

ОБ ИЗОФЕРМЕНТАХ АЛАНИН- И ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* ВКМ У-42

М. Б. АТАНЕСЯН, Л. Е. ЛАЧИНЯН

В бесклеточных экстрактах дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 содержится активная аланиндегидрогеназа (АДГ) и менее активная глутаматдегидрогеназа (ГДГ), специфичные к НАДН и особенно НАДФН. Доказана способность данных ферментных систем к субстратной индукции. Предполагается, что НАД- и НАДФ-зависимые изоферменты АДГ и ГДГ обладают соответственно катаболическими и анаболическими функциями.

Аланиндегидрогеназа (АДГ) является малораспространенным ферментом: обнаружена у бактерий [10, 11, 13, 14], в небольшом количестве содержится в органах млекопитающих—в печени [1], почках [7], сердечной мышце [2] и, вероятно, в мозговой ткани [4]. Имеются сообщения о возможном наличии аланиндегидрогеназной активности у пекарских дрожжей [2]. Особый интерес представляет АДГ у *Vac. subtilis*, глутаматдегидрогеназная активность которых выражена весьма слабо; основным механизмом утилизации аммиака у этих организмов является реакция аминирования пирувата [8, 9, 12].

При исследовании процесса аминирования кетокислот у дрожжей *C. guilliermondii* ВКМ У-42 нами было установлено [5], что, вопреки ожиданиям, пируват более эффективный субстрат, чем α -кетоглутарат. Было высказано предположение, что в изучаемых дрожжах содержится активная АДГ и слабовыраженная глутаматдегидрогеназа (ГДГ). В настоящей работе приводятся результаты сравнительного изучения некоторых регуляторных свойств (индукции, коферментной специфичности, активаторов) этих ферментных систем прямого аминирования пирувата и α -кетоглутарата.

Материал и методика. Объект исследований—*C. guilliermondii* ВКМ У-42, полученный из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР; выращивание дрожжей и получение гомогената проводилось по ранее описанной методике [5, 6]. Гомогенат подвергался центрифугированию при 25000 g (20 мин) в рефрижераторной центрифуге.

Для определения ферментативной активности по реакции окисления НАДН и НАДФН, участвующих в процессе восстановительного аминирования кетокислот, использовалась реакционная смесь, содержащая 100 мкмоль пирувата натрия или α -кетоглутарата, 60 мкмоль углекислого аммония, НАДН или НАДФН (2,5 мкмоль), растворенных в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4 и 1 мл дрожжевого экстракта-супернатанта. Общий объем смеси 3 мл.

Для определения ферментативной активности по реакции восстановления НАД и НАДФ, участвующих в процессах окислительного дезаминирования L-глутамат и L-аланина, использовалась реакционная смесь, содержащая 28 мкмоль аминокислот, НАД или НАДФ (2,5 мкмоль), растворенных в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, и 1 мл дрожжевого экстракта-супернатанта—общий объем смеси 3 мл.

Началом реакции считали время добавления раствора кетокислоты и аминокислоты.

Ферментативную активность определяли по уменьшению оптической плотности в случае восстановления и по ее увеличению в случае окисления коферментов при 340 нм в спектрофотометре СФ-4 (кювета—1,0). Контролем служили реакционные смеси, не содержащие кето- и аминокислот.

Для выяснения способности изучаемых ферментных систем к индукции использовали биомассу, выращенную на культуральной среде с L-аланином или L-глутаматом, являющимися единственным источником азота (L-аланин—419 мг, L-глутамат—693 мг).

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов изучалась коферментная специфичность ферментных систем. С этой целью спектрофотометрически измеряли скорость окисления восстановленных коферментов (НАДН и НАДФН) при 3-минутной инкубации экстрактов дрожжей в присутствии пирувата и α -кетоглутарата. Данные рис. 1, 2 показывают, что пируват по сравнению с α -кетоглутаратом является более эффективным субстратом аминирования, сопровождаю-

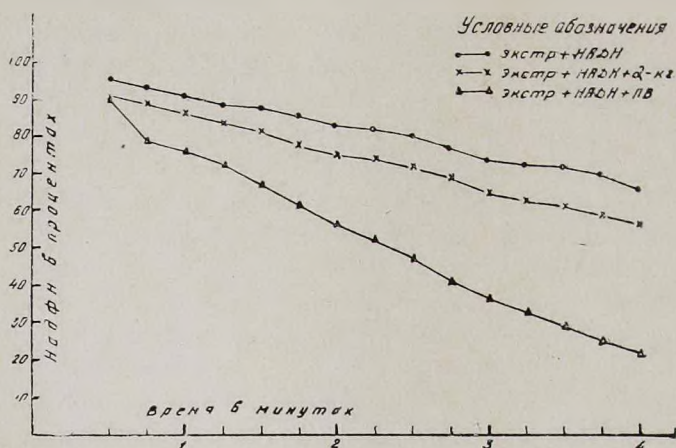


Рис. 1. Участие НАДН в реакциях аминирования пирувата и α -кетоглутарата.

