

Г. А. ГАБРИЕЛЯН, Б. А. АКОПЯН, М. А. ДАВТЯН

ИЗОЭНЗИМЫ АРГИНАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ CANDIDA GUILLIERMONDII ВКМ У-42

Методом гельфильтрации бесклеточного экстракта дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 обнаружены 2 изоэнзима аргиназы, отличающиеся по ряду физико-химических свойств. Изоэнзим, фильтрующийся с высокомолекулярными белками, подвергается субстратной индукции, тогда как второй изоэнзим — конститутивный.

Важнейшими механизмами адаптации микроорганизмов к условиям окружающей среды являются индукция и репрессия ферментов. В последние годы появляется все больше данных о различном поведении изоэнзимов при приспособительных реакциях организма, что свидетельствует о важной роли их в регуляции обмена веществ.

Широкое распространение в природе различных изоэнзимов аргиназы (уреотелическая и неуреотелическая), имеющих разнообразные метаболические функции (биосинтез мочевины, лимитирование содержания аргинина и других однозамещенных гуанидиновых соединений в тканях, участие в биосинтезе пролина путем снабжения этого процесса орнитинном и др.) доказано [1, 2]. Представляет интерес совместное присутствие, но самостоятельное функционирование различных изоэнзимов аргиназы в одном организме и даже в одном органе (печень, почки, эритроциты животных) [3, 4].

При гормональной индукции (введение гидрокортизона) индуцируется лишь один из двух, обнаруживаемых гельфильтрацией, изоэнзимов аргиназы печени крыс. Указанные изоэнзимы различаются по величинам K_m для L-аргинина, а также K_i в отношении L-орнитина, L-лизина, γ -аминомасляной кислоты и характером активирования ионами двухвалентных металлов [5]. При введении гидрокортизона меняется также внутриклеточная локализация и соотношение активностей двух изоэнзимов аргиназы почек крыс [6]. Сведения об изоэнзимном спектре аргиназы в дрожжевых организмах отсутствуют в литературе. Между тем присутствие ее в дрожжевых организмах не вызывает сомнений [7—10]. В предыдущей нашей работе было показано наличие аргиназной активности в дрожжах рода *Candida* (*Candida guilliermondii* ВКМ У-42), подвергающейся субстратной индукции и катаболитной репрессии глюкозой [11]. В настоящей работе поставлена цель изучить изоэнзимный спектр фермента и определить долю участия различных изоэнзимов, отмечаемых при субстратной индукции фермента указанных дрожжей.

Материал и методика. Объектом исследований служили дрожжи *S. guilliermondii* ВКМ У-42, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР (В. И. Кудрявцев). Дрожжи выращивались в синтетической среде на круговой качалке (200 об/мин.) в течение 18—20 час. при температуре $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в условиях интенсивного аэрирования. Состав синтетической среды: глюкоза — 10, KH_2PO_4 — 1,23, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,625, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,10, NaCl — 0,125, CaCl_2 — 0,125 г, биотин — 8 мкг на 1 л водопроводной воды.

Гомогенизация дрожжей проводилась в стеклянном гомогенизаторе типа Элведжем—Поттера в присутствии Al_2O_3 в 0,005 М трис-буфере (рН 7,4). Для освобождения от неразрушенных клеток и Al_2O_3 гомогенат центрифугировался при 2500 г в течение 15 мин. Аргиназная активность определялась путем инкубирования ферментного препарата в глициновом буфере (0,04 М, рН 9,5) в присутствии L-аргинина (50 мкМ) и MnCl_2 (20 мкМ) при 37° в течение 1 часа. Количество образовавшейся мочевины определялось методом Арчибальда [12].

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов исследовалась внутриклеточная локализация аргиназы дифференциальным центрифугированием гомогенатов дрожжей в растворе 0,5 М сахарозы. Полученные данные показали, что аргиназная активность переходит в надосадочную жидкость, получаемую центрифугированием гомогенатов при 200000 г в течение 30 мин, и полностью отсутствует в осадке, что свидетельствует о цитоплазматической локализации фермента.

В дальнейшем с целью фракционирования полученного активного экстракта применялся метод гельфильтрации на колонке с сефадексом G-75 (колонка — $1,5 \times 25$ см, уравновешенная 0,005 М трис-буфером, рН 7,4, элюция проводилась этим же буфером при скорости 4 мл за 5 мин). В собранных пробах (4 мл) определяли содержание белка спектрофотометрически (при 280 мμ) на спектрофотометре СФ-4. Рис. 1 показывает, что при гельфильтрации проявляются 2 пика аргиназной активности: I пик, фильтрующийся с высокомолекулярными белками и имеющий более выраженную активность, II пик, фильтрующийся с низкомолекулярными белками и имеющий менее выраженную активность. Таким образом, путем фракционирования экстрактов дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42 выявлены 2 изоэнзима аргиназы, отличающиеся молекулярным весом.

