

И. В. ГОГИНЯЦ, Е. Г. БАГДАСАРЯЦ, М. А. ДАВТЯН

ИЗОЭНЗИМНЫЙ СПЕКТР И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРАНСАМИНАЗЫ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ДРОЖЖЕЙ *S. GUILLIERMONDII* ВКМ У-42.

Показана цитоплазматическая локализация трансаминазы разветвленных аминокислот в клетках дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42. Изучено влияние полного состава среды на активность указанного фермента. Методом гелилфильтрации и ионообменной хроматографии доказано наличие в исследуемых дрожжах общего фермента трансаминирования всех разветвленных аминокислот, а также существование отдельного фермента трансаминирования лейцина.

Возможность переаминирования разветвленных аминокислот исследована в отношении многих объектов. В настоящее время доказано существование общей трансаминазы разветвленных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин) в ряде микроорганизмов и животных тканей [1—8]. Именно общностью ферментативной системы трансаминирования всех разветвленных аминокислот, по-видимому, можно объяснить раннеописанные явления конкуренции этих аминокислот в питании [9, 10].

С другой стороны, имеются данные о существовании отдельной трансаминазы для лейцина, причем доказывается совместное присутствие указанных трансаминаз в одной клетке [1]. Имеются указания на наличие изоферментов трансаминазы разветвленных аминокислот с различной внутриклеточной локализацией [1, 2, 11, 12, 14, 15], причем предполагается, что одни изоферменты обеспечивают катаболизм, а другие—анаболизм аминокислот [4, 6, 7, 16]. А в тех случаях, когда обнаруживается лишь одна трансаминаза, обе функции приписываются одному ферменту [6].

Процессы переаминирования разветвленных аминокислот и, особенно, вопросы субстратной специфичности и изоэнзимного спектра соответствующих ферментов дрожжей изучены весьма недостаточно. Лишь выявлена выраженная трансаминазная активность разветвленных аминокислот в клеточных суспензиях и в бесклеточных экстрактах различных дрожжей [17—19].

Исследованиями нашей лаборатории было доказано наличие процесса переаминирования разветвленных аминокислот как в клеточных суспензиях, так и в бесклеточных экстрактах дрожжей рода *Candida* [20, 21].

В настоящей работе поставлена цель подробного исследования ферментативных процессов переаминирования разветвленных аминокислот,

главным образом, вопроса существования общей ферментной системы или отдельных ферментов для каждой из указанных аминокислот у дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42. С этой целью изучался изоэнзимный спектр указанных ферментативных активностей путем фракционирования бесклеточного экстракта дрожжей и гельфильтрацией или ионообменной хроматографией. Параллельно разрабатывался метод получения очищенных препаратов указанных ферментативных активностей.

**Материал и методика.** Объектом исследования служили дрожжи *Candida guilliermondii* ВКМ У-42, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР (В. И. Кудрявцев). Дрожжи выращивались на круговой качалке (200 об/мин) в течение 18—20 час. при  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  в условиях интенсивного аэрирования. Состав синтетической среды: глюкоза—10 г,  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ —1,23 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ —0,625 г,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —3,10 г,  $\text{NaCl}$ —0,125 г,  $\text{CaCl}_2$ —0,125 г, биотин—8 мкг на 1 л водопроводной воды.

Гомогенизация проводилась в стеклянном гомогенизаторе типа Эльджем-Поттера в присутствии  $\text{Al}_2\text{O}_3$  или кварцевого песка в 0,1 М КNa-фосфатном буфере (рН 7,8). Для освобождения от неразрушенных клеток и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  или кварцевого песка гомогенат центрифугировался при 2500 г в течение 15 мин. Активность фермента определялась инкубированием ферментного препарата на аппарате Варбурга при непрерывном встряхивании в течение часа при  $38^\circ\text{C}$  в среде 0,1 М КNa-фосфатного буфера, содержащей 20 мкМ аминокислоты (донор  $\text{NH}_2$  гр.), 40 мкМ  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты (акцептор  $\text{NH}_2$  гр.), 20 мкг пиридоксаль-5-фосфата. Общий объем инкубационной смеси—1,5 мл. В контрольном варианте исключался донор  $\text{NH}_2$  группы. Трансаминазная активность оценивалась по количеству синтезированной глутаминовой кислоты, определяемой методом нисходящей бумажной хроматографии [22]. Реакция останавливалась кипячением инкубационной смеси в водяной бане в течение 5 мин. Белок определялся методом Лоури [23].

