

УДК 577.15.591.8

К. Р. СТЕПАНЯН, С. П. ОГАНЕСЯН, М. А. ДАВТЯН

АМИДАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* ВКМ-У-42

Бесклеточный экстракт дрожжей обладает глутаминазой и особенно выраженной аспарагиназой активностью. Максимальная активность обоих ферментов проявляется в фосфатном буфере (для глутаминазы рН 7,5, для аспарагиназы—8,5—9,5).

Малат оказывает ингибирующее влияние на глутаминазную активность, аспарагиназная активность слабо ингибируется малатом и N-ацетил-глутаматом.

Биологическая роль амидаз пока не выяснена. Очевидно, они обеспечивают утилизацию из питательной среды глутамина и аспарагина, используемых как в качестве источника азота, так и углерода [13, 18, 19]. Можно допустить, что глутаминазы и аспарагиназы регулируют оптимальный уровень важнейших амидов (главным образом глутамина), участвующих в биосинтезе некоторых важных соединений клетки (пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, триптофан, гистидин и др.).

Интерес к глутаминазе и особенно аспарагиназе в последние годы повысился в связи с открытием их канцеролитического действия [9, 10, 21, 22, 25, 26]. Однако оказалось, что аспарагиназы не всех микроорганизмов обладают подобным действием, в частности аспарагиназа, выделенная из *C. utilis*, не эффективна при лечении лимфомы [24].

Глутаминазы и аспарагиназы различных микроорганизмов различаются рядом свойств (K_m , оптимум рН, молекулярный вес, регуляторные свойства и др.) [1, 2, 4, 11, 12, 20, 23]. Доказано наличие у некоторых микроорганизмов изоэнзимов, обладающих как глутаминазой, так и аспарагиназой активностью [5, 23]. Около 12% исследованных дрожжей обладают глутаминазой или аспарагиназой активностью, причем из 237 исследованных штаммов дрожжей рода *Candida* у 19 была обнаружена аспарагиназная, а у 5—глутаминазная активность [15].

Перед нами стояла задача детально изучить глутаминазную и аспарагиназную активность у дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ-У-42.

В одной из работ [8] было показано, что у изучаемых дрожжей при усвоении аммиака или различных аминокислот одним из первых синтезирующихся азотсодержащих соединений является глутамин.

Материал и методика. Объектом исследований служили дрожжи *Candida guilliermondii* ВКМ-У-42, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР (проф. В. И. Кудряцев). Дрожжи выращивались в среде следующего состава: глюкоза—10 г, KH_2PO_4 —1,23 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,625 г, $(NH_4)_2SO_4$ —3,10 г, NaCl—0,125 г, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ —0,125 г, биотин—8 мкг на 1 л водопроводной воды. Посевной материал выращивался на круговой качалке (200 об/мин) в течение 20—24 часов при $30 \pm 1^\circ C$ в условиях интенсивного аэрирования.

Гомогенизация проводилась в стеклянном гомогенизаторе типа Элведжем-Потера в присутствии Al_2O_3 в количестве, примерно равном количеству биомассы. Гомогенат центрифугировался при 2700g 30 минут. Осадок, содержащий Al_2O_3 и неразрушенные клетки, отбрасывался, а супернатант повторно центрифугировался при 25000 g в течение 30 минут. Полученные надосадочная жидкость и осадок использовались в качестве ферментного препарата.

Активность фермента определялась путем инкубирования ферментного препарата в течение 60 мин при 37°C в атмосфере воздуха в присутствии L-глутамина или L-аспарагина с последующим определением отщепившегося NH_3 микродиффузионным методом Зеленгсона в модификации Силаковой и сотр. [7].

Инкубационная смесь (4 мл) состояла из ферментного препарата (в котором содержалось 1—2,5 мг белка), глутамина или аспарагина (42 мкмоль) и 0,1М К, Na фосфатного буфера (рН для глутаминазы—7,5; для аспарагиназы—8,5).

