дыхания с цитохромного типа на флавиновый, что якобы приводит к повышенным потребностям клетки в флавиновых коферментах /Hickey, 1945, Goodwin, 1963, Schlenk,

zur Nieden, 1970/. Однако, экспериментальных доказательств этой гипотезы не получено. Высказывалось предположение, что индукция флавиногенеза у дрожжей в условиях дефицита железа может быть обусловлена блокированием катаболизма предшественников рибофлавина - пуринов, в котором принимают участие железосодержащие энзимы - ксантинооксидаза и уратоксидаза /Shavlovsky et al., 1969, Schlee, 1968/. В дальнейших исследованиях было установлено, что синтез флавинов не коррелирует с активностью ферментов катаболизма пуринов /Шавловский и соавт., 1971, 1972/. Очевидно, одно лишь блокирование катаболизма пуринов в железонедостаточных клетках не является определяющим фактором индукции флавиногенеза.

В последнее время установлено, что большое значение для возникновения сверхсинтеза флавинов имеет снабжение их предшественниками и дерепрессия ферментов флавиногенеза /Шавловский и соавт., 1975/.

Единственным, относительно хорошо изученным ферментом пути биосинтеза витамина B₂ является рибофлавинсинтетаза /рибофлавинсинтаза, К.Ф. 2.5.1.9./, катализирующая последний этап образования молекулы рибофлавина.

Ряд работ /Plaut, 1963, Howells and Plaut, 1966, Beach and Plaut, 1970, Mitsuda, 1970, Plaut and Beach, 1976/ посвящены исследованию свойств и химизма действия рибофлавинсинтетазы из различных источников, но вопросы регуляции синтеза данного фермента до настоящего времени не изучались.

В связи с вышеизложенным, в задачу настоящего исследования входило:

1. разработка простых и надежных методов определения рибофлавинсинтетазы;
2. изучение некоторых свойств этого фермента;
3. изучение особенностей регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы у флавиногенных и нефлавиногенных видов дрожжей.

Научная новизна. Впервые установлено, что сверхсинтез рибофлавина в условиях дефицита железа у флавиногенных видов дрожжей сопровождается дерепрессией синтеза фермента флавиногенеза - рибофлавинсинтетазы.

Показано, что железо принимает участие в регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы у флавиногенных дрожжей *T. candida* на уровне транскрипции.

Получены доказательства того, что флавины не принимают участия в регуляции синтеза рибофлафинсинтетазы как у флавиногенных /*P. guilliermondii*, *T. candida* /, так и нефлавиногенных /*P. schmeieri*, *S. utilis*, *S. pilcherrima* / видов дрожжей.

Обнаружен, регулируемый железом, сверхсинтез рибофлавина у дрожжей *Schw. occidentalis*.

Разработан метод определения рибофлафинсинтетазной активности у различных видов дрожжей в экстрактах, а также *in situ*.

Практическая ценность. Обнаружение депрессии рибофлавиносинтетазы у флавиногенных дрожжей создает предпосылки для разработки методов конструирования штаммов дрожжей с конститутивно высокими уровнями активности ферментов флавиногенеза. Такие штаммы будут, вероятно, обладать высокой флавиногенной активностью и могут быть использованы в микробиологической промышленности для получения препаратов витамина B₂.

Разработанный метод определения ферментативной активности *in situ* может быть, вероятно, использован не только для определения активности разных ферментов флавиногенеза, но и для определения активности некоторых других ферментов дрожжевой клетки. **Апробация работы** состоялась во Львовском отделении Института биохимии им. А.В.Палладина АН УССР. Основные положения работы докладывались на 7-м симпозиуме Европейских биохимических обществ /Варна, 1971/; Всесоюзной конференции по регуляции биохимических процессов у микроорганизмов /Пушино-на-Оке, 1972/; Специальном симпозиуме по метаболизму и регуляции клеточных процессов /Хельсинки, Финляндия, 1973/; IU съезде микробиологов Украины /Киев, 1975/; У-м съезде микробиологического общества /Ереван, 1975/.

Публикация. По теме диссертационной работы опубликовано 13 работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав литературного обзора, 3 глав экспериментальной части, выводов и библиографического указателя. Диссертация изложена на 152 страницах машинописи, содержит 34 рисунка и 17 таблиц.

Библиография 272 названия.

Материалы и методы исследования. В работе использовали дрожжи:

Pichia guilliermondii ATCC 9058 и ВКМ 1257, *Torulopsis candida* ВКМ 18, *Schwanniomyces occidentalis* 1758, *Candida utilis* ВКМ 106,

Pichia ohmeri ВКЛ-У-1254, *Candida pulcherrima* 95, *Saccharomyces cerevisiae* - коммерческий препарат хлебопекарских дрожжей, *Candida tropicalis* ИФМ 503, а также ауксотрофные по рибофла-
вину мутанты дрожжей *P. guilliermondii* ATCC 9058 Р7Г и Р9А;
T. candida Р5; *P. ohmeri* Р32, метионинзависимый мутант *T. can-
dida* МЕТ-2 и мутант *T. candida* МЕТ-2 с повышенной чувстви-
тельностью к антибиотикам и антиметаболитам.

Дрожжи культивировали в модифицированной среде Беркгольдера /Шавловский и соавт., 1978/ в колбах Эрленмейера объемом 50 или 500 мл, содержащих 10 или 100 мл среды, соответственно. Выращивание проводили на качалке /200 об./мин/ при 29°.

Среды очищали от металлов 8-оксихинолином /Waring, Bergman, 1943/.

Мутанты дрожжей *T. candida* получали при помощи УФ лучей. Суспензию, содержащую 1 млн. клеток в 1 мл из логарифмической фазы роста, облучали ультрафиолетовым светом в дозе 2000 эрг/мм² /лампа ЕУФ-15/ и высевали на среду, содержащую 200 мкг витами-
на В₂ в 1 мл. Для выделения мутантов с повышенной чувстви-
тельностью к действию антибиотиков рибофлаavinзависимые штаммы, вы-
деленные методом отпечатков, подвергали повторному облучению и
высевали на агаризованную среду Беркгольдера, содержащую 0,5 мкг
рибофлавина в 1 мл.