Далее в аналогичных условиях проводилось фракционирование экстракта дрожжей, подвергнутых предварительно субстратной индукции. В предыдущем нашем сообщении было показано, что при 20-часовом выращивании изучаемых дрожжей в присутствии L-аргинина активность аргиназы повышается в 8—10 раз вследствие индукции фермента [11].

Как видно из кривой гельфильтрации (рис. 2), после субстратной индукции происходит резкое повышение активности I пика, тогда как активность II пика остается низкой. Если соотношение максимальных активностей первого пика и второго у неадаптированной культуры (рис. 1) составляет в среднем 1,8:1,0, то после субстратной индукции (рис. 2) оно составляет 9:1. Таким образом, повышение активности аргиназы при 20-часовой инкубации в присутствии L-аргинина обусловлено индукцией главным образом I изоэнзима. Эти данные свидетельствуют

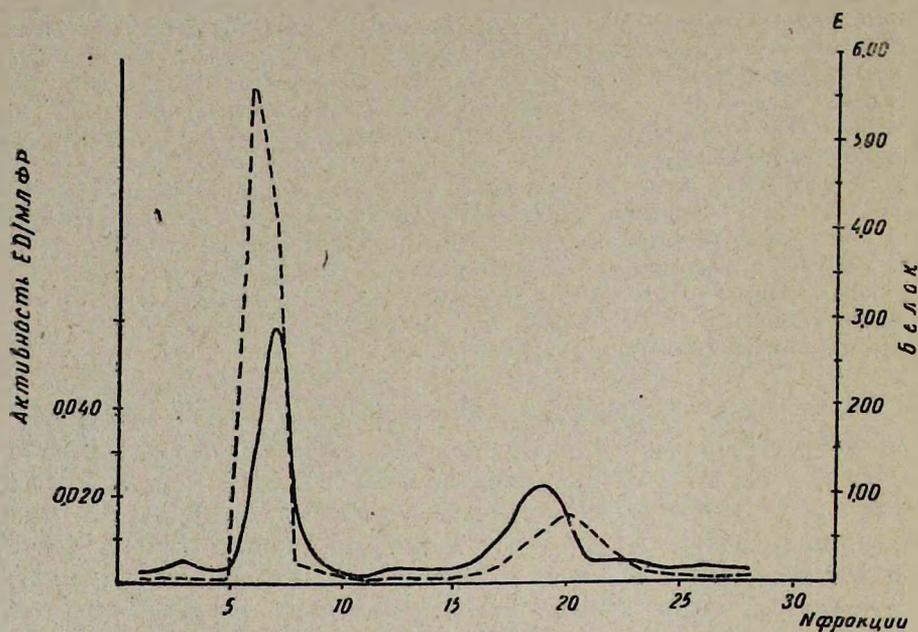


Рис. 1. Фракционирование бесклеточного экстракта дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42, — — белок, — — активность аргиназы.

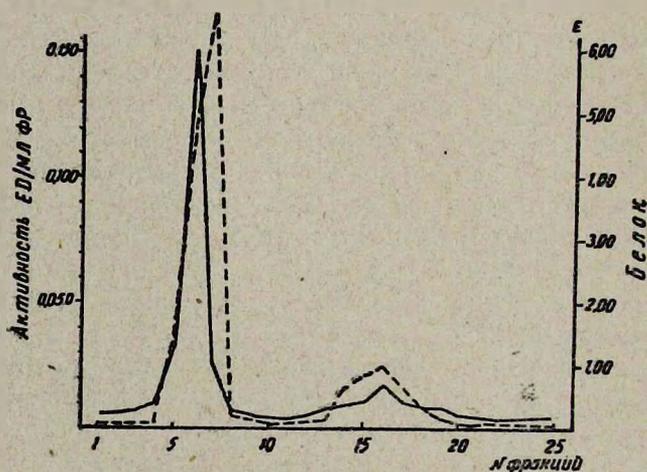


Рис. 2. Фракционирование бесклеточного экстракта дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42 после субстратной индукции. — — белок, — — активность аргиназы.

о том, что обнаруженные нами два пика аргиназной активности находятся под различным генетическим контролем.

