

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

ОБ ИНГИБИРОВАНИИ И СТАБИЛИЗАЦИИ  
АСПАРАГИНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ  
CANDIDA GUILLIERMONDII ВКМ У—42

$\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ , ПХМБ и  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  ингибируют активность аспарагиназы дрожжей *C. guilliermondii* ВКМ У—42, причем степень ингибиции зависит как от концентрации этих ионов, так и от времени контактирования их с ферментом. При предынкубации аспарагиназы с цистеином ингибирующее влияние ПХМБ предотвращается, а аспартат в этих же условиях не проявляет защитного действия. L-аспарагин снижает ингибирующий эффект ПХМБ. Цистеин, глутатион и аспартат стабилизируют активность фермента при хранении. Делается вывод о наличии SH-групп в активном центре фермента, ответственных за проявление аспарагиназной активности.

В последние годы аспарагиназа интенсивно изучается, что главным образом обусловлено открытием ее противолейкозного действия [1—4].

Аспарагиназа дрожжей изучена весьма недостаточно. Установлено наличие этого фермента у многих штаммов дрожжей, в том числе рода *Candida* [5—10].

Предыдущими нашими исследованиями показана значительная аспарагиназная активность у дрожжей *C. guilliermondii* ВКМ У-42, превышающая в 10—15 раз глутаминазную. Фермент является растворимым с оптимумом рН 8,5—9,5 [11].

В настоящей работе приводятся результаты изучения стабильности аспарагиназы к влиянию ионов и значения SH-групп для ее активности.

*Материал и методика.* Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводились по ранее описанным методам [11].

*Результаты и обсуждение.* В первой серии экспериментов испытывались различные солевые растворы для экстракции белков, обладающих аспарагиназной активностью. Данные табл. 1 показывают, что наивысшей активностью обладает водный экстракт (надосадок центрифугирования гомогената дрожжей при 27.000 g), несколько ниже—экстракт, полученный в 0,1 М фосфатном буфере, и вовсе лишен активности—в 1 М КСl. Отсутствие активности в экстрактах с 1 М КСl можно было бы объяснить либо неэкстрагированием ферментного белка в этой среде, либо ингибирующим влиянием КСl.

Таблица 1

Влияние среды гомогенизации на аспарагиназную активность дрожжей *S. guilhermondii* ВКМ-У-42

Среда гомогенизации	Активность аспарагиназы, мкг NH <sub>3</sub> /мг белка
H <sub>2</sub> O	84±3,4 (5)
0,1 М К-, Na-фосфатный буфер	67±2,1 (5)
1М KCl	0 (5)

Данные табл. 2 подтверждают второе предположение. Как видно из приведенных данных (табл. 2), KCl начиная с концентрации 0,03 М ингибирует аспарагиназную активность водного экстракта дрожжей на 11%, а 1 М раствор его—на 56%. Почти аналогичное действие оказы-

Таблица 2

Влияние различных солей на активность аспарагиназы водного экстракта дрожжей *S. guilhermondii* ВКМ-У-42

Соль	Концентрация, М	Активность аспарагиназы, мкг NH <sub>3</sub> /мг Б	Ингибирование, %
KCl	—	89,0±2,3	—
	0,03	79,0±2,4	11
	0,64	65,0±1,5	28
	1,00	39,0±2,0	56
NaCl	0,03	80,0±2,3	10
	0,64	67,0±1,2	24
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,06	82,0±3,3	8
	0,64	73,0±1,8	18
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,06	89,0±2,0	6
NaHCO <sub>3</sub>	0,03	85,4±4,0	4
Na <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub>	0,03	85,6±2,6	3
MgSO <sub>4</sub>	0,03	80,0±5,0	10
CuSO <sub>4</sub>	0,006	71,2±3,2	20
	0,012	0	100
	0,03	0	100
CoCl <sub>2</sub>	0,006	75,0±2,9	15
	0,012	71,0±4,4	20
	0,03	0	100
ZnCl <sub>2</sub>	0,006	80,0±2,9	10
	0,012	74,5±2,2	16
	0,03	0	100
MnCl <sub>3</sub>	0,012	70,0±3,2	21
	0,03	0	100
FeSO <sub>4</sub>	0,012	74,0±2,1	17
	0,03	0	100

Число повторностей — 8.