Протопласты дрожжей получали по модифицированному нами мето-
ду Эдди и Вильямсона /Шавловский и соавт., 1973/.

Биомассу дрожжей определяли турбидиметрически или весовым ме-
тодом. Содержание флавинов в культуральной жидкости и в клетках
определяли флуориметрически на аппарате ЭФ-3к по Беоси и сотр.
/Wessy et al., 1949/ или спектрофотометрически на спектрофото-
метре СФ-4А, при 445 нм. Флавины экстрагировали из клеток 5%
трихлоруксусной кислотой по Гилу /Gee, 1958/.

Бесклеточные экстракты получали при помощи автолиза или раз-
рушения клеток в гомогенизаторе для клеток и бактерий Л-17, из-
готовленном на Киевском экспериментальном заводе медицинских
изделий, со стеклянными бусами диаметром 0,3-0,6 мм или ультра-
звуком на аппарате УЗДН-1 в диапазоне частот 44 кГц, в течение
4 мин.

Содержание белка в экстрактах определяли по методу Лоури
/Lowry et al., 1951/.

Определение рибофлавинсинтетазной активности. Активность рибофлавинсинтетазы в экстрактах определяли по модифицированному нами методу Пляута /Plaut, 1963/. В отличие от оригинальной методики, в реакционную смесь, кроме Na_2SO_3 , добавляли 10 мМ/мл меркаптоэтанол или 1,0 мМ/мл дитиотрейтола. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для синтеза 1 мкмоль рибофлавина за 1 минуту при 37°. Удельную активность рибофлавинсинтетазы выражали числом единиц /Е/ на 1 мг белка или на 1 мг клеток.

Опыты повторяли 2-3 раза. В таблицах и графиках представлены данные типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. Разработка методов определения рибофлавинсинтетазы в клетках дрожжей.

Вначале был испытан метод, предложенный Пляутом, для определения рибофлавинсинтетазной активности в клетках *Saccharomyces cerevisiae* /Plaut, 1963/.

Оказалось, что метод Пляута был пригоден для определения активности рибофлавинсинтетазы в бесклеточных экстрактах *P. guilliermondii*, однако в экстрактах, полученных из железнедефицитных клеток более активного продуцента витамина B_2 , *T. candida*, ферментативную активность обнаружить не удалось. Кроме того, определение активности в экстрактах, полученных из клеток *P. guilliermondii*, отличалось плохой воспроизводимостью.

Эти обстоятельства побудили нас провести методическую работу по изучению оптимальных условий для определения рибофлавинсинтетазной активности в клетках различных видов дрожжей.

Было установлено, что автолиз при комнатной температуре не обеспечивал хорошей экстракции белка из дрожжей, особенно из клеток, выросших до стационарной фазы роста. Поэтому было изучено влияние двух других, наиболее часто употребляемых, методов дезинтеграции дрожжевых клеток - при помощи стеклянных бус и ультразвука - на выход белка и рибофлавинсинтетазную активность экстрактов *P. guilliermondii* и *T. candida*. Наиболее высокий выход белка обнаружен в экстрактах, полученных путем разрушения клеток со стеклянными бусами в гомогенизаторе Л-17. Удельная активность рибофлавинсинтетазы в экстрактах *P. guilliermondii* и *T. candida* не зависела от способов разрушения клеток.

Активность рибофлавинсинтетазы сильно изменялась в зависимо-

ти от количества белка в реакционной смеси и природы восстановителя. Различная чувствительность рибофлавинсинтетазы изученных видов дрожжей к восстановителям может быть обусловлена неодинаковой стабильностью фермента. Следует отметить, что даже в присутствии меркаптоэтанола или дитиотрейтола, рибофлавинсинтетаза *T. candida* быстро инактивировалась в процессе инкубации с субстратом, чего не происходило с рибофлавинсинтетазой *P. guilliermondii*.

Кроме описанного выше способа определения рибофлавинсинтетазной активности, использовали метод определения этого фермента *in situ*. Для разработки такого метода были испытаны три способа пермеабиллизации клеток: нарушение целостности мембран при помощи дигитонина /Volland, 1975/, диметилсульfoxида /Adams, 1972/ или протаминсульфата /Schlenk et al., 1970/. Суспензию, содержащую 10 мг сухого веса клеток в 1 мл, обрабатывали этими агентами. Параллельно проводили гомогенизацию клеток. Оказалось, что обработка дрожжей диметилсульfoxидом приводила к гибели клеток и проявлению ими рибофлавинсинтетазной активности у *P. guilliermondii*, *S. utilis* и *S. pulcherrima*. Однако она не была эффективной для определения активности в клетках *T. candida*. Рибофлавинсинтетазная активность в пермеабиллизированных клетках и экстрактах была одинаковой. Обработка клеток дигитонином при 0°C по методу Волланда и протаминсульфатом по методу Шленка и Зыдек-Цык не давала возможности определять активность фермента. Однако в дальнейшем удалось модифицировать метод Волланда для определения рибофлавинсинтетазы *in situ*. Модификация состояла в том, что дрожжи инкубировали с дигитонином при 30°; поскольку применяемые нами концентрации дигитонина не инактивировали фермент, клетки после вскрытия сразу без промывания использовали для проведения реакции.

Разработанный нами метод пермеабиллизации дрожжей при помощи дигитонина оказался пригодным для определения рибофлавинсинтетазы в клетках изученных видов дрожжей, в том числе в клетках *T. candida*. Это позволило уменьшить время определения и количество клеточного материала по сравнению с определением активности в бесклеточных экстрактах.

2. Изучение некоторых свойств рибофлавинсинтетазы дрожжей.

При изучении различных свойств рибофлавинсинтетазы использовали бесклеточные экстракты, полученные из клеток *P. guillier-*

mondii и *T. candida*, выросших в средах с низким содержанием железа, что обеспечивало относительно высокую удельную активность препаратов.