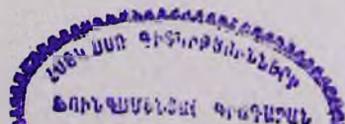
**Результаты и обсуждение.** В первой серии опытов исследовалась внутриклеточная локализация активностей переаминирования разветвленных аминокислот путем дифференциального центрифугирования гомогената дрожжей в среде 0,1 М КNa-фосфатного буфера при  $-2^\circ$ — $-4^\circ\text{C}$ .

Т а б л и ц а 1

Внутриклеточная локализация трансаминазы разветвленных аминокислот дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42 (донор аминокислоты—валин, акцептор— $\alpha$ -кетоглутаровая кислота)

Фракции	Активность, мг глутаминовой кислоты
Надосадок 2500 г	$76,3 \pm 2,54$
Надосадок 25000 г	$84,8 \pm 3,55$
Надосадок 146000 г	$87,7 \pm 3,09$
Осадок 25000 г	следы
Осадок 146000 г	следы

Данные табл. 1 показывают, что валин-трансаминазная активность полностью локализована в растворимой фракции клеток, и совершенно отсутствует в осадках, полученных даже при высоких скоростях центрифугирования. Интересно, что при градиентном центрифугировании гомогената общая активность процесса постепенно повышается, достигая



87,7 в падосадке, полученном центрифугированием его при 146000 g, против 76,3—при 2500 g. Очевидно, это является следствием возможного удаления (осаждения) отрицательно влияющих на активность фермента факторов (возможно ингибиторов).

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние некоторых физико-химических факторов (ионный состав среды, температура) на активность трансаминирования разветвленных аминокислот в гомогенатах и экстрактах исследуемых дрожжей.

Таблица 2

Влияние полного состава среды на активность трансаминазы разветвленных аминокислот дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42 (донор аминокислотной группы—валлин, акцептор— $\alpha$ -кетоглутаровая кислота)

Среда гомогенизации (рН 7,8)	Концентрация КСI в инкубационной среде, М	Белок в пробе, мг	Активность в пробе, мг/глу	Удельная активность
КСI 1 М	0,2	0,65	0,47	0,72
H <sub>2</sub> O	0	1,18	1,34	1,14
КNa-фосфатный буфер 0,1 М	0	0,79	1,30	1,64
H <sub>2</sub> O	0,2	1,18	1,11	0,93
КNa-фосфатный буфер 0,1 М	0,2	0,79	0,66	0,83

Данные (табл. 2) наглядно показывают, что при гомогенизации исследуемых дрожжей в среде с КСI активность трансаминирования валлина более чем в 2 раза уступает таковой экстрактов, полученных при гомогенизации дрожжей в воде или 0,1 М КNa-фосфатном буфере (рН 7,8). Можно было предположить, что раствор КСI плохо экстрагирует исследуемые трансаминазы, тем более, что, как показывают данные, при гомогенизации дрожжей в среде с КСI экстрагируется меньше белка. Однако даже при добавлении раствора КСI к инкубационным средам, содержащим ферментные белки, экстрагированные водой или 0,1 М КNa-фосфатным буфером, значительно подавляется исследуемая трансаминазная активность, что свидетельствует о непосредственном отрицательном влиянии КСI на ферментные системы переаминирования разветвленных аминокислот.

В последующих опытах гомогенизация дрожжей проводилась в 0,1 М КNa-фосфатном буфере, так как при этом извлекалось меньше (по сравнению с гомогенизацией в воде) белка при одинаковой общей активности, что обуславливало высокую удельную активность.

При исследовании влияния температуры оказалось (табл. 3), что валин-трансаминазная активность весьма термолабильна: уже при 60°C в течение 5 мин активность фермента подавляется более чем в 8 раз, а при 80°C—полностью исчезает.

Своеобразным оказался эффект продолжительного (18—20 час.) хранения бесклеточного экстракта дрожжей, полученного центрифугированием гомогената при 25000 g, при —16°—18°C. Оказалось

Таблица 3

Влияние термической обработки на трансаминазную активность бесклеточного экстракта дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42 (донор аминокруппы—валин, акцептор— $\alpha$ -кетоглутаревая кислота, активность в мг глутаминовой кислоты)

Исходный белок (мг)	Исходная активность	После термической обработки			
		при 60°C		при 70°C	
		белок, мг	активность	белок, мг	активность
15,4±0,25,	88,0±1,95	13,0±0,27	11,7±0,14	12,5±0,27	0

(табл. 4), что при этом полностью сохраняется общая активность валин-трансаминазы, в то время как удельная—возрастает трижды вследствие осаждения балластных белков.