В новой серии экспериментов исследовались некоторые физико-химические свойства (K_m , K_i , молекулярный вес) изоферментов аргина-

ны дрожжей до и после субстратной индукции. Как видно из рис. 3, константа Михаэлиса (K_m), определяемая графическим методом Лайнуве-ра-Берка, для I пика равна $1,8 \times 10^{-2}$ М, а для II пика — 8×10^{-2} М как до, так и после субстратной индукции. Таким образом, сродство I изофермента к субстрату по сравнению со II значительно выше и не меняется при субстратной индукции.

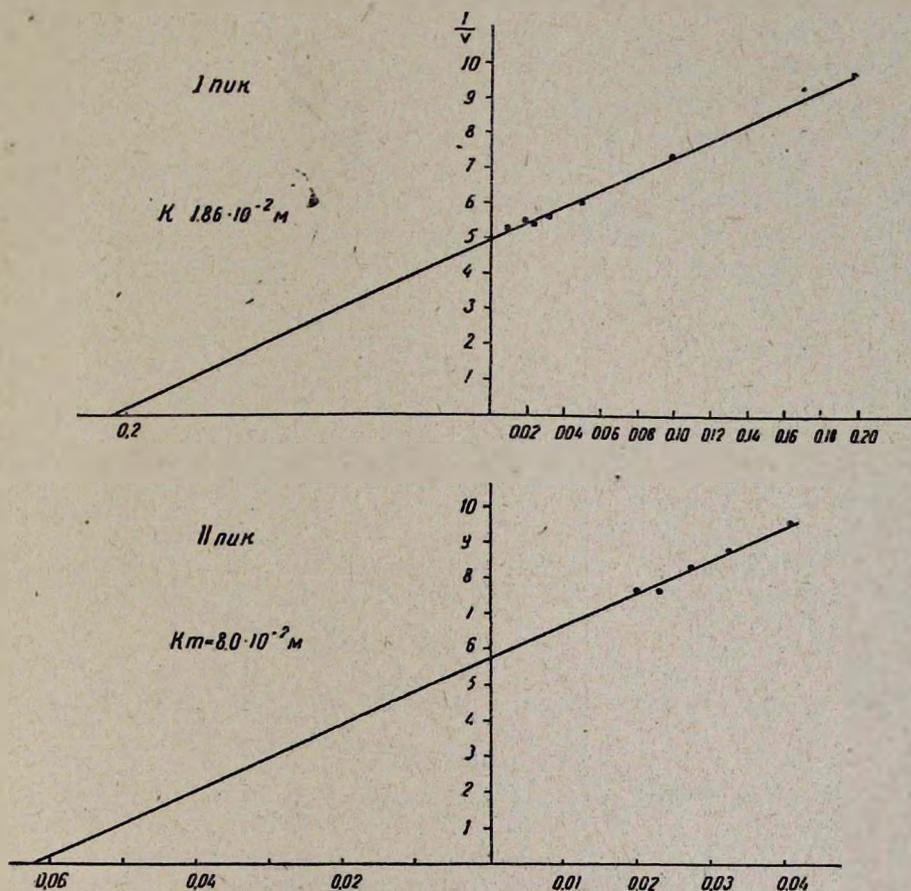


Рис. 3. Влияние концентрации субстрата (L-аргинина) на изоферменты аргиназы дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42.

Изучалось также влияние известных ингибиторов (L-орнитин, L-лизин, L-пролин, γ -аминомасляная кислота) на активность изоферментов. Оказалось, что эти ингибиторы не влияют на активность второго изофермента, тогда как L-орнитин и L-лизин подавляют активность первого. ГАМК и пролин также не оказывают влияния на I изофермент. На рис. 4 даны константы ингибирования (K_i) в отношении L-орнитина и L-лизина графическим методом Диксона. Характер кривых доказывает, что указанные ингибиторы являются конкурентными, и K_i как до, так и после индукции в отношении L-орнитина равна $3,3 \times 10^{-3}$ М, а L-лизина — $7,8 \times 10^{-3}$ М.

Нами определены также молекулярные веса изоферментов аргиназы на колонке с сефадексом G-200 на основании построенного элюционного графика белков с известными молекулярными весами (уреазы — 480000, алкогольдегидрогеназы — 150000, гемоглобина — 67000, пепсина — 35000). Оказалось, что молекулярный вес I изоэнзима равен приблизительно 130000, а второго — 35000.