Установлено, что рибофлавинсинтетаза *P. guilliermondii* и *T. candida* проявляет высокую активность в широком интервале pH. Оптимум pH лежит в зоне 7,0-7,5. Температурный оптимум для рибофлавинсинтетазы *P. guilliermondii* - 37-45° и для *T. candida* - 40°. K_M для рибофлавинсинтетазы из клеток *P. guilliermondii*, выращенных при высоком и низком содержании железа, оказались довольно близкими между собой и составляли $1,5 \times 10^{-5}M$ и $1,8 \times 10^{-5}M$ /pH 7,0/, соответственно. По этому признаку рибофлавинсинтетаза *P. guilliermondii* очень напоминала фермент из *S. cerevisiae* /Plaut, 1963, Harvey, Plaut, 1966/. K_M для рибофлавинсинтетазы *T. candida* составляла $3,5 \times 10^{-5}M$ /pH 7,0/.

При хранении бесклеточных экстрактов, полученных из клеток *P. guilliermondii* и *T. candida*, в 0,1 M фосфатном буфере в присутствии 0,01 M меркаптоэтанола и 0,01 M Na_2SO_3 при 0 - +4° рибофлавинсинтетаза не теряла активности на протяжении 3-4 суток, затем активность постепенно падала и через 30 суток составляла половину от максимальной.

По литературным данным, рибофлавин ингибировал рибофлавинсинтетазу *S. cerevisiae* /Harvey, Plaut, 1966/. Мы показали, что рибофлавин $1 \times 10^{-4}M$ не угнетал активности рибофлавинсинтетазы у флавиногенных /*P. guilliermondii* и *T. candida*/ и нефлавиногенных /*S. utilis*, *P. ohmeri*/ дрожжей и почти полностью ингибировал активность фермента *S. cerevisiae* /коммерческий препарат хлебопекарских дрожжей/. Флавиновые нуклеотиды ФМН и ФАД $1 \times 10^{-4}M$ также не ингибировали активность этого фермента у дрожжей *P. guilliermondii* и *T. candida*.

6-метил-7-окси-8-риболюмазин - продукт окисления 6,7-диметил-8-риболюмазина - в концентрации $1 \times 10^{-4}M$ угнетал активность рибофлавинсинтетазы *T. candida* на 95%, в то время как активность этого фермента из *P. guilliermondii* такими концентрациями совсем не угнеталась. Таким образом, рибофлавинсинтетаза клеток *T. candida* более чувствительна к ингибирующему действию 6-метил-7-окси-8-риболюмазина, чем фермент клеток *P. guilliermondii*. По данным Пляута /Plaut, 1963/ 6-метил-7-окси-8-риболюмазин в концентрации $3-15 \times 10^{-4}M$ угнетал рибофлавинсинтетазу, выделенную из *S. cerevisiae*, на 92% по типу конкурентного ингибирования.

Не исключена возможность, что проведение исследований с очищенными препаратами рибофлавинсинтетазы *P. guilliermondii* и *T. candida* позволило бы более полно выяснить причины различия в некоторых свойствах фермента у этих видов дрожжей.

Известно, что железо регулирует синтез флавинов у некоторых видов дрожжей [Tanner et al., 1945, Шавловский, 1956, 1959]. Представлялось интересным выяснить, влияет ли железо на активность рибофлавинсинтетазы у флавиногенных видов дрожжей.

Мы установили, что ионы железа $[1 \times 10^{-2} \text{ M Fe}^{++}]$, подавляющие сверхсинтез рибофлавина при выращивании дрожжей, не ингибируют рибофлавинсинтетазу *P. guilliermondii* и *T. candida* in vitro. В автолизатах богатых железом клеток этих видов дрожжей отсутствовали низкомолекулярные метаболиты и высокомолекулярные соединения, способные ингибировать рибофлавинсинтетазу, полученную из железонедостаточных клеток *P. guilliermondii* и *T. candida* /табл. I/.

Таблица I

Влияние ионов железа и автолизатов железосодержащих клеток на рибофлавинсинтетазную активность препаратов, полученных из железонедостаточных клеток *P. guilliermondii* и *T. candida*.

| № п/п | Препарат | Рибофлавинсинтетаза, Е/мг белка $\times 10^{-3}$ | |
|-------|---|--|--------------------------|
| | | <i>T. candida</i> | <i>P. guilliermondii</i> |
| 1. | Диализат железонедостаточных клеток | 82,0 | 24,5 |
| 2. | Автолизат железосодержащих клеток | 6,6 | 3,4 |
| 3. | Смесь препаратов 1 и 2 в соотношении белка 1:1 | 44,4 | 14,1 |
| 4. | Диализат железонедостаточных клеток + 5,6 мкг Fe^{++} в 1 мл | 82,0 | 24,5 |

3. Изучение регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы у дрожжей.

Исследовали рибофлавинсинтетазную активность разных видов и штаммов дрожжей, которые способны при низких концентрациях железа в среде осуществлять сверхсинтез рибофлавина, и видов, у которых этот металл не влиял на синтез флавинов.

Нами впервые изучена флавиногенная активность дрожжей *Schw. occidentalis* в среде с высоким и низким содержанием железа. Оказалось, что эти дрожжи на железodefицитной среде синтезировали большие количества рибофлавина и, следовательно, могут быть отнесены к сверхсинтетикам витамина B₂.

3.1. Участие железа в регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы.

Как представлено в таблице 2, дрожжи-сверхсинтетики рибофлавина, такие как *P. guilliermondii*, *T. candida* и *Schw. occidentalis* при выращивании в железонедостаточных средах синтезировали большие количества рибофлавина. Рибофлавинсинтетазная активность этих видов дрожжей в железонедостаточных клетках бы-

Таблица 2

Накопление рибофлавина и рибофлавинсинтетазная активность флавиногенных и нефлавиногенных дрожжей, выращенных в средах с высоким и низким содержанием железа.

| Виды дрожжей | : 0,2 мкг Fe ⁺⁺ /мл | | | : 0,005 мкг Fe ⁺⁺ /мл | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|---------------------------|---|
| | Возраст: культуры, час. | Рибофлавин: среды, мкг/мл | Рибофлавинсинтеза: таза, Е/мг белка: x 10 ⁻⁵ | Возраст: культуры, час. | Рибофлавин: среды, мкг/мл | Рибофлавинсинтеза: таза, Е/мг белка: x 10 ⁻⁵ |
| <i>P. guilliermondii</i> | 36 | 0,80 | 8,00 | 48 | 16,8 | 24,50 |
| <i>T. candida</i> | 24 | 0,30 | 3,30 | 36 | 29,4 | III,50 |
| <i>Schw. occidentalis</i> | 24 | 0,23 | 4,50 | 48 | 61,0 | 34,20 |
| <i>P. ohmeri</i> | 36 | 0,70 | 2,70 | 48 | 2,0 | 2,30 |
| <i>C. utilis</i> | 24 | 0,03 | 7,00 | 48 | 0,02 | 2,60 |
| <i>C. pulcherrima</i> | 36 | 0,03 | 6,30 | 48 | 0,02 | 2,00 |
| <i>C. tropicalis</i> | 36 | 0,35 | 1,50 | 48 | 0,29 | 1,90 |
| ^x <i>C. tropicalis</i> | I44 | I6,80 | I,65 | - | - | - |

^x*C. tropicalis* выращивали в среде, где источником углеродного питания служил твердый парафин; - не определяли.

