

В. ЯСКА

ЗАВИСИМОСТЬ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЗЕЛеной ВОДОРОСЛИ *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* (TURP.) BRÉB. ОТ ИСТОЧНИКА АЗОТНОГО ПИТАНИЯ

Проведенные нами ранее исследования влияния источника азотного питания на химический состав водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorococcum botryoides* показали [6], что количество общего азота у названных водорослей, выращенных на средах с аммонийным или карбамидным азотом, было на 1—2% выше, чем у выращенных на среде с нитратным азотом, причем содержание в них углеводов и липидов не изменялось. М.-Л. Шампиньи [8] показала, что белок водоросли *Chlorella pyrenoidosa* при карбамидном питании содержит значительно больше лизина, аргинина и лейцинов, чем при нитратном.

Исходя из этого, мы высказали предположение [6], что повышение количества общего азота водорослей при аммонийном или карбамидном питании связано не с повышением содержания общего белка, а с увеличением содержания в нем богатых азотом основных аминокислот. Чтобы обосновать наше предположение, мы занялись исследованием зависимости аминокислотного состава *Scenedesmus quadricauda* от источника азотного питания.

Методика

Накопительная культура водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. выращивалась на основной питательной среде [5] с 1,0 г/л нитрата калия в качестве источника азота. Для посевов брали на 1 л среды по 20 мл накопительной культуры, содержащей по 10—15 мг сухого вещества водорослей и 3,5—4 мг азота. Для азотного питания ежедневно добавляли на каждый литр культуры по 20 мг азота в виде нитрата калия, бикарбоната аммония или мочевины. Влияние этих веществ на количество общего азота, углеводов и аминокислот изучали после двенадцатидневного культивирования при круглосуточном люминесцентном освещении и перемешивании продуванием воздуха, обогащенного углекислым газом. Условия культивирования и методика определения содержания общего азота и углеводов подробно описаны в нашей ранее опубликованной работе [5].

При определении аминокислотного состава отцентрифугированные из 50 мл культуры клетки водорослей гидролизывали в запаянных стеклянных ампулах с 15 мл 6 н. соляной кислоты в течение 24 часов при 105°C. Разбавленные дистиллированной водой гидролизаты обесцвечивали небольшим количеством активированного угля. Осадок гуминов и угля отфильтровывали и промывали дистиллированной водой до отрицательной реакции на хлориды. Фильтраты выпаривали на водяной бане до объема 3—5 мл и затем высушивали досуха в вакуум-эксикаторе над едким натром и безводным хлористым кальцием. Сухой остаток растворяли в 1—2 мл 10%-ного изопропилового спирта и определяли вес раствора.

Разделение аминокислот проводили одномерной хроматографией на бумаге Ленинградская «Б» восходящим способом. На хроматографическую бумагу наносили стеклянным капилляром 2—10 мг гидролизата, точное количество которого определяли взвешиванием капилляра на микроаналитических весах (с точностью до 0,01 мг) до и после нанесения гидролизата на бумагу. Для разделения аминокислот служили следующие системы растворителей: 1) *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (4:1:1) с двух- или трехкратным пропусканием для разделения цистина, лизина + гистидина, аргинина, аланина, тирозина, валина + метионина, фенилаланина и изолейцина + лейцина; 2) *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (40:15:5) с четырехкратным пропусканием для разделения аспаргиновой кислоты, серина, глицина, глютаминовой кислоты и треонина.

Высушенные при комнатной температуре хроматограммы пропускали через 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне, содержащем 1% уксусной кислоты, и после улетучивания ацетона проявляли в течение 30 минут в насыщенном водяными парами шкафу при 65° [2].

Окрашенные пятна аминокислот вырезали, и краситель экстрагировали в пробирках с 6 мл 0,1%-ного раствора $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 75%-ном этиловом спирте в течение 20—24 часов в темноте. Растворы фотометрировали на ФЭК-56 с зеленым светофильтром ($\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ мкм}$) в кюветах толщиной 10 мм. Содержание отдельных аминокислот вычисляли на основании данных калибровочных графиков. Для их построения стандартную смесь аминокислот хроматографировали и полученные хроматограммы подготавливали к фотометрированию параллельно с испытуемыми гидролизатами. Средние данные вычисляли из 6—8 параллельных определений, причем ошибка в большинстве случаев находилась в пределах 3—10%. Количество цистина и гистидина не определяли из-за их низкого содержания в гидролизатах и недостаточной чувствительности реакции этих аминокислот с нингидрином.

В некоторых параллельных опытах гидролиз водорослей проводили по методу Ф. Драверта и К.-Х. Реутера [9] 6 н. соляной кислотой в присутствии фенола для предотвращения образования гуминов. Полученные данные о содержании аминокислот в пределах ошибки метода совпадали с данными, полученными без применения фенола. Содержание азота в осадке гуминов составляло 4,3—6,4% от общего азота навески водорослей. Следовательно, при проведении гидролиза водорослей 6 н. соляной кислотой образование гуминов и потери аминокислот были незначительными даже в присутствии значительных количеств углеводов.