Таблица 4

Влияние низких температур на трансаминазную активность бесклеточного экстракта дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42 (донор аминокруппы—валин, акцептор— $\alpha$ -кетоглутаревая кислота, активность в мг глутаминовой кислоты)

Доноры аминокруппы	До холодной обработки			После холодной обработки (-16°C, 18 час.)		
	белок, мг	активность	удельная активность	белок, мг	активность	удельная активность
Валин	272±26,5	685±44,7	2,55±0,2	90,7±4,8	707±46,6	7,8±0,2
Лейцин	272±26,5	823±66,0	3,12±0,1	90,7±4,8	843±72,4	9,3±0,4
Изолейцин	272±26,5	595±41,5	2,25±0,1	90,7±4,8	603±45,8	6,6±0,2

Полученный таким образом частично очищенный экстракт подвергался гельфильтрации. С этой целью 5 мл указанного экстракта пропускались через колонку 1,4×40 см сефадексом g-200, предварительно уравновешенную 0,02 М КNa-фосфатным буфером (рН 7,8). Элюция из колонки проводилась тем же буфером со скоростью 8 мл/час. Фракции собирались на автоматическом коллекторе в объеме 4 мл; содержание белка определялось измерением оптической плотности при 280 нм (СФ-4).

Все белоксодержащие фракции испытывались на наличие в них трансаминазной активности. В качестве доноров аминокруппы кроме разветвленных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин) использовались также аспарагиновая кислота и аланин.

Кривые гельфильтрации показывают (рис. 1), что активности трансаминирования разветвленных аминокислот фильтруются в виде одного пика (I пик) вместе с аспартаттрансаминазой (во фракциях 5—11). Активность трансаминирования аланина обнаруживается в этих же фракциях, однако основная ее часть элюируется позже (во фракциях 12—14). Некоторая активность трансаминирования всех указанных аминокислот, уступающая в 3—4 раза I пику (II пик), фильтруется с низкомолекулярными белками (фракции 15—20).

Фракции I пика, содержащие до 80% общей активности, отличаются низким содержанием белка, что обуславливает высокие значения удельных активностей трансаминирования всех испытанных аминокислот, в результате чего степень очистки повышается почти в 3 раза.

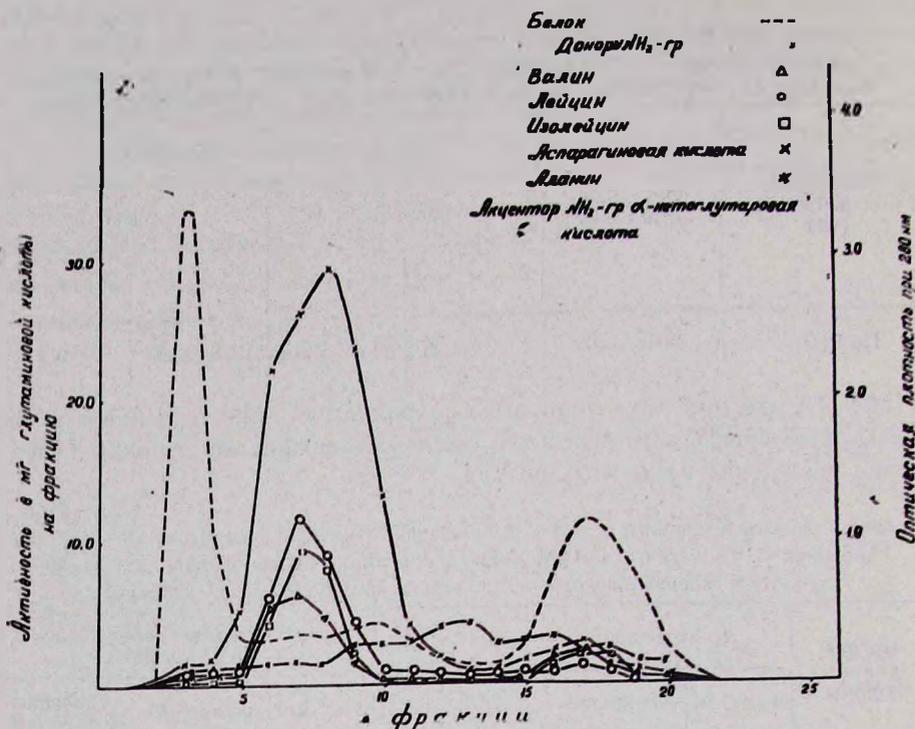


Рис. 1. Гельфильтрация бесклеточного экстракта дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42, на сефадексе g-200.