вают NaCl и несколько слабее—Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Другие натриевые соли также оказывают некоторое ингибирующее влияние. Следует подчеркнуть, что по имеющимся литературным данным эти ионы по-разному влияют на аспарагиназы различных объектов. Так, показано, что аспарагиназа *Mycobacterium bovis* БЦЖ [12] ингибируется указанными ионами, тогда как фермент *Tilachlidium humicola* [13] в этом отношении является почти нечувствительным. А у *Bacillus coagulans* [14] под влиянием указанных ионов аспарагиназа даже активируется. Аналогичное действие оказывают и ионы тяжелых металлов. Последние оказывают значительное ингибирующее влияние на аспарагиназу из *Acinetobacter calcoaceticus* [15] и *Muc. bovis* [12] и не влияют на фермент из *Tilachlidium humicola* [13].

Интересно, что ионы Fe<sup>+++</sup> оказывают даже некоторое активирующее влияние на аспарагиназу из *Tilachlidium humicola* [13].

Данные табл. 2 показывают, что аспарагиназа водного экстракта изучаемых дрожжей весьма чувствительна к солям тяжелых металлов. Особенно угнетающее влияние оказывает CuSO<sub>4</sub>, который в концентрации 0,012 М полностью ингибирует активность фермента, тогда как другие соли тяжелых металлов оказывают аналогичное влияние в концентрации 0,03 М. Таким образом, аспарагиназа дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ-У-42 проявляет высокую чувствительность к испытанным солям.

Эксперименты наглядно показывают, что ингибирующее влияние солей (KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>) значительно увеличивается по мере увеличения времени контактирования с ферментом. Так, если под влиянием 0,64 М KCl аспарагиназная активность ингибируется на 28%, то при двухчасовом предынкубировании проб с той же концентрацией KCl активность фермента ингибируется на 70%. Эти данные свидетельствуют о том, что при работе с указанным ферментом, особенно при его очистке, следует обращать особое внимание на ионный состав среды. Сказанное подтверждается экспериментами по изучению стабильности ферментативной активности при различных условиях хранения. Приведенные в табл. 3 данные показывают, что при хранении водного экстракта при 4°C в течение 20 час. аспарагиназная активность снижается на 58%, тогда как при хранении того же экстракта в присутствии солей (Na, K, фосфатный буфер или NaCl) степень инактивации значительно выше. Причем этот отрицательный эффект хранения усиливается по мере увеличения концентрации солей. Так, при 20-часовом хранении водного экстракта в присутствии 0,05 М фосфатного буфера или NaCl сохраняется менее десяти процентов первоначальной активности фермента.

Подобная зависимость ингибирования фермента от продолжительности воздействия ингибитора свидетельствует о том, что применение солей (NaCl, MgSO<sub>4</sub>, KCl), вероятнее всего, отражается на четвертичной структуре фермента, вызывая его конформационные изменения (возможно, распад на субъединицы).

Таблица 3

Остаточная активность аспарагиназы при хранении водного экстракта дрожжей *S. guil.* в фосфатном буфере и растворе NaCl различной концентрации при 3°C

## А к т и в н о с т ь

Активность вы- ражена в	Исходная	После 20-часового хранения										
		в воде	в фосфатном буфере следующих концентраций, М					в растворе NaCl следующих концентраций, М				
			0,005	0,010	0,025	0,05	0,10	0,005	0,010	0,025	0,05	0,10
мкг NH <sub>3</sub>	460	192	184	170	102	43	28	186	184	100	35	20
%	100	42	40	37	22	9	6	40	40	21	8	4

Что же касается ингибирования солями тяжелых металлов, то его следует рассматривать как свидетельство наличия ответственных за активность фермента SH-групп.