Результаты и обсуждение. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что бесклеточный экстракт дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ-У-42 обладает глутаминазой и особенно выраженной аспарагиназой активностью. Аспарагин расщепляется примерно в 6 раз интенсивнее глутамин. Активность указанных ферментов, как наглядно показывают приведенные в табл. 1 данные, имеет цитоплазматическую локализацию. Исходя из этого, в дальнейших экспериментах применялся экстракт, полученный однократным центрифугированием гомогената при 25000 g.

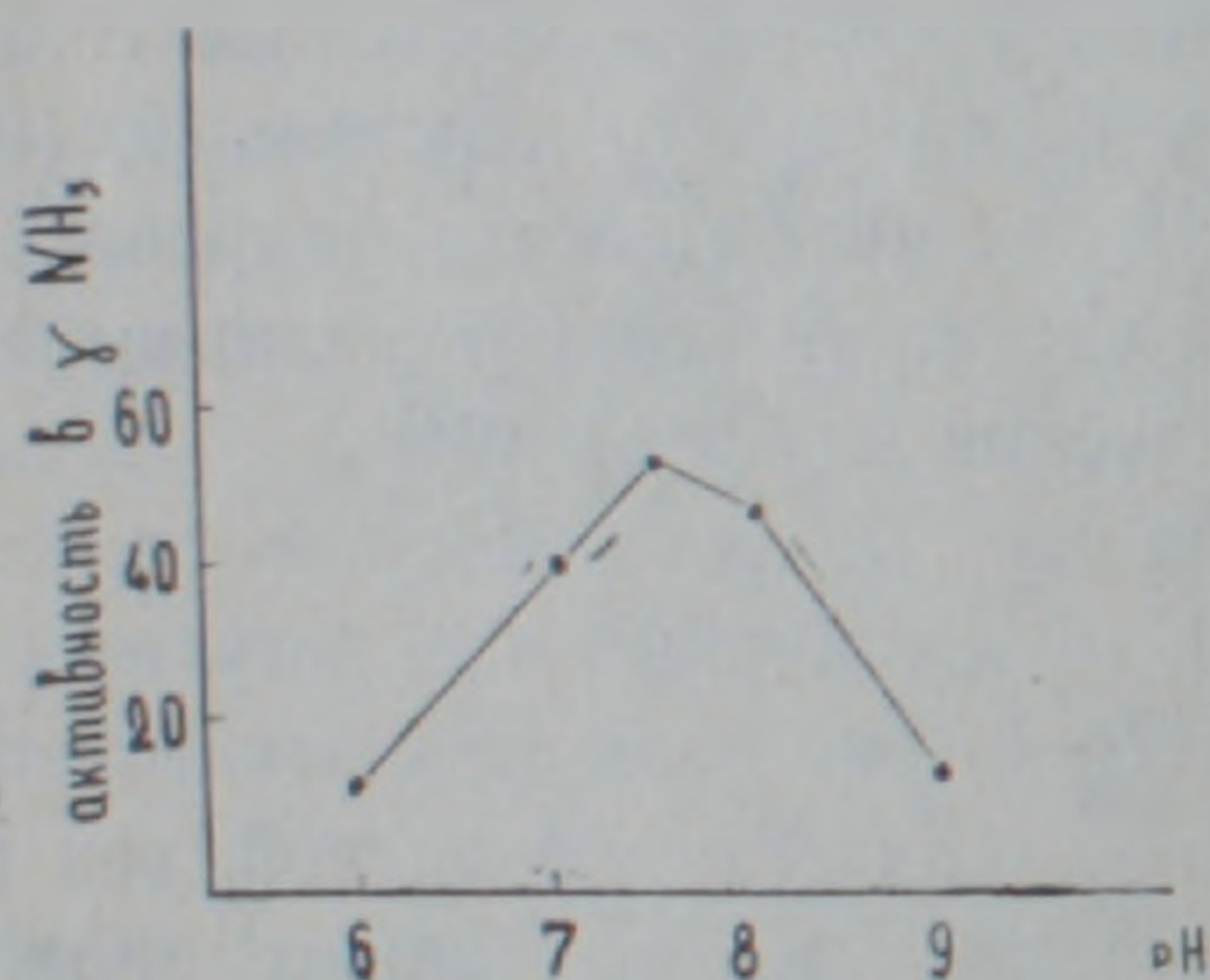


Рис. 1. Зависимость глутаминазной активности от рН, γNH_3 .

