

ОЧИСТКА АРГИНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ CANDIDA GUILLIERMONDII VAR. MEMBRANAEFACIENS

М. А. ДАВТЯН, С. В. ЧУБАРЯН, Л. Р. ТУМАНЯН

Осуществлена частичная очистка индуцированной аргиназы дрожжей *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* ВКМ У-43, являющихся наиболее активными из семи исследованных нами представителей дрожжей рода *Candida*. Очистка проводилась в несколько этапов: экстракция, обработка марганцем и пропанолом, холодовая обработка, гельфильтрация, высаливание сульфатом аммония.

В то время как в литературе довольно широко освещены вопросы, касающиеся очистки, структуры и изоферментов животной аргиназы различного происхождения, аргиназа микроорганизмов мало изучена. Микробальная аргиназа, найденная в *S. cerevisiae* [8, 9], *N. crassa* [11] и *Bacillus* [5, 6], является катаболическим ферментом, снабжающим клетки азотом. По молекулярному весу аргиназы микроорганизмов можно отнести к легким (около 130 000 дальтон), к которым относится печеночная аргиназа млекопитающих и других уреотелических организмов, а также фермент *S. cerevisiae*, оказавшийся тримером [13], и тяжелым (около 300 000 дальтон), включающим аргиназы некоторых урикотелических организмов и аргиназу *Neurospora* и *Bacillus*, являющиеся, вероятно, гексамерами [14].

Аргиназа микроорганизмов проявляет некоторые свойства, общие с аргиназой животных и растений (рН оптимум, активирование двухвалентными ионами, Км) [4, 15].

Очистка бактериальной аргиназы до кристаллического состояния осуществлена Накамура и др. [12] из *B. subtilis*. Очищена также и установлено количество субъединиц аргиназы *S. cerevisiae* [13], наиболее изученной среди дрожжевых аргиназ. Что касается исследований этого фермента у кормовых дрожжей, соответствующих данных в литературе нет. У изученных нами дрожжей рода *Candida* обнаружены два изофермента аргиназы, выделенные при гельфильтрации бесклеточного экстракта [1].

Перед нами была поставлена задача исследовать аргиназную активность у разных представителей этого рода, а также разработать метод очистки фермента с целью дальнейшего изучения его свойств на очищенном препарате.

Материал и методика. Выращивание дрожжей проводилось как описано ранее [2]. Гомогенизация осуществлялась в гомогенизаторе типа Элведжема-Поттера или

прессом. В первом случае разрушение проводилось в присутствии Al_2O_3 в буферной среде в пять приемов по 1 мин в ледяной бане. При гомогенизировании прессом (пресс охлаждался до $-18-20^\circ$) разрушению подвергался дрожжевой осадок, предварительно замороженный в течение 18—24 час. при $-18-20^\circ$. С целью определения активности проводилось инкубирование ферментного препарата при 37° в течение 30 мин. Инкубационная среда содержала 50 мкМ аргинина в 0,04 М глициновом буфере и 0,5 мл ферментного препарата, объем смеси 2,5 мл. В сосудики с препаратами, не содержащими марганца, добавлялось 5 мкМ $MnCl_2$. Реакция останавливалась добавлением 1 мл 20%-ного ТХУ. Об аргиназной активности судили по образованию мочевины, которая определялась методом Арчибалда [3]. Активность фермента выражали в мкМ мочевины. Белок определялся спектрофотометрически на СФ-4А при длине волны 280 нм и методом Лоури и др. [7].

Результаты и обсуждение. С целью выбора наиболее активной культуры для очистки дрожжевой аргиназы аргиназная активность определялась в бесклеточных экстрактах 7 представителей дрожжей рода *Candida* (табл. 1). Разрушение дрожжей проводилось в 0,1 М трис-буфере, pH 8,0, гомогенизатором типа Элведжесма-Поттера. Бесклеточный экстракт получался центрифугированием гомогената при 10 000 g 20 мин. Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* ВКМ У-43 обладает высокой активностью, превышающей активность фермента других культур более 8 раз, поэтому она была отобрана нами для дальнейших исследований.

Таблица 1

Аргиназная активность бесклеточных экстрактов различных представителей дрожжей рода *Candida*

Культура	Белок, мг	Общая активность, мкМ мочевины	Удельная активность, мкМ мочевины/мг белка
<i>C. tropicalis</i> Кз—10	10,2	6,3	0,61
<i>C. utilis</i> ВКМ У—74	23,0	14,8	0,64
<i>C. chevalieri</i> ВКМ У—37	45,0	17,4	0,38
<i>C. arboreae</i> ВКМ У—33	15,0	11,8	0,78
<i>C. guilliermondii</i> ВКМ У—42	25,2	15,8	0,62
<i>C. guilliermondii</i> var. <i>membranaefaciens</i> ВКМ У—43	27,2	114,6	4,21
<i>C. tropicalis</i> ВКМ У—595	14,0	11,8	0,84