Это предположение было подтверждено в опытах с применением ПХМБ. Оказалось (табл. 4), что ПХМБ начиная с концентрации

Таблица 4  
Влияние ПХМБ на активность аспарагиназы  
водного экстракта дрожжей *S. guilliermondii*  
ВКМ-У-42

Концентрация ПХМБ, М	Активность, мкг NH <sub>3</sub>	% ингибирования
0	130	0
$0,5 \cdot 10^{-3}$	130	0
$0,75 \cdot 10^{-3}$	95	27
$1 \cdot 10^{-3}$	64	52
$2 \cdot 10^{-3}$	0	100

$0,75 \cdot 10^{-3}$  М ингибирует активность аспарагиназы водного экстракта дрожжей на 27%, а полное ингибирование достигается при  $2 \cdot 10^{-3}$  М. На основании этих данных можно заключить, что, действительно, в изучаемом нами ферменте имеются тио-группы, ответственные за проявление активности. Подобные результаты были получены в отношении аспарагиназ, выделенных из *Pseudomonas fluorescens* АГ [16], *Mycobacterium phlei* [17], *Acinetobacter calcoaceticus* [15] и *Bacillus coagulans* [14].

Однако аспарагиназа не всех объектов является тиоловым ферментом [8, 12, 17, 18]. С целью выяснения локализации тио-группы в активном центре нами исследовалось влияние ПХМБ на активность фермента в присутствии природного субстрата и конечного продукта реакции (1-аспарагин и 1-аспартат). Оказалось (табл. 5), что при предынкубиро-

Т а б л и ц а 5

Влияние чередования предынкубации (30°, 3°C) с ингибитором (ПХМБ) и стабилизаторами (цистеин и аспаргат) на активность аспарагиназы

Добавленные к водному экстракту вещества		Активность	
при первой предынкубации	при вторичной предынкубации	мкг NH <sub>3</sub>	%
—	—	160	100
ПХМБ	—	0	0
ПХМБ	цистеин	5	3
цистеин	ПХМБ	142	90
ПХМБ	аспаргат	0	0
аспаргат	ПХМБ	0	0

Концентрация цистеина и аспартата при 1-й предынкубации — 0,2 М, при II — 0,1 М, а при инкубации — 0,05 М.

Концентрация ПХМБ, соответственно:  $8 \cdot 10^{-3}$  М,  $4 \cdot 10^{-3}$  М и  $2 \cdot 10^{-3}$  М.

нии экстракта в присутствии  $2 \cdot 10^{-3}$  М ПХМБ (в течение 30 мин при 3°C) ингибция фермента не снимается при дальнейшем 30-минутном инкубировании экстракта с добавлением цистеина или аспартата в концентрации 0,05 М. А при первоначальном инкубировании экстракта в присутствии цистеина почти полностью сохраняется активность фермента от ингибирующего влияния добавленного ПХМБ, что лишний раз свидетельствует о принадлежности изучаемой аспарагиназы к тиоловым ферментам. В то же время предынкубация экстракта с аспаргатом не предотвращает ингибирования фермента ПХМБ-ом. Последний факт наводит на мысль о том, что, по-видимому, тиоловая группа активного центра не локализована в якорном участке. Однако это заключение нельзя считать окончательным, так как имеются некоторые косвенные данные о том, что 1-аспарагин связывается с контактным участком аспарагиназы *E. coli* своей  $\beta$ -карбоксиламидной группой [19].

Интересным оказалось влияние аспарагина на ингибирующий эффект ПХМБ (табл. 6). Данные показывают, что совместное добавление 1-аспарагина с ПХМБ-ом значительно предотвращает ингибцию аспарагиназной активности. Аспарагин в концентрации  $2 \cdot 10^{-2}$  М на 28% защищает фермент от полной инактивации.

Анализируя данные табл. 5 и 6, можно высказать предположение о том, что в каталитическом участке активного центра фермента имеется SH-группа, которая, вероятно, прикрываясь природным субстратом, не атакуется ПХМБ-ом. Необходимо отметить, что, согласно литературным данным, аспарагиназа из *Pseudomonas fluorescens* АГ также содержит тио-группу в каталитическом участке [16]. Основанием для такого заключения явился тот факт, что при модификации фермента ПХМБ-ом К-реакции не подвергалась изменению, в то время как  $V_{\max}$  значительно снижалась.