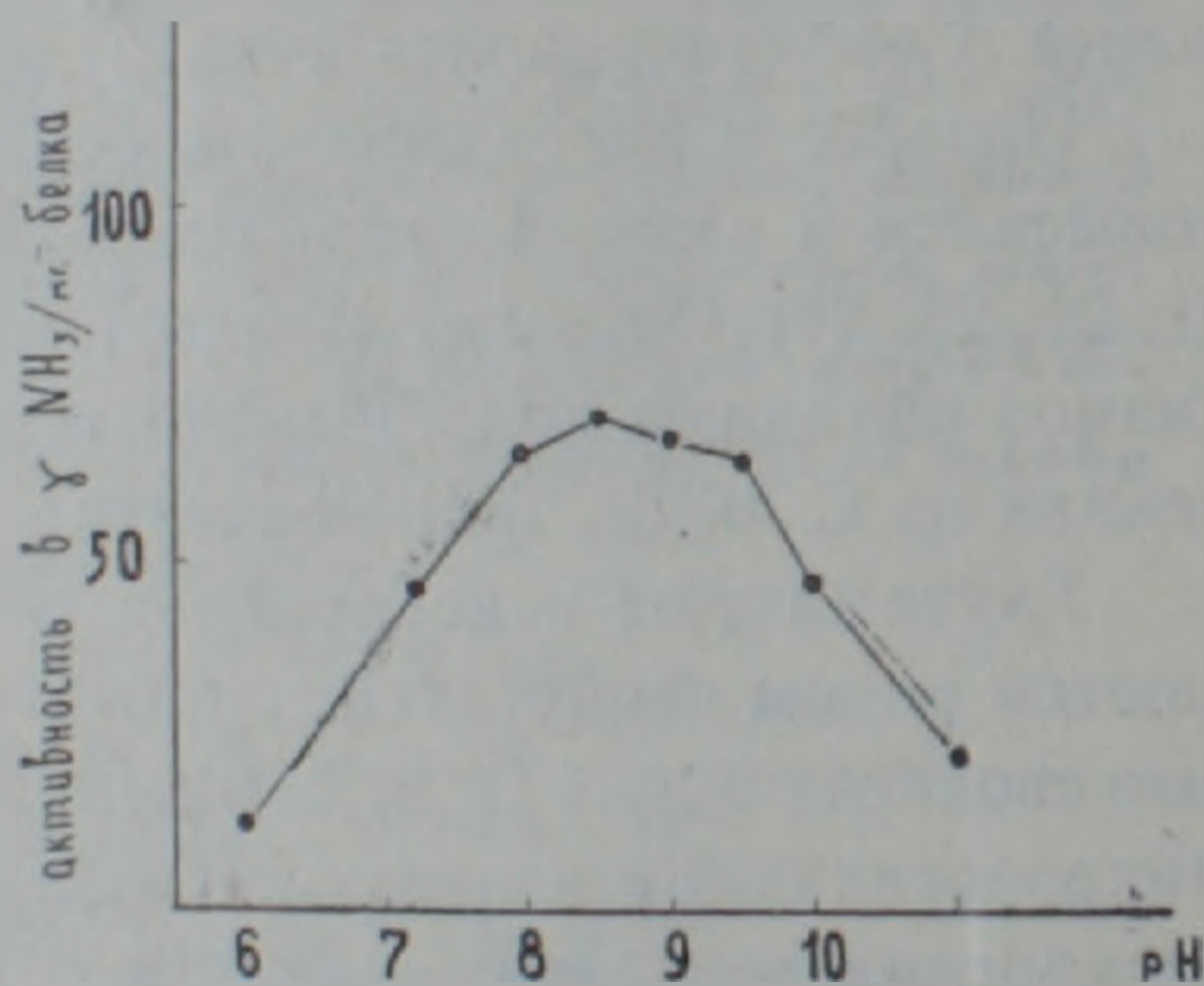


Рис. 2. Зависимость аспарагиназной активности от рН, γNH_3 /мг белка.