Результаты исследований

Данные о продуктивности культур и содержании общего азота и углеводов *Scenedesmus quadricauda* приведены в табл. 1.

Таблица 1
Влияние различных источников азота на химический состав зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda*

	Источники азота		
	KNO_3	NH_4HCO_3	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$
Сухой вес, г/л	1,80	1,52	1,76
Общий азот, %	6,50	8,40	9,30
Белки, $N_{\text{общ}} \times 6,25\%$	40,5	52,4	58,0
Углеводы, %	39,5	28,3	25,7
Зола, %	7,2	6,6	6,1

При сравнительном сопоставлении этих данных с ранее полученными выявилось, что содержание общего азота названной водоросли, выращенной на среде с нитратным азотом в ноябре (табл. 1) и в октябре [7], было значительно ниже, а содержание углеводов соответственно выше, чем при выращивании ее в апреле [5] или июне [6]. При

аммонийном или карбамидном питании содержание общего азота было в ноябре также ниже, чем в июне [6], однако повышения содержания углеводов при этом не наблюдалось. В результате этого содержание углеводов у осенних культур *Scenedesmus quadricauda* при нитратном питании было выше, чем при аммонийном или карбамидном. Это, однако, противоречит ранее полученным нами данным [6]. Содержание общего азота, как видно из табл. 1, было при аммонийном или карбамидном питании водоросли на 1,9—2,8% выше, чем при нитратном питании, что вполне согласуется с ранее полученными нами результатами [6] и данными других авторов [1, 8].

Причины обнаруженного несоответствия сезонного изменения содержания общего азота и углеводов при аммонийном и карбамидном питании *Scenedesmus quadricauda* в настоящее время еще не установлены и требуют дальнейшего экспериментального исследования.

Результаты количественного определения аминокислот *Scenedesmus quadricauda*, выращенной на средах с нитратным, аммонийным или карбамидным азотом в ноябре, приведены в табл. 2, из которой видно, что

Таблица 2

Влияние различных источников азота на аминокислотный состав зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda*
(в процентах от сухого вещества водоросли)

Аминокислоты	Источники азота		
	KNO ₃	NH ₄ HCO ₃	CO(NH ₂) ₂
Лизин + гистидин	3,4±0,2	3,6±0,3	4,1±0,1
Аргинин	2,2±0,2	5,2±0,2	6,5±0,2
Аспаргиновая кислота	3,3±0,2	3,5±0,2	2,6±0,3
Серин	1,9±0,3	1,5±0,2	1,5±0,1
Глицин	2,5±0,2	2,6±0,2	2,9±0,2
Глутаминовая кислота	4,8±0,3	5,1±0,2	5,1±0,2
Треонин	2,0±0,1	1,8±0,1	1,8±0,2
Аланин	3,2±0,2	2,8±0,1	2,9±0,1
Тирозин	1,6±0,3	1,2±0,2	1,8±0,3
Валин + метионин	2,2±0,1	2,4±0,3	2,5±0,2
Фенилаланин	2,1±0,2	2,5±0,3	1,8±0,3
Лейцин + изолейцин	4,8±0,2	5,2±0,3	5,3±0,2
Сумма аминокислот	34,0	37,4	38,8
Азот аминокислот	4,70	5,66	6,18
Азот аргинина	0,71	1,67	2,09

при аммонийном или карбамидном питании *Scenedesmus quadricauda* содержание аргинина возрастало соответственно в 2,4 и 2,9 раза по сравнению с нитратным питанием. Содержание остальных аминокислот, в зависимости от источника азота, существенно не изменялось. Таким образом, общее суммарное количество азота в аминокислотах водоросли изменялось в зависимости от источника азота лишь за счет увеличения содержания аргинина как одной из основных аминокислот.

По данным литературы [1, 8, 11], содержание белкового азота протококковых водорослей, включая азот нуклеопротеидов, составляет 90—97% от общего азота независимо от источника азотного питания. Как показывают наши данные (табл. 1 и 2), вычисление приблизительного содержания сырого белка путем умножения процентного содержания общего азота на фактор пересчета 6,25 применимо только в слу-

чае питания водоросли нитратным азотом, но не аммонийным или карбамидным. Накопление богатой азотом аминокислоты аргинина при аммонийном или карбамидном питании водоросли приводит к повышению в суммарном белке содержания азота и к снижению фактора пересчета от азота на белок.

По данным литературы, аминокислотный состав протококковых водорослей может подвергаться значительным изменениям в зависимости от условий углеродного [3, 4] или азотного [8] питания. Л. Фоуден [10] изучал зависимость аминокислотного состава суммарного белка водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенной на среде с нитратом аммония, от возраста культуры. По мере увеличения возраста, сопровождавшегося постепенным переходом от аммонийного питания на нитратное, он установил небольшое снижение содержания аргинина и повышение количества гистидина, между тем как содержание остальных аминокислот существенно не изменялось [10]. Данные М.-Л. Шампиньи [8] показали, что при карбамидном питании *Chlorella pyrenoidosa* накопление основных аминокислот и лейцинов сопровождалось понижением содержания остальных аминокислот [8]. Однако в наших опытах с водорослью *Scenedesmus quadricauda* такого явления не наблюдалось.