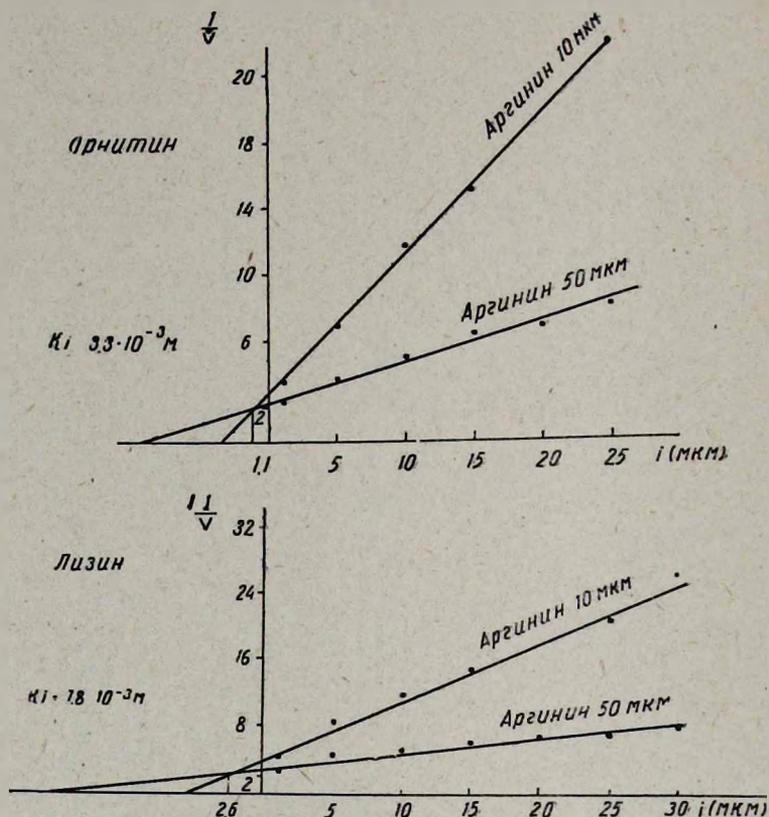


Рис. 4. Ингибирующее влияние L-орнитина и L-лизина на изоферменты аргиназы дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42.

Таким образом, изоэнзимы аргиназы значительно отличаются друг от друга и своими физико-химическими свойствами, которые не меняются при субстратной индукции фермента.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что в дрожжах *S. guilliermondii* ВКМ У-42 содержатся обнаруживаемые гельфильтрацией два изоэнзима аргиназы, отличающиеся молекулярным весом, кинетическими (K_m и K_i) и регуляторными (субстратная индукция) свойствами. Очевидно, они генетически различно детерминированы и играют различные роли в метаболизме клетки.

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

Поступило 9.II 1977

Գ. Ա. ԳԱՐՐԻՆԷՅԱՆ, Բ. Ա. ՀԱԿՈՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԱՐԴԻՆԱԶԱՅԻ ԻԶՈՅԵՐՄԵՆՏՆԵՐԸ *CANDIDA GUILLIERMONDII*
 ВКМ У-42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ու մ

Candida guilliermondii ВКМ У-42 խմորասնկերի անբջիջ մզվածքներում հելֆիլտրացիայի մեթոդով հայտնաբերվել են արգինազայի երկու իզոֆերմենտներ, որոնք տարբերվում են մի շարք ֆիզիկաքիմիական հատկություններով (մոլեկուլյար կշիռ, Km, Ki): Սուբստրատային ինդուկցիայի է ենթարկվում միայն այն իզոֆերմենտը, որը ֆիլտրվում է բարձրամոլիկուլյար սպիտակուցների հետ: Հետևաբար, հետազոտվող խմորասնկերը պարունակում են արգինազային ակտիվությամբ օժտված գենետիկորեն տարբեր սպիտակուցներ, որոնք ունեն կարգավորման տարբեր հնարավորություններ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга, 4, Ереван, 1968.
2. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 27, 5, 1974.
3. Давтян М. А., Бунятыан Г. Х., Геворкян Д. М., Петросян Л. А. Вопросы биохимии мозга, 6, Ереван, 1970.
4. Асланян Г. А., Доотян М. А. Биологический журнал Армении, 29, 2, 1976.
5. Петросян Л. А., Баблоян Р. С., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 27, 7, 1974.
6. Асланян Г. А., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 29, 8, 1976.
7. Edlbacher S., Bauer H. Z. Physiol. Chem., 254, 275, 1938.
8. Messenguay F., Bechet J., Wiame J. M. Arch. Intern. Physiol. Biochim., 75, 889, 1967.
9. Middelhoven W. J. Biochim. Biophys. Acta, 191, 110, 1969.
10. Chan P. Y., Cossins E. A. Plant and Cell Physiol., 14, 4, 641, 1973.
11. Давтян М. А., Габриелян Г. А., Акопян Б. А. Биологический журнал Армении, 27, 10, 1974.
12. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 1, 1944.