Таблица 1

Активность глутаминазы и аспарагиназы дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ-У-42 после центрифугирования гомогената при 25000g, γNH_3 / мг белка

Фракции	Глутаминаза	Аспарагиназа
Надосадочная жидкость	$8 \pm 0,7$ (5)	108 ± 5 (4)
Осадок	$1,5 \pm 0,1$ (5)	4 ± 1 (4)

С целью выяснения оптимальных условий проявления активности указанных ферментов изучалось влияние различных буферных систем. Приведенные в табл. 2 данные показывают, что максимальная активность обоих ферментов проявляется в фосфатном буфере, который и был использован в дальнейших экспериментах.

Таблица 2
Активность глутаминазы и аспарагиназы в различных буферных системах, $\gamma\text{NH}_3/\text{мг}$ белка

Буферы (0,1M)	Глутаминаза	Аспарагиназа
К. Na фосфатный	12 ± 2	67 ± 5
Трис — HCl	8 ± 1	63 ± 8
Верональный	$7 \pm 1,3$	$58,5 \pm 7$

При изучении зависимости активности от концентрации ионов H^+ оказалось, что оптимум pH для глутаминазы—7,5 (рис. 1), а для аспарагиназы — 8,5—9,5 (рис. 2). Таким образом, по оптимуму pH глутаминаза исследуемого нами объекта близка к *Saccharomyces cerevisiae*. [1], что же касается аспарагиназы, то, согласно имеющимся литературным данным, оптимум ее у микроорганизмов имеет широкие пределы (от 6 до 9). Так, у *Pseudomonas GG-13* оптимум pH для глутаминазы равен 6,6, а для аспарагиназы — 8,2 [23].

Выявлена линейная зависимость активности амидаз от количества белка (до 5,5 мг) в инкубационной смеси (рис. 3 и 4).

Известно, что глутаминазная активность микроорганизмов зависит от фазы роста. Так, глутаминазная активность клеток *Clostridium wel-*