щегося окислением восстановленных коферментов и что НАДФН в указанных реакциях значительно эффективнее НАДН.

Следовательно, в экстрактах дрожжей содержится активная аламиндегидрогеназа и менее активная глутаматдегидрогеназа, специфичные к НАДН и особенно к НАДФН.

В новой серии экспериментов изучалась возможность субстратной индукции АДГ и ГДГ, для чего дрожжи выращивались на средах, содержащих в качестве единственного источника азота либо аланин, либо глутамат. Контролем служили дрожжи, выращенные на среде с сульфатом аммония.

При выращивании на аланине заметно стимулируется (почти в 2 раза) аминирование пирувата, при выращивании на L-глутамате индуцируется процесс аминирования α -кетоглутарата, как с НАДН, так и с НАДФН.

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что аланин- и глутаматдегидрогеназа подвергаются субстратной индукции. Необходимо подчеркнуть, что при этом заметно индуцируются НАД-

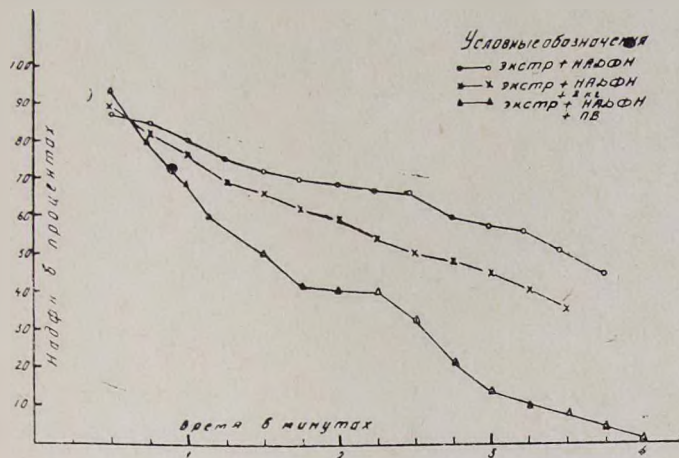


Рис. 2. Участие НАДФН в реакциях аминирования пирувата и α -кетоглутарата.

специфичные аланин- и глутаматдегидрогеназы, слабо выраженные в контроле. Можно предположить, что в изучаемых нами дрожжах содержатся НАД- и НАДФ-зависимые изоферменты аланин- и глутаматдегидрогеназа, обладающие катаболическими и анаболическими функциями.

В следующей серии экспериментов мы задались целью изучить участие этих ферментных систем в реакциях дезаминирования L-аланина и L-глутамата. Для этого спектрофотометрически измеряли восстановление окисленных форм коферментов (НАД и НАДФ) при инкубировании экстракта с L-аланином или L-глутаматом. В экстрактах дрожжей при инкубации происходит восстановление коферментов при окислении L-аланина и особенно L-глутамата; причем НАД по сравнению с НАДФ является в этих реакциях более эффективным коферментом.

Таким образом, если в реакциях аминирования пируват и НАДФ являются более эффективными, то в реакциях дезаминирования проявляются преимущества глутамата и НАД. При аланиновой индукции (при выращивании дрожжей на среде, содержащей L-аланин в качестве единственного источника азота) резко стимулируется дезаминирование аланина, тогда как дезаминирование глутамата несколько подавляется. При выращивании дрожжей на L-глутамате, наоборот, стимулируется дезаминирование L-глутамата и несколько подавляется дезаминирование L-аланина, причем эта закономерность сохраняется при использовании в качестве кофермента и НАД, и НАДФ.

Суммируя полученные данные, можно прийти к заключению, что в изучаемых дрожжах содержатся дегидрогеназы, как L-аланина, так и L-глутамата, причем в реакциях аминирования превалирует активность АДГ, а в реакциях дезаминирования—ГДГ. НАД и НАДФ являются специфическими коферментами указанных ферментативных систем, однако в реакциях аминирования более эффективным является НАДФ, а дезаминирования—НАД.