Т а б л и ц а 6  
Влияние 1-аспарагина на ингибирование  
аспарагиназы ПХМБ-ом

Концентрация аспарагина и ПХМБ, М		Активность аспарагиназы	
аспарагин	ПХМБ	мкг NH <sub>3</sub>	%
1·10 <sup>-2</sup>	—	144	100
2·10 <sup>-2</sup>	—	144	100
1·10 <sup>-2</sup>	2·10 <sup>-3</sup>	0	0
1,5·10 <sup>-2</sup>	2·10 <sup>-3</sup>	8	8
2·10 <sup>-2</sup>	2·10 <sup>-3</sup>	40	28

Обобщая приведенные в работе экспериментальные данные, можно заключить, что изучаемая нами аспарагиназа является тиоловым ферментом, весьма чувствительным к солевому составу среды.

Учитывая полученные данные, нами была предпринята попытка стабилизировать ферментативную активность экстракта путем применения глутатиона, цистеина и аспартата. Данные табл. 7 наглядно по-

Т а б л и ц а 7  
Стабилизирующее влияние глутатиона, аспартата и цистеина на активность аспарагиназы водного экстракта дрожжей *S. guilhermondii* ВКМ-У-42

Концентрация стабилизаторов М	Остаточная активность аспарагиназы в % от исходной после 20-часового хранения при 3°С				
	в 0,1 М К, Na фосфатном буфере в присутствии			в 0,005 М К, Na фосфатном буфере в присутствии	
	глутатиона	аспартата	цистеина	глутатиона	цистеина
—	0	0	0	41	41
0,005	0	60	70	44	100
0,010	6	75	80	51	100
0,025	10	84	96	62	100
0,050	20	100	100	85	100

казывают, что все использованные стабилизаторы оказались весьма эффективными. Так, цистеин и аспарат начиная с концентрации 0,05 М, а глутатион—с 0,025 М значительно предотвращают инактивацию фермента при 20-часовом хранении водного экстракта дрожжей в присутствии солевых растворов. Очевидно, инактивация фермента при длительном хранении является следствием окисления SH-группы. Что же касается аспартата, то механизм его стабилизирующего эффекта не ясен, хотя в отношении большинства ферментов доказано стабилизирующее влияние субстратов и продуктов реакции.

Нами рассматривался также вопрос о возможности субстратной индукции аспарагиназы у изучаемых дрожжей. Исследования показали,

что при выращивании дрожжей в присутствии l-аспарагина в качестве единственного источника азота активность аспарагиназы повышается в два раза. Следует подчеркнуть, что субстратная индукция аспарагиназы, хотя и доказана в отношении большинства объектов [20—22], отсутствует у *Bacillus mesentericus* 43A [23].

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

Поступило 8.VII 1976 г.

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

C. GUILLIERMONDII ВКМ-У-42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ  
ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԸՆԿՃՄԱՆ  
ԵՎ ԿԱՅՈՒՆԱՑՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

K, Na և Mg իոնները ընկճում են *C. guilliermondii* ВКМ-У-42 խմորասնկերից անջատված ասպարագինազայի ակտիվությունը: Ընդ որում՝ ընկճման շափր կախված է նշված իոնների ինչպես կոնցենտրացիայից, այնպես էլ ֆերմենտի հետ նրանց ունեցած կոնտակտի տևողությունից: Մանր մետաղների երկվալենտ իոնները (Cu, Co, Zn, Mn և Fe)  $0,03$  Մ և պարաջրում երկուրի բենզատը ( $\text{ՊՔՄՔ}$ )  $2-10^{-3}$  Մ կոնցենտրացիաների դեպքում լրիվ ընկճում են ֆերմենտի ակտիվությունը:

Ասպարագինազան ցիստեինի  $0,05$  Մ. կոնցենտրացիայի հետ նախաինկուբացնելուց հետո ( $30$  րոպ.,  $3^{\circ}\text{C}$ ) ավելացրած  $\text{ՊՔՄՔ}$ -ը համարյա չի ընկրճում ասպարագինազայի ակտիվությունը: Իսկ նույն պայմաններում ավելացրած ասպարտատը չի պաշտպանում ֆերմենտին  $\text{ՊՔՄՔ}$ -ի ընկճող ազդեցությունից:

$24$  ժամ,  $3^{\circ}\text{C}$  պայմաններում *C. guilliermondii* ВКМ-У-42 խմորասնկերի շրային մզվածքը պահելիս թիոլային ռեակցիաները (ցիստեին, գլուտաթիոն) և ասպարտատը կայունացնում են ասպարագինազայի ակտիվությունը, ընդ որում՝ ցիստեինը և ասպարտատը այդ տեսակետից ավելի էֆեկտիվ են, քան գլուտաթիոնը:

Հետևաբար *C. guilliermondii* խմորասնկերի ասպարագինազայի ակտիվ կենտրոնում գոյություն ունեն SH խմբեր, որոնք վճռական նշանակություն ունեն ֆերմենտի ակտիվության ապահովման համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Broome J. D. Nature, 1114, 1961.
2. Николаев А. Я., Козлов Е. А., Соколов Н. Н., Кондратьева Н. А., Добрынин Н. В., Мардашев С. Р. Вопр. мед. химии, 20, 3, 1974.
3. Соколов Н. Н., Мардашев С. Р. III Всесоюз. биох. съезд. 2, Рига, 1974.
4. Igarasi S., Imada A., Nakahama K., Matsumoto T. Ootsok. Experientia, 30, 7, 1974.
5. Абдумаликов А. Х., Никлаев А. Я. Биохимия, 32, 4, 1967.

6. *Imada A., Igarasi S., Nakahama K., Isono M. J. Gen. Microbiol.* 76, 1973.
7. *Квасников Е. Л., Назорна С. С., Шолохова И. Микробиол.*, 36, 5, 1974.
8. *Jones G. E., Mortimer R. K. Biochim. Genet.* 9, 2, 1973.
9. *Dunlop P. C., Roome R. J. Bacteriol.*, 122, 3, 1975.
10. *Imada A., Nakahama K., Igarasi S. Takeda хо кэнкюс Takeda KenKysuho ho J. Takeda Res. Lab.*, 31, 4, 1972.
11. *Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биологический журнал Армении.* 28, 9, 1975.
12. *Soru E., Zukari O. Rev. roum. biochim.* 10, 2, 1973.
13. *Imada A., Setri J., Takeda J. Lab. Res.* 32, 2, 1973.
14. *Law Amy S., Wriston J. C. Arch. Biochim. Biophys.* 147, 2, 1971.
15. *Jones P. E., Kristiansen T., Einarsson M. BBA*, 327, 1, 1973.
16. *Соколов Н. Н., Николаев Л. Я. Биохимия*, 41, 4, 1976.
17. *Andrejko A., Orfanelli M. T., Desbordes J. Ann. microbiol.* 126, 2, 1975.
18. *Heler A., Whelan, John C., Wriston J. B. BBA*, 365, 1, 1974.
19. *Buna H. E. Роль аспарагиназы в энзимологии опухолей. М.*, 1972.
20. *Salan F. M., Kanafagy E. Z., Bard S. M. Zbl. Bacteriol Parasitenk. Infektionskrankh und Hyg., Abt.* 129, 3, 1974.
21. *Berezov T. T., Hlsamob G. Z., Zanin V. A. FEBS lett.*, 28, 1, 1972.
22. *Верезов Т. Т., Хисамов Г. З., Евсеев Л. Я., Занин В. А. Булл. экс. биол. и мед.*, 76, 10, 1973.
23. *Тюльпанова Э. С., Ермечко В. В., Мардашев С. Р. Роль аспарагиназы в энзимологии опухолей. М.*, 1972.