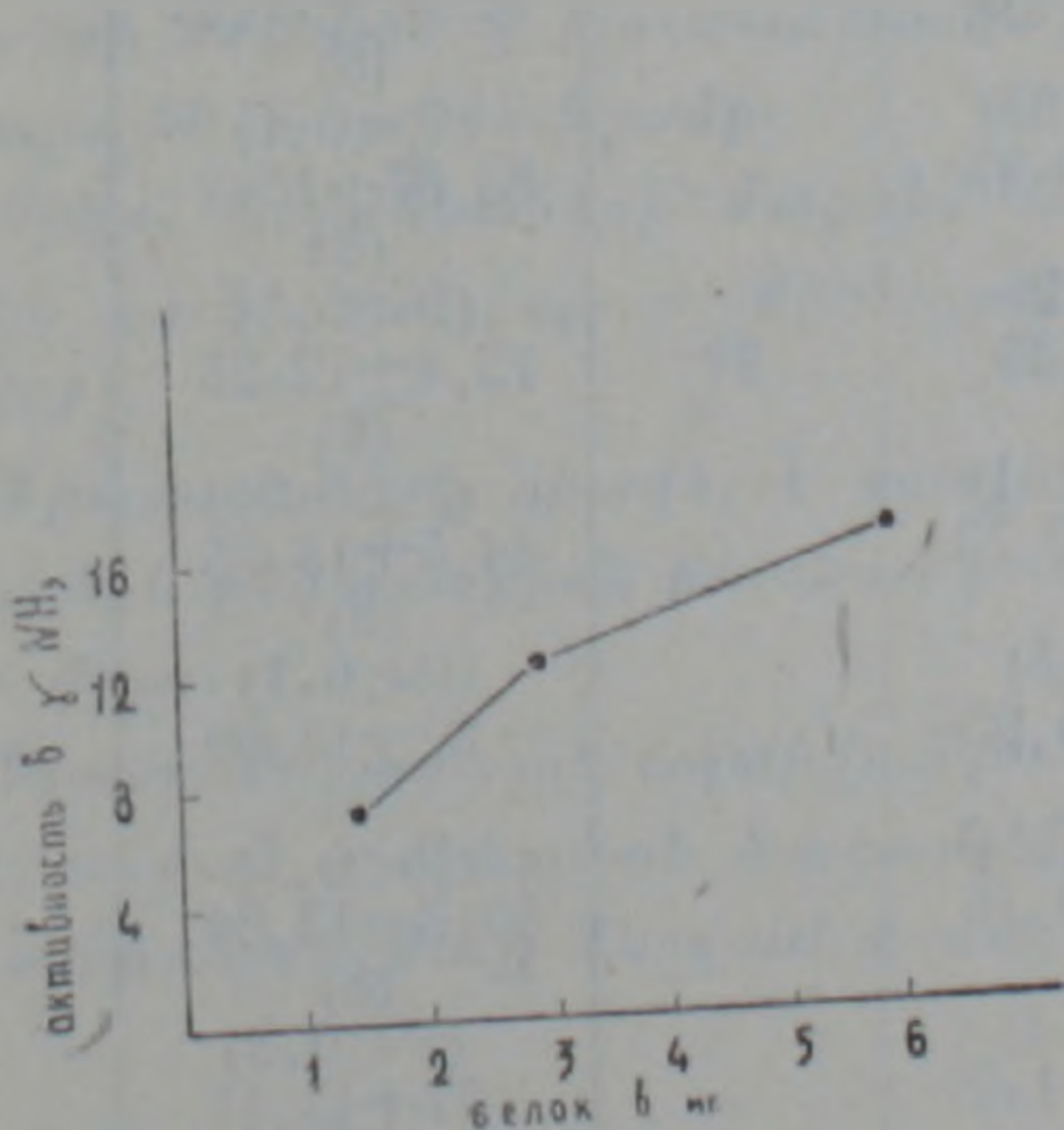


Рис. 3.