да намного выше, чем в богатых железом клетках: у *S. occidentalis* в 7,6 раза; у *P. guilliermondii* в 8 раз и у *T. candida* в 34 раза /табл. 2/. Более обширные исследования рибофлавинсинтетазной активности 10-ти природных штаммов *P. guilliermondii*, выделенных в Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного АН УССР показали, что 9 из них /кроме штамма I45B/ обладали высокой ферментативной активностью и осуществляли сверхсинтез флавинов в железонедостаточной среде.

Слабые продуценты витамина B_2 , такие как *S. utilis*, *P. oshleri*, *S. pulcherrima* при выращивании в железонедостаточной среде, обладали одинаковой /*P. oshleri* / или даже более низкой /*S. utilis*, *S. pulcherrima* / активностью, чем клетки, выращенные в среде с высоким содержанием железа.

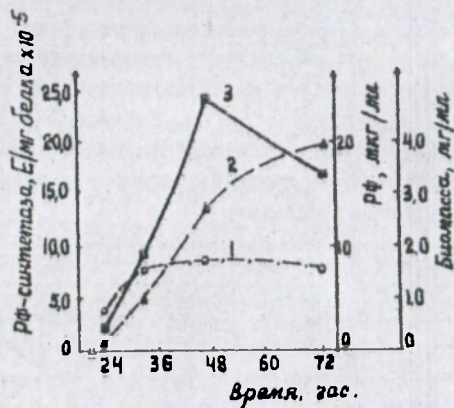


Рис. I Изменение биомассы /1/, содержания флавинов /2/ в среде и рибофлавинсинтетазной активности /3/ клеток *P. guilliermondii* при выращивании их в среде с низким содержанием железа /0,005 мкг/мл/.

Таким образом, нами обнаружена корреляция между уровнями рибофлавинсинтетазной активности и интенсивностью синтеза рибофлавина только у тех видов дрожжей, у которых флавиногенез регулировался при помощи железа. У дрожжей *S. torulosus* ИБМ 303, у которых сверхсинтез рибофлавина происходил только при выращивании в средах с парафинами, такая зависимость отсутствовала.

/табл. 2/.

Установлено, что у дрожжей *P. guilliermondii*, *T. candida* и *Schw. occidentalis* в среде с высоким содержанием железа удельная активность рибофлавинсинтетазы в различные фазы роста изменялась незначительно.

При выращивании в железонедостаточной среде рибофлавинсинтетазная активность клеток изученных видов дрожжей увеличивалась по мере торможения роста, вызванного нарастанием дефицита железа в клетках, и достигала максимума в ранней стационарной фазе роста /рис. 1/.

3.2. Влияние $\alpha\alpha$ -дипиридила и о-фенантролина на рибофлавинсинтетазную активность клеток *P. guilliermondii* и *T. candida*.

Известно, что дефицит железа в клетках можно вызвать путем инкубации их с хелатообразующими агентами, имеющими высокое сродство к этому металлу /Альберт, 1971/.

Мы изучили влияние двух хелаторов - о-фенантролина и $\alpha\alpha$ -дипиридила на флавиногенез и рибофлавинсинтетазную активность клеток *P. guilliermondii* и *T. candida*. Оказалось, что о-фенантролин в концентрации 100-200 мкг/мл вызывал максимальное, почти 5-ти кратное, увеличение скорости флавиногенеза и 2-3-х кратное увеличение рибофлавинсинтетазной активности в клетках *P. guilliermondii*. Клетки *T. candida* оказались более чувствительными к действию о-фенантролина. Для этого вида дрожжей концентрация о-фенантролина, которая приводила к увеличению синтеза флавинов и ингибированию роста, была в 10 раз ниже /10-15 мкг/мл/, чем для клеток *P. guilliermondii*. В этих условиях происходило резкое увеличение скорости флавиногенеза /в 20 раз/, а также значительное /в 25 раз/ возрастание рибофлавинсинтетазной активности. При изучении кинетики действия о-фенантролина на клетки *T. candida* в зависимости от времени инкубации оказалось, что после лаг-фазы, которая длилась приблизительно 1 час, начиналось быстрое возрастание скорости флавиногенеза и рибофлавинсинтетазной активности, достигающее максимума после 8 часов инкубации. Однако, опыты с этим хелатообразующим агентом были не всегда хорошо воспроизводимы, очевидно, вследствие связывания о-фенантролина с другими биологически-важными металлами.

Мы провели серию экспериментов с другим хелатообразующим агентом - $\alpha\alpha'$ -дипиридилем, обладающим намного большим чем о-фенантролин сродством к ионам двухвалентного железа. Установлено, что

при концентрации α, α' -дипиридила 100 мкг/мл интенсивность флавиногенеза клеток *P. guilliermondii* повышалась в 10 раз, а рибофлавинсинтетазная активность - в 5-7 раз. Столь же эффективно α, α' -дипиридил /50-60 мкг/мл/ влиял на флавиногенез клеток *T. candida*. За 6-8 часов инкубации рибофлавинсинтетазная активность возрастала в 30 раз, а скорость флавиногенеза в 50 раз. Опыты с α, α' -дипиридилом были хорошо воспроизводимы.

Разработанный нами метод изменения рибофлавинсинтетазной активности в клетках *P. guilliermondii* и *T. candida* под влиянием α, α' -дипиридила был использован в дальнейших экспериментах.

3.3. Влияние циклогексимида и железа на увеличение рибофлавинсинтетазной активности в клетках флавиногенных дрожжей.