Для очистки аргиназы нами использовалась индуцированная культура, выросшая в синтетической среде с аргинином в качестве единственного источника азота. С этой целью было установлено минимальное количество аргинина, вызывающее оптимальную индукцию фермента (табл. 2). В качестве контроля служила культура, выросшая в среде с сульфатом аммония. Чтобы иметь количество азота, соответствующее таковому в используемой нами синтетической среде с сульфатом аммония, необходимо брать 717 мг аргинина на 100 мл среды. Однако данные табл. 2 показывают, что количество аргинина более 200 мг почти не влияет на индукцию аргиназы, поэтому в последующих экспериментах нами использовалось 200 мг аргинина на 100 мл синтетической среды.

Ниже представлена разработанная нами схема очистки аргиназы. В предыдущих экспериментах экстракция фермента осуществлялась в воде и трис-буфере. Но поскольку в схеме, разработанной Накамура и др. [12] для очистки аргиназы *B. subtilis*, полученной авторами в кристаллическом состоянии, для экстракции фермента использовался концентрированный фосфатный буфер (0,5 М), а Мидельховеном [10] было показано ингибирование фосфатом аргиназы *S. cerevisiae*, мы исследовали влияние различных концентраций ионов фосфора на аргиназную активность. С этой целью гомогенизацию дрожжей и последующую экстракцию фермента проводили в воде, трис-буфере и фосфатном буфере различной молярности (табл. 3).

Таблица 2

Влияние количества аргинина в среде роста на индукцию аргиназы
C. guilliermondii var. *membranaefaciens* ВКМ У—43

Источник азота, мг/100 мл среды	Белок, мг	Общая актив- ность, мкМ мочевины	Удельная актив- ность, мкМ моче- вины/мг белка
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 310	24,5	90,6	3,7
Аргинин	100	343,5	15,0
	200	629,9	24,9
	300	688,8	28,0
	700	607,7	29,5

Таблица 3

Влияние среды гомогенизации и среды экстракции
на аргиназную активность *C. guilliermondii*
var. *membranaefaciens* ВКМ У—43

Среда гомогенизации и экстракции	Удельная актив- ность, мкМ мочеви- ны/мг белка
Вода	34,5
Трис-буфер, 0,1 М	40,0
Фосфатный буфер, 0,1 М	53,2
Фосфатный буфер, 0,5 М	50,3

Данные табл. 3 показывают, что фосфатный буфер не влияет отрицательно на аргиназную активность, даже имеет некоторые преимущества по сравнению с водой и трис-буфером. Более концентрированный фосфатный буфер (0,5 М), как оказалось в процессе работы, способствует лучшему сохранению активности аргиназы в процессе очистки.

Очистка осуществлялась следующими этапами при температуре 0—5°.

1 этап. Экстракция фермента. Промытые дрожжевые клетки (около 2 г сухого веса) замораживались при —20° в течение 18—20 час., разрушались прессом и суспендировались в 7—8 мл 0,5 М фосфатного буфера, рН 8,0. Экстракция проводилась в течение 1 часа с магнитной

мешалкой. Бесклеточный экстракт получали удалением неразрушенных клеток и клеточных осколков центрифугированием при 10 000 g 20 мин. Объем надосадочной жидкости составлял 12 мл.

2 этап. Обработка марганцем. К бесклеточному экстракту по каплям добавлялось 1,13 мл 1 М раствора $MnCl_2$ при постоянном перемешивании. pH приводился к 8,0 добавлением по каплям 5 N раствора KOH. После 30-минутного перемешивания образовавшийся неактивный осадок удалялся центрифугированием при 10 000 g 20 минут.

Нами была предпринята попытка термической обработки надосадочной жидкости, полученной на втором этапе очистки, тем более что она увеличивает приблизительно в 3 раза удельную активность фермента у *Bacillus* [12, 14]. Однако для нашей культуры эта обработка оказалась неэффективной.

Таблица 4

Этапы очистки аргиназы дрожжей
S. gutthiermondii var. *membranaefaciens* ВКМ Y-43

Этап	Общий белок, мг	Общая активность, мкМ мочевины	Удельная активность, мкМ моч/мгм белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	195,7	2062	10,5	100	—
Бесклеточный экстракт	62,4	1555	24,9	75,4	2,4
Обработка марганцем	40,0	1604	40,1	77,8	3,8
Обработка пропанолом	17,2	1404	81,8	68,1	7,8
Холодовая обработка	10,8	1390	128,0	67,4	12,2
Гельфильтрация	5,5	1461	255,6	70,8	25,3
Высаливание $(NH_4)_2SO_4$	1,7	1426	833,9	69,1	79,4

3 этап. Обработка н-пропанолом. К 12,5 мл надосадочной жидкости при постоянном перемешивании добавлялся н-пропиловый спирт до 20%-ного насыщения. Смесь охлаждалась льдом с солью. Через 10 мин образовавшийся осадок удалялся центрифугированием при 10 000 g 20 мин. Попытка дальнейшего насыщения до 50%, согласно Накамура и др. [12], приводящего к выпадению активного осадка, в наших экспериментах оказалась неэффективной.