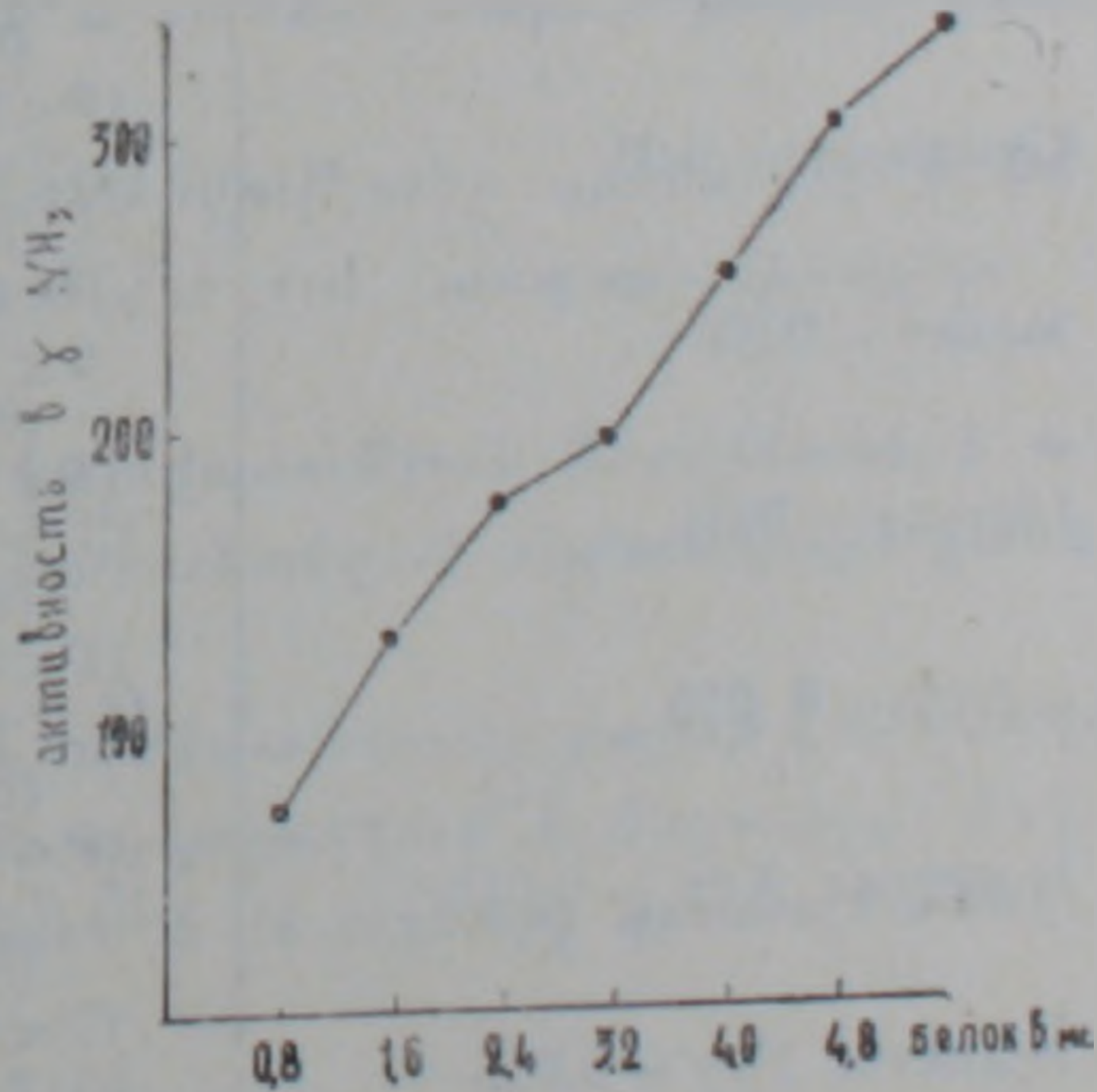


Рис. 4.

Рис. 3. Зависимость глутаминазной активности от количества белка в инкубационной смеси.

Рис. 4. Зависимость аспарагиназной активности от количества белка в инкубационной смеси.

chii низка на начальных стадиях роста, она достигает максимума через 2 часа после окончания роста [14]. У *E. coli* она также проявляется лишь после окончания экспоненциальной фазы роста [12], а у *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ-У-381 — именно на стадии усиленного роста [1]. У