Для выяснения механизма действия железа на флавиногенез изучали влияние ингибирования белкового синтеза на изменение активности рибофлавинсинтетазы. В качестве агента блокирующего синтез белков использовали циклогексимид.

Предварительно нами было показано, что этот антибиотик /10-20 мкг/мл/ полностью тормозил рост клеток *P. guilliermondii*, а для ингибирования роста клеток *T. candida* требовались еще меньшие количества данного вещества /2-5 мкг/мл/. В то же время циклогексимид не влиял на рибофлавинсинтетазную активность молодых железонедостаточных клеток *P. guilliermondii* и *T. candida*, что свидетельствовало о метаболической стабильности рибофлавинсинтетазы в клетках этих видов дрожжей в избранных нами условиях опыта. Использовали также другой прием блокирования белкового синтеза: клетки метионинзависимого мутанта *T. candida* MET-2, выросшие в богатой железом среде, инкубировали сначала в течение 4-х часов в железонедостаточной среде без метионина для уменьшения пула этой аминокислоты, затем прибавляли α, α' -дипиридил /50 мкг/мл/ и инкубировали еще в течение 10-ти часов с метионином и без метионина. В отсутствие незаменимой аминокислоты рибофлавинсинтетазная активность клеток почти не возрастала, в то время как контрольные клетки, инкубируемые в среде с метионином, обладали в 10 раз более высокой ферментативной активностью.

После проведения этих предварительных экспериментов, изучили влияние циклогексимида на флавиногенез и рибофлавинсинтетазную активность клеток *P. guilliermondii* и *T. candida*. Инкубация молодых клеток *T. candida* и *P. guilliermondii* /20 и 24 часа роста, соответственно/, выращенных в железodefицитной среде и

обладавших еще низким уровнем ферментативной активности, на протяжении 4-10 часов в присутствии циклогексимида и α, α' -дипиридила, показала, что антибиотик полностью тормозил увеличение рибофлавинсинтетазной активности и в меньшей степени угнетал флавиногенез. В присутствии α, α' -дипиридила без циклогексимида в клетках *T. candida* и *P. guilliermondii* происходило увеличение рибофлавинсинтетазной активности в 30-40 и 5-7 раз, соответственно.

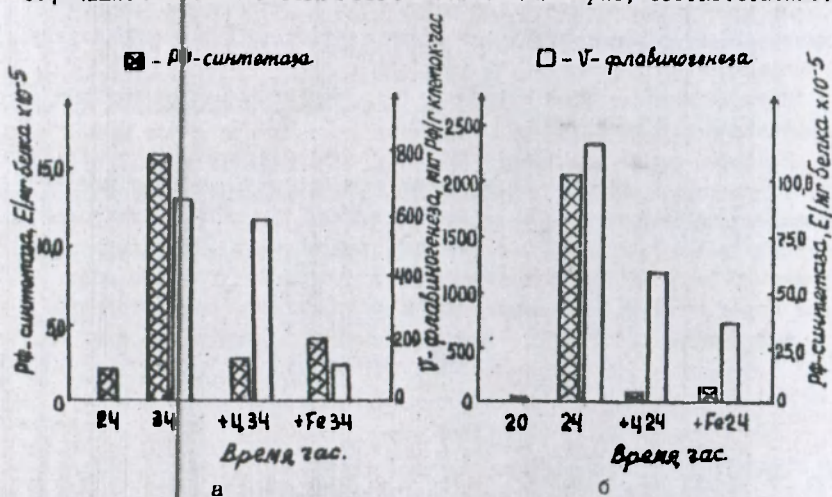


Рис. 2 Влияние циклогексимида /а - 20 мкг/мл, б - 5 мкг/мл/ и железа /I мкг/мл/ на скорость флавиногенеза и рибофлавинсинтетазную активность клеток *P. guilliermondii* /а/ и *T. candida* /б/. Ц - циклогексимид.

Таким образом, были получены однозначные данные, свидетельствующие о том, что в условиях блокирования белкового синтеза не происходило нарастание рибофлавинсинтетазной активности в клетках *P. guilliermondii* и *T. candida* ни в процессе их роста в железонедостаточной среде, ни при инкубации клеток с α, α' -дипиридиллом. Следовательно, при возникновении сверхсинтеза флавинов, вследствие дефицита железа в клетках, происходила дерепрессия синтеза рибофлавинсинтазы.

Железо, прибавленное в форме соли Мора в молодым железонедостаточным клеткам *T. candida* и *P. guilliermondii*, обладающим

еще низкой рибофлавинсинтетазной активностью, тормозило синтез рибофлавинсинтазы почти в такой же степени как нинлогексимид /рис. 2/.

3.4. Влияние ингибиторов транскрипции на депрессию рибофлавинсинтазы в клетках *T. candida*.

Предстояло выяснить на каком уровне - транскрипция или трансляции - железо участвует в регуляции синтеза рибофлавинсинтазы у флавиногенных дрожжей.

Изучили влияние трех ингибиторов транскрипции: актиномицина Д, профлавина и рубомицина.

В первой серии экспериментов использовали прототрофную культуру *T. candida*, обладающую наиболее высоким уровнем депрессии рибофлавинсинтазы. Оказалось, что дрожжи *T. candida* наиболее чувствительны к профлавино; 7-9 мкг профлавина в 1 мл среды угнетали рост на 50%, актиномицин Д и рубомицин угнетали рост при более высоких концентрациях /40 и 80 мкг/мл, соответственно/.

Было показано /рис. 3/, что актиномицин Д даже в высоких

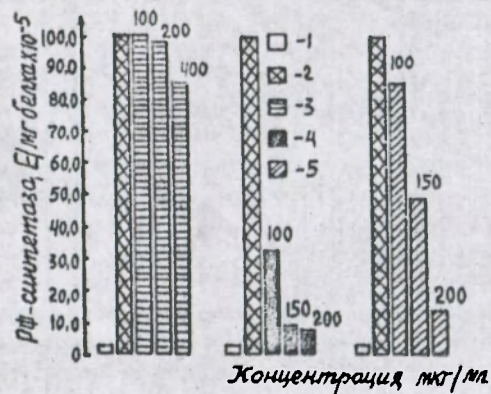


Рис. 3 Влияние актиномицина Д, профлавина и рубомицина на рибофлавинсинтетазную активность клеток *T. candida*.
 1 - контроль; 2 - +α,α'-дипиридил; 3,4,5 - по фону α,α'-дипиридила + актиномицин Д, профлавин и рубомицин.
 Время инкубации - 6 часов, концентрация α,α'-дипиридила 60 мкг/мл.