4 этап. Холодовая обработка. Надосадочная жидкость (13 мл) оставалась на ночь при -15° . Осевший белковый осадок удалялся центрифугированием при 25 000 g 30 мин. Для удаления пропанола надосадочная жидкость пропусклась через колонку с сефадексом G-50 (1,8×51), уравновешенным 0,01 М трис-ацетатным буфером, содержащим 5 мМ L-треонина и 1 мМ $MnCl_2$, pH 8,0. Элюирование проводилось тем же буфером, объем фракций 5 мл. Наиболее выраженная аргиназная активность обнаружена во фракциях 15—19.

5 этап. Высаливание сульфатом аммония. Активные фракции (15—19), полученные при гельфильтрации, объединялись и подвергались вы-

саливанию в присутствии аргинина (20 мкМ в 1 мл). Неактивный белковый осадок, полученный при насыщении сульфатом аммония до 40%, удалялся центрифугированием при 25 000 g 30 мин. Последующее 70%-ное насыщение приводило к выпадению активного осадка, который собирался центрифугированием при 25 000 g 30 мин. Осадок суспендировался в 3,5 мл трис-ацетатного буфера, содержащего треоин и марганец. Аммоний сульфат удалялся гельфильтрацией полученной суспензии через колонку с сефадексом G-50 (1,8×30), уравновешенным указанным буфером с аргинином (20 мкМ в 1 мл). Элюирование проводилось тем же буфером, объем фракций 5 мл. Аргиназная активность выходила с фракциями 8 и 9.

В результате разработан метод очистки аргиназы (степень очистки 79,4), с выходом 69,1%, позволяющий получать высокоактивный препарат с удельной активностью 833,9.

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

Поступило 20.VII 1979 г.

CANDIDA GUILLIERMONDII VAR. MEMBRANAEFACIENS BKM Y-43 ԽՓՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ

Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Ս. Վ. ՉՈՒԲԱՐՅԱՆ, Լ. Ռ. ԹՈՒՄԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է արգինազային ակտիվության առկայությունը *Candida* ցեղի խմորասնկերի յոթ ներկայացուցիչների մոտ: Իրականացվել է ինդուկցիայի ենթարկված ֆերմենտի մասնակի մաքրումը *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* BKM Y-43 մոտ: Մաքրումը կատարվել է մի քանի էտապներով՝ էքստրակցիա, մշակում մանգանով և պրոպանոլով, գելֆիլտրացիա, աղայնացում $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ով:

PURIFICATION OF ARGINASE FROM CANDIDA GUILLIERMONDII VAR. MEMBRANAEFACIENS

M. A. DAVTIAN, S. V. CHUBARIAN, L. R. TUMANIAN

The arginase of *C. guilliermondii* var *membranaefaciens* VKM Y-43 has been purified. The purification has been carried out by several stages: the extraction, manganese treatment, sephadex G-50 chromatography and ammonium sulfate treatment.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Габриелян Г. А., Акопян Б. А., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 30, 8, 1977.
2. Чубарян С. В., Тер-Карапетян М. А., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 24, 8, 1971.

3. *Archibald R. M.* J. Biol. Chem , 156, 121, 1944.
4. *Chan P. Y., Cosins E. A.* Plan Cell Phystol, 14, 641, 1973.
5. *De Haaver G., Lavallo R., Wiame J. M.* Biochim. Biophys. Acta, 81, 257, 1964.
6. *Lalshley E. J., Bernlohr R. W.* J. Bacteriol, 96, 322, 1968.
7. *Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A L., Randall R. Y.* J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
8. *Middelhoven W. J.* Biochim. Biophys. Acta, 93, 650, 1964.
9. *Middelhoven W. J.* Biochim. Biophys. Acta, 191, 110, 1969.
10. *Middelhoven W. J.* Antonie van Leeuwenhoek. J. Serol. Microbiol., 35, 215, 1969.
11. *Mora J., Tarrab R., Martuscelli J., Soberon G.* Blochim. J., 96, 588, 1965.
12. *Nakamura N., Fujita M., Klmura K.* Agr. Biol. Chem., 37, 2827, 1973.
13. *Penninckx M., Simon J. P., Wiame J. M.* Eur. J. Biochem., 49, 429, 1974
14. *Simon J. P., Stalon V.* Biochimie, 58, 1419, 1976.
15. *Yamanaka K., Gino M. J.* Ferment. Technol., 838, 1976.