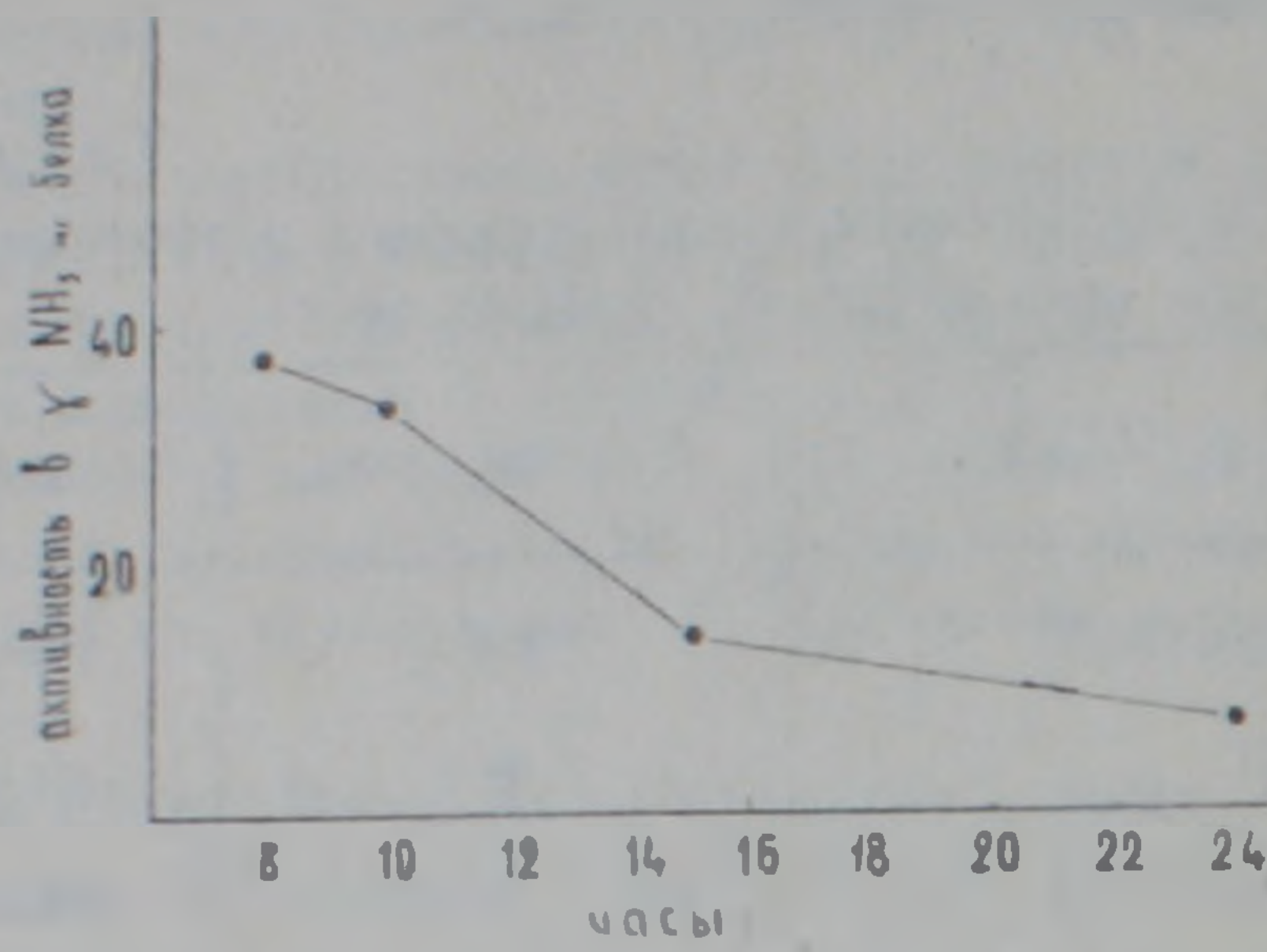


Рис. 5. Зависимость глутаминазной активности от фазы роста биомассы. NH₃/мг белка.

Таблица 3

Влияние компонентов ТКЦ, L-Асп N-ацетил-Асп, N-ацетил Глу на активность глутаминазы и аспарагиназы

Добавленные вещества и их концентрации, моль	Глутаминаза		Аспарагиназа	
	активность	влияние ±, %	активность	влияние ±, %
Контроль	14.75±1,6 (8)		83,25±13,35 (8)	
Пируват — 0,03	14±1,3 (8)		82.46±12,91 (8)	
Сукцинат — 0,03	(P<0,05) 14,2±0,97 (8)		(P<0,1) 83,67±13,2 (8)	
Малат — 0,03	(P<0,2) 9±1,39 (8)	32	(P<0,1) 75,4±12,25 (8)	— 9,4
Цитрат — 0,03	(P<0,01) 13,5±0,73 (8)		(P<0,01) 84,5±13,26 (8)	
L-Асп — 0,015	(P<0,5) 16,2±1,95 (8)		(P<0,1) 82±13,68 (8)	
N-ацетил Асп — 0,015	(P<0,05) 15,7±2,16 (8)		(P<0,1) 83,6±13,64 (8)	
N-ацетил Глу — 0,015	(P<0,1) 16,2±1,2 (8)		(P<0,3) 77±13,11 (8)	
	(P<0,05)		(P<0,01)	— 7,5

S. guilliermondii ВКМ-У-42, как показывают данные рис. 5, максимальная активность наблюдается на начальных стадиях роста. Согласно литературным данным, в органах животных содержится

фосфатнезависимая глутаминаза, которая активируется компонентами трикарбонового цикла, некоторыми аминокислотами и их N-ацетил производными [6, 15].

Показано, что глутаминазы *C. welchii* ингибируется кислотами трикарбонового цикла в концентрациях выше 0,01 М [4].

Проведенные нами исследования (табл. 3) показали, что из испытанных соединений лишь малат оказывает ингибирующее влияние (на 32%) на глутаминазную активность изучаемых дрожжей. Аспарагиназная активность ингибируется слабо (менее 10%) малатом и N-ацетил-глутаматом.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и проблемная лабора-
тория сравнительной и эволюционной
биохимии

Поступило 3.11.1975 г.