концентрациях не тормозил дерепрессию синтеза этого фермента. Однако, среди использованных нами ингибиторов транскрипции, по-видимому, более специфическим действием обладает актиномицин Д, слабое влияние которого на процесс синтеза рибофлавинсинтазы было обусловлено, возможно, плохим проникновением этого антибиотика в дрожевые клетки.

В связи с этим, были получены мутанты дрожжей *T. candida*, обладающие большей чувствительностью к этим антибиотикам. Использовали метод селекции дрожжей *P. guilliermondii* с повышенной чувствительностью к ряду антибиотиков и антиметаболитов, в том числе к актиномицину Д /Сибирский и соавт., 1977/. При помощи этого метода было получено 8 мутантов, обладающих почти в 100 раз большей чувствительностью по сравнению с диким штаммом к ингибированию роста актиномицином Д. Зависимость роста одного из них, штамма МТ-2, от концентрации актиномицина Д представлена на рисунке /рис. 4/.

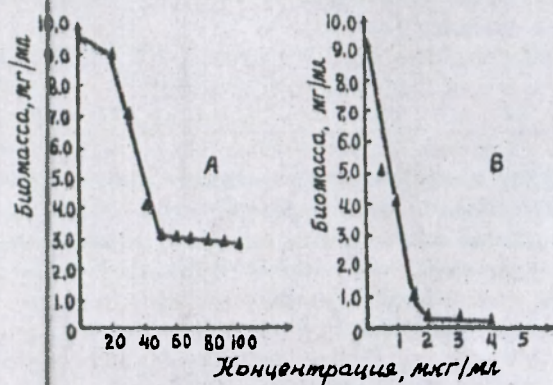


Рис. 4 Влияние актиномицина Д на рост клеток *T. candida* /А/ и мутанта *T. candida* МТ-2 /Б/.

Плотность посева 0,1 мг/мл среды; клетки выращивали на протяжении 18 часов.

Антибиотик в концентрации 0,5-0,7 мкг/мл среды угнетал на 50% рост клеток, а в присутствии 2 мкг актиномицина Д в 1 мл наступало полное ингибирование роста клеток *T. candida* МТ-2.

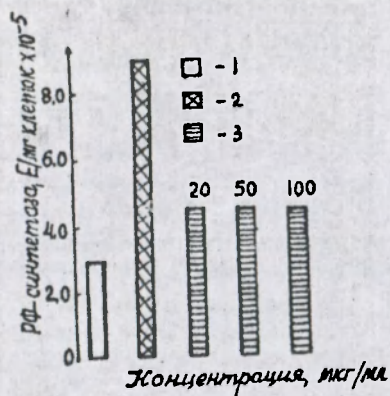


Рис. 5 Влияние актиномицина Д на дерепрессию рибофлавинсинтетазы в клетках *C. candida* M51-2.

I - контроль; 2 - + α,β-дипиридил; 3 - + α,β-дипиридил и актиномицин Д.

Как видно из рисунка 5, при низких концентрациях актиномицина Д /20 мкг/мл/ происходило блокирование дерепрессии рибофлавинсинтетазы на 80%. Дальнейшее повышение концентрации актиномицина Д до 100 мкг в 1 мл уже не влияло на степень угнетения синтеза этого фермента.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что железо участвует в регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы на уровне транскрипции.

3.5. Влияние флавинов на синтез рибофлавинсинтетазы.

Регуляция флавиногенеза по типу отрицательной обратной связи хорошо изучена у бактерий *Bacillus subtilis* /Бреслер, 1973, 1977/.

Для изучения влияния флавинов на синтез рибофлавинсинтетазы у флавиногенных и нефлавиногенных дрожжей необходимо было подобрать условия для изменения внутриклеточного содержания этих веществ. С этой целью проводили инкубацию дрожжей, а также рибофлавинозависимых мутантов в среде с высокими концентрациями рибофлавина и без него. Известно, что рибофлавин плохо проникает в дрожжевые клетки /Логвиненко и соавт., 1972/. Поэтому для опы-

тов кроме интактных клеток использовали протопласты. О метаболической активности протопластов судили по их способности синтезировать белок, флавины и рибофлавинсинтетазу.

Таблица 3

Влияние экзогенного рибофлавина на содержание флавинов и активность рибофлавинсинтетазы интактных клеток и протопластов *P. guilliermondii*

| Клетки | Рибофлавин в среде, мкг/мл | | Концентрация флавинов в клетках, ммоль/г | | Рибофлавинсинтетазы, Е/мг белка $\times 10^{-5}$ |
|-------------|----------------------------|-------|--|-------|--|
| | Общая | ФАД | Общая | ФАД | |
| Интактные | 0 | 96,0 | 48,5 | 47,5 | 3,55 |
| | 200 | 115,0 | 65,0 | 50,0 | 3,30 |
| Протопласты | 0 | 87,0 | 30,6 | 57,6 | 3,88 |
| | 200 | 167,0 | 30,3 | 126,7 | 3,70 |

При изучении влияния экзогенного рибофлавина на содержание флавинов и рибофлавинсинтетазную активность в интактных клетках и протопластах *P. guilliermondii* /табл. 3/ оказалось, что после 11-12 часовой инкубации в присутствии 200 мкг рибофлавина в 1 мл внутриклеточное содержание флавинов в интактных клетках *P. guilliermondii* возрастало на 20% по сравнению с контролем, главным образом за счет увеличения количества ФАД, что свидетельствовало о превращении в клетках части поглощенного рибофлавина в флавиновые нуклеотиды. В аналогичных условиях содержание флавинов в протопластах после инкубации с экзогенным рибофлавином возрастало на 60% и более, по-видимому, вследствие увеличения концентрации свободного рибофлавина, поскольку количество ФАД в протопластах, инкубируемых с рибофлавином и без него, менялось незначительно.