Не исключается присутствие отдельных анаболических (НАДФ-специфичных) и катаболических (НАД-специфичных) изоферментов указанных дегидрогеназ.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 2.VII 1979 г.

CANDIDA GUILLIERMONDII BKM Y—42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԱԼԱՆԻՆ- ԵՎ ԳԼՅՈՒՏԱՄԱՏԻՆԻԴԵԶԻԳԵՆԱԶԱՅԻՆ ԻԶՈՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՎԵՐԱԲԵՐՅԱԼ

Մ. Բ. ԱԹԱԵՍԻԱՆ, Լ. Ե. ԼԱԽԻՆԻԱՆ

Candida guilliermondii BKM Y—42 խմորասնկերի էքստրակտներում հայտնաբերվել են ալանինդեհիդրոգենազային և պակաս ակտիվ—գլյուտամատդեհիդրոգենազային ակտիվությունները:

Ուսումնասիրվել են պիրուվատի և α-կետոգլյուտարատի ամինացման (ՆԱԴԻ-ի և ՆԱԴՖԻ-ի մասնակցությամբ), ինչպես նաև L-ալանինի և L-գլյուտամատի դեզամինացման (ՆԱԴ-ի և ՆԱԴՖ-ի մասնակցությամբ) ռեակցիաները:

Պիրուվատը և ՆԱԴՖ-ը ավելի արդյունավետ են ամինացման, իսկ գլյուտամատը և ՆԱԴ-ը՝ դեզամինացման ռեակցիաներում:

Երբ խմորասնկերը աճեցվել են ալանինի միջավայրում որպես ազոտի միակ աղբյուր, խմորասնկերի էքստրակտներում խիստ խթանվել է L-ալանինի դեզամինացումը, իսկ L-գլյուտամատի դեզամինացումը, ընդհակառակը, մի փոքր ընկճվել է, իսկ երբ խմորասնկերը աճեցվել են գլյուտամատի վրա խթանվել է L-գլյուտամատի և մի փոքր ընկճվել է L-ալանինի դեզամինացումը:

Եզրակացվում է, որ *Candida guilliermondii* BKM Y—42 խմորասնկերը, ամենայն հավանականությամբ, պարունակում են վերոհիշյալ դեհիդրոգենազների անաբոլիկ (ՆԱԴՖ-սպեցիֆիկ) և կատաբոլիկ (ՆԱԴ-սպեցիֆիկ) իզոֆերմենտները:

ON THE ISOENZYMES OF ALANINE-AND GLUTAMATE DEHYDROGENASES OF CANDIDA GUILLIERMONDII BKM Y—42

M. B. ATHAHESIAN, L. E. LACHINIAN

Cell-free extracts of *Candida guilliermondii* BKM Y—42 yeast contain active alaninedehydrogenase and less active glutamate-dehydrogenase specific to NADPH and NADH. The ability of these enzyme systems to substrate induction has been proved. A supposition has been

made that NAD—and NADP—dependent isoenzymes of ADG and GDG respectively have catabolic and anabolic functions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Березовская Н. Н. Биохимия, 21, 6, 1956.
2. Броницкая З. С., Краузе Е., Кретоич В. Л. V Междунар. биохим. конгресс, Рефераты секционных сообщений, 2, 15, 1961.
3. Давтян М. А. Биохимия, 27, 3, 1962.
4. Давтян М. А., Бабляня Р. С. Вопросы биохимии мозга, 5, 69, 1969.
5. Давтян М. А., Атанесян М. Б., Лачинян Л. Е. Биолог. ж. Армении, 24, 5, 1975.
6. Инджикян С. М. Ученые записки ЕГУ, 1, 119, 1969.
7. Пятницкая И. А., Биохимия, 25, 6, 1960.
8. Хунь Мунь-Мин, Шень Сан-Чун, Браунштейн А. Е., Биохимия, 24, 5, 1959.
9. Шень-Сан-Чун, Хунь Мунь-Мин, Браунштейн А. Е., Биохимия, 24, 3, 1959.
10. Goldman A. E. Biochem. Biophys. Acta, 34, 2, 1959.
11. Mc. Cormick H. G., Halvorson H. O. J. Bacteriol, 87, 68, 1964.
11. O'Connor, R. J., Halvorson H. O. Arch. Biochem. Biophys, 91, 290, 1960.
13. Pierard A., Wiame J. M. In "Developments in industrial Microbiology" Washington Acad. Press, 7, 35, 1960.
4. Wian J. M., Pierard A. Nature, 1976, 1073, 1955.