Указанные фракции были объединены и подвергнуты ионообменной хроматографии, которая проводилась в колонке  $1,2 \times 25$  с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенной  $0,02 \text{ M}$   $\text{KNa}$ -фосфатным буфером,  $\text{pH}$  7,8. Для разделения белковых фракций пользовались методом линейной градиентной элюции, используя  $\text{KNa}$ -фосфатный буфер в концентрациях  $0,02 \text{ M}$ — $0,3 \text{ M}$ . Скорость элюции  $1 \text{ мл/мин}$ ; объем каждой фракции  $5 \text{ мл}$ .

Данные ионообменной хроматографии, изображенные на рис. 2, показывают, что активности трансминирования всех разветвленных аминокислот элюируются в виде единого пика  $0,1 \text{ M}$   $\text{KNa}$ -фосфатным буфером (во фракциях 12—14), тогда как аспартаттрансаминаза обнаруживается раньше (во фракциях 8—10), при концентрации фосфатного буфера  $0,08 \text{ M}$ . Заслуживает внимания наличие отдельного, четко выраженного пика активности трансминирования лейцина, элюируемого  $0,15 \text{ M}$   $\text{KNa}$ -фосфатным буфером (во фракциях 16—18). Что же касается аланина, то активность его трансминирования не имеет четкой границы элюции и обнаруживается в незначительных количествах во всех фракциях, элюируемых при описанном ионообменном хроматографировании.

Итак, в результате ионообменного хроматографирования на ДЭАЭ-целлюлозе мы добились четкого разделения аспартаттрансаминазной активности и активностей трансминирования всех трех разветвленных

аминокислот (валин, лейцин, изолейцин), а также отдельного пика активности трансминирования лейцина. Ионнообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе позволила дополнительно очистить ферментные системы трансминирования разветвленных аминокислот (ФI) и лейцина (ФII) в 6 раз.

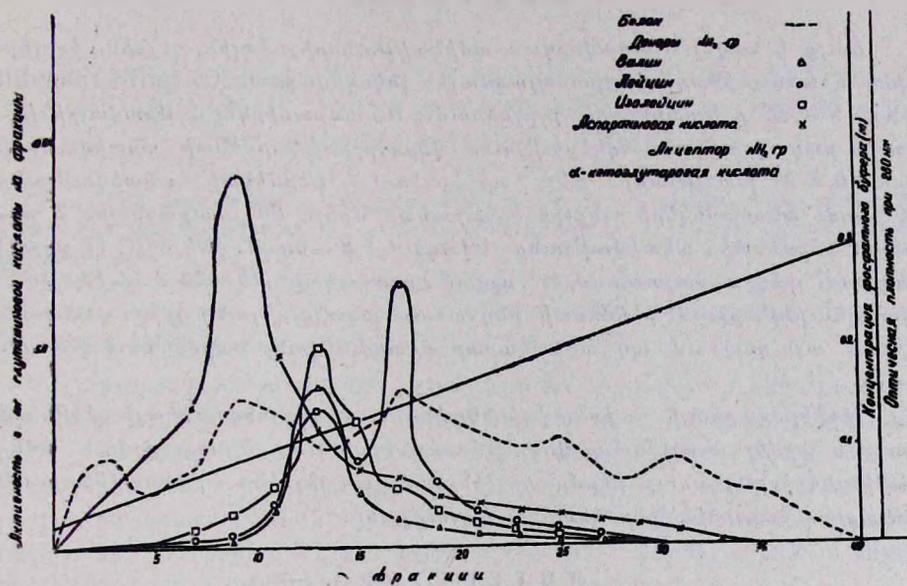


Рис. 2. Хроматография суммарной активной фракции трансминазы разветвленных аминокислот, полученной гельфильтрацией (сефадекс g-200) бесклеточного экстракта дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42, на ДЭАЭ-целлюлозе.

Полученные данные убеждают в том, что изучаемые дрожжи *S. guilliermondii* ВКМ У-42 содержат единый ферментный белок, обеспечивающий трансминирование всех трех разветвленных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин), а также отдельный—катализирующий трансминирование лишь лейцина. Следовательно, лейцин трансминировается как специфическим для данной аминокислоты ферментом, так и общей трансминазой всех трех разветвленных аминокислот.