Показано, что увеличение концентрации флавинов в интактных клетках, а также в протопластах *P. guilliermondii* после их подрашивания с высокими концентрациями рибофлавина, не влияло на уровень активности рибофлавинсинтетазы. Подобная закономерность

была обнаружена в опытах с дрожжами *S. utilis*.

Был использован и другой прием для изучения влияния экзогенного рибофлавина на биосинтез рибофлавинсинтетазы /табл. 1/.

Таблица 4

Содержание флавинов и активность рибофлавинсинтетазы клеток рибофлавинзависимых мутантов дрожжей после инкубации с экзогенным рибофлавином и без витамина B_2 .

| Штамм | Рибофлавин в среде, мг/мл | | Концентрация флавинов в клетках, ммкмоль/г | | | Рибофлавинсинтетазы, Е/мг белка $\times 10^{-5}$ |
|------------------------------|---------------------------|-----|--|------|------|--|
| | 0 | 100 | Общая фла-вин | ФАД | ФМН | |
| <i>P. guilliermondii</i> P7Г | 0 | 1,0 | 12,2 | 6,0 | 6,2 | 1,28 |
| | 100 | 3,0 | 64,2 | 25,2 | 38,7 | 1,05 |
| <i>P. guilliermondii</i> P9A | 0 | 0,7 | 10,5 | 4,5 | 6,0 | 1,38 |
| | 100 | 1,6 | 49,0 | 21,9 | 27,1 | 1,55 |
| <i>T. candida</i> P5 | 0 | 0,9 | 27,0 | 15,0 | 12,0 | 1,87 |
| | 100 | 3,2 | 60,0 | 21,3 | 38,7 | 1,69 |
| <i>P. ohmeri</i> P32 | 0 | 1,0 | 6,2 | 4,6 | 1,6 | 3,28 |
| | 100 | 2,5 | 34,4 | 15,5 | 18,9 | 3,26 |

Ауксотрофные по рибофлавино мутанты *P. guilliermondii* P7Г и P9A, *P. ohmeri* P32 и *T. candida* P5 предварительно выращивали в присутствии 50 мкг рибофлавина в 1 мл в течение двух суток, потом отмывали от витамина B_2 и ресуспендировали, соответственно, в средах с рибофлавином /100 мкг/мл/ и без него. Инкубация длилась 24 часа. За это время биомасса мутантов увеличивалась в среде с рибофлавином в 3-4 раза, а в среде без витамина B_2 рост был незначительный. Содержание флавинов в клетках, инкубируемых без рибофлавина, уменьшалось в 4-6 раз. Мы не обнаружили прямой корреляции между изменением биомассы мутантов, инкубируемых в среде без рибофлавина, и снижением концентрации флавинов в клетках. Клетки мутантов с высоким и низким внутриклеточным содержа-

нием флавинов обладали одинаковой рибофлавинсинтетазной активностью.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у исследованных видов дрожжей синтез рибофлавинсинтетазы не регулируется флавидами.

Закономерности регуляции образования ферментов биосинтеза рибофлавина у дрожжей, установленные нами впервые на рибофлавинсинтетазе, были в дальнейшем подтверждены при изучении фермента первого этапа флавиногенеза — ГТФ циклогидролазы [Шавловский и соавт., 1977]. Очевидно железо, а не флавины, принимает участие в системе репрессии ферментов флавиногенеза.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы определения рибофлавинсинтетазной активности у различных видов дрожжей в экстрактах, а также *in situ*. Важным условием для обнаружения и стабильного определения рибофлавинсинтетазной активности в экстрактах флавиногенных видов дрожжей является присутствие в реакционной смеси сильных восстановителей — меркаптоэтанола или дитиотрейтола.

Определение активности *in situ* требует меньше времени и клеточного материала, что важно при проведении многосерийных анализов.

2. Зависимость скорости рибофлавинсинтетазной реакции от исходной концентрации субстрата имеет гиперболический характер. K_m для рибофлавинсинтетазы дрожжей *P. guilliermondii*, выращенных в среде с высоким и низким содержанием железа, близки между собой и характеризуются величинами $1,5 \times 10^{-5} M$ и $1,8 \times 10^{-5} M$, соответственно. K_m для этого фермента из железнедефицитных клеток *T. candida* равняется $2,5 \times 10^{-5} M$.

3. pH-оптимум для рибофлавинсинтетазы дрожжей *P. guilliermondii* и *T. candida* лежит в зоне 7,0–7,5, а температурный оптимум в зоне 37–40°. Рибофлавинсинтетаза клеток *T. candida* быстрее инактивируется под влиянием температуры и в процессе инкубации с субстратом, чем фермент из *P. guilliermondii*.

4. Рибофлавин не ингибировал рибофлавинсинтетазу дрожжей *P. guilliermondii*, *P. oulteri*, *T. candida* и *S. utilis*, однако угнетал активность этого фермента в экстрактах *S. cerevisiae*.

ФМН и ДАД также не оказывали ингибирующего действия на рибофлавинсинтетазу *P. guilliermondii* и *T. candida*.

5. Исследована рибофлавинсинтетазная активность в клетках флавиногенных видов дрожжей *P. guilliermondii*, *T. candida*, *Schw. occidentalis* и нефлавиногенных видов *S. utilis*, *S. pulcherrima* и *P. omeri*, выращенных в средах с высоким и низким содержанием железа. В клетках дрожжей, у которых синтез рибофлавина возрастал при понижении концентрации ионов железа в среде, обнаружена прямая корреляция между уровнями рибофлавинсинтетазы и флавиногенной активностью.

Рибофлавинсинтетазная активность в железонедеятельных клетках слабых продуцентов витамина B₂ была такой же или более низкой чем в богатых железом клетках.

6. В процессе роста флавиногенных дрожжей в среде с высоким содержанием железа активность рибофлавинсинтетазы изменялась незначительно. При культивировании в железонедеятельной среде активность этого фермента увеличивалась по мере нарастания дефицита железа в клетках и достигала максимума в ранней стационарной фазе роста. В этих условиях активность рибофлавинсинтетазы увеличивалась в клетках *Schw. occidentalis* в 8 раз, *P. guilliermondii* в 9 раз и *T. candida* в 24 раза.