Учитывая отмеченные выше различия в результатах разных авторов, можно предположить, что источник азота при культивировании различных видов протококковых водорослей по-разному влияет на аминокислотный состав белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баславская С. С., Феофарова Н. Б. Некоторые данные о росте и составе *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. в условиях аммиачного и нитратного питания. Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки, 1959, 1, 147—152.
2. Зайцева Г. Н., Тюленева Н. П. Количественное определение аминокислот на хроматограммах посредством образования медных производных с нингидрином. Лабор. дело, 1958, 4, 3, 24—30.
3. Пахомова М. В., Серенков Г. П. Влияние света и темноты на химический состав зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda*. Вестн. Моск. ун-та. Сер. биол., 1962, 4, 44—47.
4. Пахомова М. В., Серенков Г. П. Влияние света и темноты на химический состав зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus* Kütz. Биохимия, 1963, 28, 5, 808—815.
5. Яаска В. Влияние режима азотного питания на химический состав некоторых видов зеленых водорослей. Изв. АН ЭССР. Сер. биол., 1964, 13, 1, 33—39.
6. Яаска В. Влияние различных источников азота на химический состав зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. и *Chlorococcum botryoides* Rab. Изв. АН ЭССР. Сер. биол., 1964, 13, 2, 123—125.
7. Яаска В. Зависимость продуктивности и химического состава некоторых штаммов зеленых водорослей от азотистого питания. Изв. АН ЭССР. Сер. биол., 1965, 14, 1, 49—56.
8. Champigny M.-L. Etude de la croissance l'algues monocellulaires en cultures accélérées (Chlorelles et espèces voisines). IV — Variations de la composition en acides aminés de *Chlorella pyrenoidosa*, selon la nature de l'aliment azote. J. rech. Centre nat. rech. scient., 1957, 38, 72—76.
9. Drawert F., Reuther K.-H. Phenol als Inhibitor der Huminbildung bei der Proteinhydrolyse. Angew. Chemie, 1963, 75, 3, 169.
10. Fowden L. The effect of age on the bulk protein composition of *Chlorella vulgaris*. Biochem. J., 1952, 52, 2, 310—314.
11. Kowalik W. Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlorellen. Planta, 1962, 58, 4, 337—365.

V. JAASKA

ROHEVETIKA *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* (TURP.) BRÉB.
AMINOHAPPELISE KOOSTISE OLENEVUS ERINEVATE
LÄMMASTIKUÜHENDITEGA TOITUMISEST

Resümee

Kvantitatiivse paberchromatograafilise meetodiga uuriti erinevate lämmastikuühenditega toitumise mõju rohevetika *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. aminohappelisele koostisele, kusjuures paralleelkatsetes kasutati kaaliumnitraati, ammoniumvesinikkarboonaati ja karbamiidi.

Katsetulemused näitasid, et *Scenedesmus quadricauda* sisaldab ammoniumsoolaga või karbamiidiga toitumise puhul vastavalt 2,4 ja 2,9 korda rohkem arginiini kui nitraatsel toitumisel. Ülejäänud aminohapete sisaldus ei sõltunud oluliselt toitumisest kasutatud lämmastikuühendist. Valgu- ja üldlämmastiku-sisaldus vetikas suurenevad ammoniumsoola ja karbamiidiga toitumise korral lämmastikurikka aminohappe arginiini akumulierimise tulemusena.

Sügisperioodil kultiveerituna sisaldas *Scenedesmus quadricauda* vähem lämmastikku kui kevadel [5] või suvel [6]. Süsivesikute sisalduse suurenemine toimus sügisel ainult nitraatsel toitumisel, kuid mitte ammoniumsoola või karbamiidi kasutamise korral. Tähelestatud erinevuste põhjused on selgumata.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse
11. V 1964

V. JAASKA

THE DEPENDENCE OF THE AMINO ACID COMPOSITION OF THE GREEN
ALGA *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* (TURP.) BRÉB. ON NUTRITION
WITH DIFFERENT NITROGEN SOURCES

Summary

The amino acid composition of the green alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. depending on nutrition with different nitrogen sources (potassium nitrate, ammonium bicarbonate and urea) has been studied by quantitative paper chromatography.

It has been shown, as a result of this study, that *Scenedesmus quadricauda*, when grown with either ammonia or urea nitrogen, contained 2.4 and 2.9 times respectively more arginine as compared with nitrate nutrition. The content of other amino acids did not depend considerably on the nitrogen source used. The increase in nitrogen-rich amino acid arginine appeared to be responsible for an increase in the protein and total nitrogen content of the alga in the case of its ammonia and urea nutrition.

The total nitrogen content of the alga, when cultivated in autumn, was significantly lower than that in spring [5] or in summer [6]. The carbohydrate content increased in autumn on nitrate medium only, but not on ammonia or urea medium. The reason for this variation remained unsolved in the present study.

Academy of Sciences of the Estonian S.S.R.,
Institute of Zoology and Botany

Received
May 11th, 1964