Таким образом, можно заключить, что дрожжи *S. guilliermondii* ВКМ У-42 подобно печени крыс [1] обладают двумя ферментами трансминирования лейцина, один из которых строго специфичен к лейцину, а другой ко всем трем разветвленным аминокислотам.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биохимии и проблемная лаборатория  
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 22.III 1976 г.

Ի. Վ. ԳՈԳԻՆՅԱՆ, Ե. Գ. ԲԱԳԴԱՍԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ

**C. GUILLIERMONDII ВКМ У-42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՃՅՈՒՂԱՎՈՐՎԱԾ ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ՏՐԱՆՍԱՄԻՆԱԶԱՅԻ ԻՉՈՅԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐԸ ԵՎ ՄԻ ՔԱՆԻ ՖԻԶԻԿԱ-ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Ա մ փ ո փ ո ռ ի մ

Ցույց է տրվել ճյուղավորված ամինոթթունների (վալին, լեյցին, իզուլեյցին) տրանսամինազաչի ցիտոսոլղազմային լոկալիզացիան *C. guilliermondii* ВКМ У-42 խմորասնկերի բջիջներում: Ուսումնասիրվել է միաժայրի իոնային բաղադրության ազդեցությունը վերահիշյալ ֆերմենտի ակտիվության վրա: 0,2 M խտությամբ KCl արդելակում է ֆերմենտի ակտիվությունը 50%-ով: Խմորասնկերի անբջիջ էքստրակտը մինչև 60° սաքացնելիս 5 րոպեում ֆերմենտի ակտիվությունը նվազում է 8 անգամ, իսկ 80°C (5 րոպե) դեպքում՝ լրիվ անհայտանում է: Նշված էքստրակտը 18—20 ժամ 14—16°C պահելու ընթացքում ֆերմենտի ընդհանուր ակտիվությունը լրիվ պահպանվում է այն դեպքում, երբ տեսակարար ակտիվությունը բարձրանում է 3 անգամ:

Գեկֆիլտրացիայի և իոնափոխանակային բրոմատոգրաֆիայի մեթոդով ցույց է տրվել ուսումնասիրվող խմորասնկերի մոտ ճյուղավորված ամինոթթունների ընդհանուր ֆերմենտի, ինչպես նաև լեյցինը տրանսամինացման ենթարկող առանձին ֆերմենտի առկայությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Aki K., Ogawa K., Ichihara A. Blochim. Biophys. Acta, 159, 2, 276, 1968.
2. Aki K., Ogawa K., Shirai A., Ichihara A. J. Biochem., 62, 5, 610, 1967.
3. Aki K., Yokojima A., Ichihara A. J. Biochem, 65, 4, 1969.
4. Coleman M. S., Armstrong F. B. Blochim. Biophys. Acta, 227, 56, 1971.
5. Mikulík K. FEBS Letters, 1, 4, 1968.
6. Norton J. E., Sokatch J. R. Blochim. Biophys. Acta, 206, 2, 205, 1970.
7. Raunio R. Acta Chem. Scand. 22, 8, 2733, 1968.
8. Tochikura T., Tachiki T., Nakahama K., Balch A., Cheldelin V. H. Agr. Biol. Chem., 37, 5, 1161, 1973.
9. Benton D. A., Hasper A. E. et al. Arch. Biochem. Biophys. 60, 147, 1956.
10. Hasper A. E., Benton D. A. et al. Arch. Biochem. Biophys, 51, 523, 1954.
11. Collins M., Wagner R. Arch. Biochem. Biophys, 155, 184, 1973.
12. Ichihara A. Enzyme, 15, 1—6, 1973.
13. Ichihara A. Koyama E. J. Biochem, 59, 2, 160, 1966.
14. Ichihara A. Takahashi H. Blochim, Biophys. Acta, 167, 2, 1968.
15. Shirai A., Ichihara A. J. Biochem, 70, 741, 1971.
16. Rudman D., Meister A. J. Biol. Chem, 200, 591, 1953.
17. Ижженецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. Микробиология, 38, 1, 18, 1969.
18. Липатова В. К., Бурьян Н. И., Датунашвили Е. Н. Микробиология, 51, 2, 1972.
19. Jones M., Pragnell J. a. Pierce J. S. J. Inst. Brew, 75, 509, 1969.
20. Джанибекова В. Г., Бобохидзе Е. А., Тер-Карапетян М. А. Биологический журнал Армении, 24, 5, 73, 1971.
21. Тер-Карапетян М. А., Джанибекова В. Г. ДАН АрмССР, 58, 3, 164, 1969.
22. Lissitsky S. a. Lourent G. Bull. soc. bid, 37, 1177, 1965.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.