7. Увеличение рибофлавинсинтетазной активности у дрожжей *P. guilliermondii* и *T. candida* можно вызвать путем инкубации богатых железом клеток с хелатообразующими агентами, обладающими высоким средством к этому металлу, такими как о-фенантролин и α, α -дипиридил.

8. Ионы железа не ингибируют активности рибофлавинсинтетаз дрожжей *P. guilliermondii* и *T. candida*. Смесь автолизатов богатых и бедных железом клеток этих видов дрожжей проявляла рибофлавинсинтетазную активность, соответствующую среднему арифметическому активности обоих препаратов. Следовательно, в богатых железом клетках *P. guilliermondii* и *T. candida* отсутствовали высокомолекулярные и низкомолекулярные соединения, способные ингибировать рибофлавинсинтетазу.

9. Циклогексимид или дефицит незаменимой аминокислоты полностью предотвращали увеличение рибофлавинсинтетазной активности в клетках *P. guilliermondii* и *T. candida* как в процессе роста в железонедеятельной среде, так и при инкубации их с

α, α -дипиридином. Таким образом доказано, что железо принимает участие в регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы у дрожжей *P. guilliermondii* и *T. candida* и при возникновении сверхсинтеза флавинов в условиях дефицита железа происходит дерепрессия этого фермента.

IC. Ингибиторы транскрипции - рибомицин и профлавин угнетали дерепрессию рибофлавинсинтетазы в клетках *T. candida* дикого типа, актиномицин D был неаффективный. При помощи УФ лучей получен мутант *T. candida* м5Т-2, обладающий повышенной чувствительностью к актиномицину D. Этот антибиотик сильно угнетал дерепрессию рибофлавинсинтетазы в клетках мутанта *T. candida* м5Т-2, обладающего повышенной чувствительностью /определяемой по ростовой реакции/ к актиномицину D. Эти данные говорят в пользу предположения, что железо принимает участие в регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы у флавиногенных дрожжей на уровне транскрипции.

II. Повышение содержания флавинов в клетках и протопластах *P. guilliermondii* и *S. utilis* вследствие инкубации их с высокими концентрациями рибофлавина, а также резкое снижение содержания флавинов в клетках ауксотрофных по рибофлавину мутантов *P. guilliermondii* P7Г и P9А, *P. ovalis* P32 и *T. candida* P5 при инкубации их в среде без витамина B₂, существенно не влияло на рибофлавинсинтетазную активность. Следовательно, у изученных видов дрожжей флавины не принимают участия в регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы.

Основные результаты работы опубликованы в статьях:

1. G.M. Shevlivsky, E.M. Logvinenko and V.M. Trach. Derepression of riboflavin synthetase during flavin overproduction in *Candida utilis*. Abstr. Commun. 7th Meet. Eur. Biochem. Soc., 128, 1971.
2. Г.М. Шавловский, Е.М. Логвиненко и В.М. Трач. дослідження активності рибофлавинсинтетазы у дріждзів при різній інтенсивності флавіногенезу. Мікробіол. журн., т. 33, № 6, 686-687, 1971.
3. Г.М. Шавловский, Е.М. Логвиненко, В.М. Трач. Изменения активности рибофлавинсинтетазы при различных уровнях флавиногенеза у некоторых видов дрожжей *Candida*. Докл. АН СССР, т. 203,

- №1, 241-244, 1972.
4. Е.М.Логвиненко, В.М.Трач, Г.М.Шавловский. Влияние железа на синтез рибофлавинсинтетазы у дрожжей *Pichia guilliermondii*. Всесоюзная конференция по регуляции биохимических процессов у микроорганизмов. Тезисы докладов, Путино-на-Оне, 103-105, 1972.
 5. G.M.Shavlovsky, E.M.Logvinenko, V.M.Trach, L.V.Koltun. The role of flavinase and iron in regulation of flavinogenesis in yeasts. Proc. of the Third Intern. Special. Symp. on Yeasts, Otaniemi, Finland, Part I, Abstr., 70-71, 1973.
 6. Е.М.Логвиненко, Г.М.Шавловский, В.М.Трач и В.А.Сибирный. Роль флавинов в регуляции синтеза рибофлавинсинтетазы у *Pichia guilliermondii* и *Candida utilis*. Микробиология, т.42, №6, 1008-1013, 1973.
 7. G.M.Shavlovsky, E.M.Logvinenko, W.M.Trach und E.S.Senjuta. Die regulation der synthese der riboflavinsynthetase durch eisen in flavinogenen hefen. Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP), Bd. 167, 379-387, 1975.
 8. Г.М.Шавловский, Е.М.Логвиненко, Д.В.Ласка, В.М.Трач, Л.В.Колтун, В.Е.Кашенко. О механизмах регуляции биосинтеза флавинов у дрожжей *Pichia guilliermondii*. У съезд Всесоюзного микробиологического общества. Тезисы докладов, Ереван, 32-33, 1975.
 9. Е.М.Логвиненко, В.М.Трач, Л.В.Колтун, Г.М.Шавловский. О регуляции флавиногенеза у дрожжей по типу отрицательной обратной связи. Труды IV съезда микробиологов Украины, "Наукова думка", Киев, 8-9, 1975.
 10. Г.М.Шавловский, Е.М.Логвиненко, В.М.Трач, Л.В.Колтун. Об участии механизмов ретроингибирования и репрессии в регуляции флавиногенеза у дрожжей. Сб. "Витамины", 9, "Наукова думка", Киев, 99-104, 1976.
 11. В.М.Трач, Г.М.Шавловский. Сверхсинтез рибофлавина дрожжами *Schwanniomyces occidentalis*. Докл. АН УССР, "Б", №4, 352-354, 1976.
 12. Е.М.Логвиненко, В.М.Трач, В.Е.Кашенко, А.Е.Закальский, Л.В.Колтун и Г.М.Шавловский. Изучение активности некоторых ферментов флавиногенеза у дрожжей *in situ*. Биохимия, т.42, №9, 1649-1654, 1977.
 13. Г.М.Шавловский, В.П.Харова, И.Ф.Шелокова, В.М.Трач, А.А.Си-

Овчинный, Г.П. Кашеминская. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii*. Прикл. биохим. и микробиол., т.14, №2, 184-189, 1978.