Կ. Ի. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ս. Պ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

C. GUILLIERMONDII ВКМ-У-42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԱՄԻՆԱԶՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է *C. guilliermondii* ВКМ-У-42 խմորասնկերի անբջիջ մզվածքի գլուտամինազային և ասպարագինազային ակտիվությունները՝ կախված միջավայրի pH-ից, ինկուբացիոն խառնուրդում պարունակված սպիտակուցի քանակությունից և կենսազանգվածի աճման ֆազից:

Պարզվել է, որ *C. guilliermondii* ВКМ-У-42 խմորասնկերի անբջիջ մզվածքը օժտված է գլուտամինազային և համեմատաբար բարձր ասպարագինազային ակտիվությամբ:

Նրկու ֆերմենտների մաքսիմում ակտիվությունը դրսևորվել է ֆոսֆատային բուֆերում (գլուտամինազան pH 7,5-ում, ասպարագինազան՝ 8,5—9,5-ում):

Միաժամանակ դիտվել է գծային կախվածություն ֆերմենտների ակտիվության և ինկուբացիոն խառնուրդում պարունակված սպիտակուցի քանակության միջև:

Գլուտամինազային ակտիվությունը համեմատաբար բարձր է կենսազանգվածի աճման սկզբնական ֆազում: Այն արգելակվում է մալատով, իսկ ասպարագինազան թույլ ճնշվում է մալատով և N-ացետիլ գլուտամատով:

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдумаликов А. Х., Еременко В. В. Биохимия, 32, 363, 1967.
2. Козлов Е. А., Коваленко Н. А., Мардашев С. Р. Биохимия, 36, 4, 834, 1971.
3. Коваленко Е. А., Козлов Е. А., Герасимова А. В., Мардашев С. Р. Биохимия, 36, 6, 1198, 1971.

4. Мардашев С. Р., Соковнина Я. М. Микробиология, 34, 47, 1965.
5. Николаев А. Я., Соколов Н. Н., Мардашев С. Р. Биохимия, 37, 156, 1972.
6. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С. Вопр. биох. мозга. Ереван, 1969.
7. Силакова Л. Н., Тредш Г. П., Яковлева А. Вопр. мед. хим., 8, М., 1962.
8. Тер-Карпетян М. А., Багдасарян Е. Г., Навасардян Л. А., Степанян К. Р., Гогинян И. В. II Всесоюз. биохим. съезд, Ташкент, 1969.
9. Broome J. D. Nature, London, 1114—1115, 1961.
10. El-Asmar F., Greenberg D. M. Cancer Res., 26, 116, 1966.
11. Halpern Y. S., Grossowicz N. Biochem J., 65, 716, 1957.
12. Hartman S. C. J. Biol Chem., 243, 853, 1968.
13. Huang-Kan-Yen J. Bacteriol., 93, 853, 1967.
14. Hughes D. E., Williamson D. H. Biochem. J., 51, 45, 1952.
15. Imada A., Igarasi S., Nakanuma K., Isono M. J. General Microbiolgy 76, 85—99, 1973.
16. Katanuma J., Hurino A., Tomino I., Hdv. in enzyme regulation 5, 55, 1967.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
18. McIlwain H. Biochem J. 40, 460, 1946.
19. Mizunuma T. Agric. and Biol. Chem (Tokyo), 29, 491, 1965.
20. Nakamura M., Goldstein L. Nature, 179, 1134, 1957.
21. Ottgen H. F., Old L. J., Boyse E. A., Campbell H. A., Phillips F. S., Clarkson B. D., Tallac L., Leeper R. D., Schwartz M. K., Kim J. H. Cancer Research 27, 2619—2631, 1967.
22. Roberts J., Holcenberg S. S., Dolowy W. C. Nature, London, 227, 1136—1137, 1970.
23. Romadan M. E. A., El-Asmar F., Greenberg D. M. Arch. Biochem Biophys., 108, 150, 1964.
24. Sakamoto T., Araki C., Tamura G., Arima K., Yamamoto T., Matsuzawa A., Hori S. Proceedings of the Society of Agricultural Chemistry 159, 1970.
25. Tosa T., Sano R., Yamamoto K., Nakamura M., Ando K., Onibata I. Applied Microbiology 22, 387—392, 1970.
26. Vellin T. O., Wriston J. C. Jun, Biochemistry 5, 1605—1612, 1966.