ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIV, 8, 851—856, 1981

УДК 577.15.591.8

АСПАРАГИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАМОРОЖЕННЫХ И ВЫСУШЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ CANDIDA GUILLIERMONDII ВКМ У-42

М. А. ДАВТЯН, К. Р. СТЕПАНЯН

Цельные клетки дрожжей Candida guilliermondii ВКМ У-42 при замораживании и высушивании проявляют аспарагиназную активность, отсутствующую у нативных дрожжей.

Аспарагиназа высушенных дрожжей характеризуется высокой стабильностью: KCl ингибирует активность аспарагиназы высушенных дрожжей; для сохранения и проявления аспарагиназной активности лучшей из использованных сред является 0,05 М фосфатный буфер.

Активность аспарагиназы замороженных и высушенных клеток почти равна таковой гомогената интактных дрожжей.

Ключевые слова: дрожжи, аспарагиназа, замораживание, высушивание.

В настоящее время значительный интерес представляют исследования клеток различных организмов в состоянии анабиоза, который вызывается главным образом их высушиванием или замораживанием. Довольно много работ, имеющих теоретическое и практическое значение, посвящено изучению анабиотического состояния микроорганизмов [1—4, 6, 8]. Относительно мало данных об активности отдельных ферментов микроорганизмов при их анабиозе и реактивации.

В настоящей работе изучалась активность аспарагиназы дрожжей Candida guilliermondii ВКМ У-42 при их замораживании и высушивании.

Материал и методика. Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводились по ранее описанным методам [9]. Дрожжи замораживались в жидком азоте (—196°) в течение 25—30 мин или 12—15 ч (—12°). Высушивание проводилось в термостате в течение 25—30 ч при 30°. Высушенные и замороженные дрожжи использовались в качестве ферментного препарата.

Результаты и обсуждение. В наших предыдущих исследованиях [9] было показано, что гомогенат дрожжей Candida guilliermondii ВКМ У-42 обладает аспарагиназной активностью, имеющей цитоплазматическую локализацию. В новой серии экспериментов, результаты которых обобщены в табл. 1, установлено, что в отличие от интактных дрожжевых клеток замороженные проявляют выраженную аспарагиназную активность. Можно было предположить, что это является результатом разрушения дрожжей при замораживании с выходом фер-

Таблица 1

Изменение активности аспарагиназы цельных клеток дрожжей после хранения при разных температурах

Условия хранения	Активность аспарагиназы, γNH_3	Условия хранения	Активность аспарагиназы, γNH_3
20°, 0 ч	0	— 20°, 3 ч	67
3°, 3 ч	0	—196°, 20 мин	160

мента в инкубационную среду. Однако после центрифугирования подвергнутой замораживанию суспензии дрожжей в супернатанте ферментативной активности не обнаруживается (табл. 2). По-видимому, при

Таблица 2

Аспарагиназная активность замороженных и незамороженных клеток дрожжей

Фракции суспензии дрожжей	Активность аспарагиназы дрожжей, γNH_3	
	Замороженные —20°, 15 ч	Незамороженные
Надосадок (2500 g)	0	0
Осадок	150	0

замораживании клеток вследствие кристаллизации внутриклеточной воды на оболочке образуются поры, которые способствуют проникновению субстрата в клетку, где происходит ферментативная реакция. И в предыдущих исследованиях нашей лаборатории замораживание дрожжей приводило к проявлению ими АТФ-азной [11] и к повышению аргиназной активностей [5], что авторы объясняли изменением проницаемости клеточной мембраны в отношении субстратов.

Эксперименты показали, что в замороженных клетках дрожжей фермент проявляет активность, почти равную активности их гомогената (перед гомогенизацией дрожжи замораживались). Предварительные опыты показали, что активность фермента варьирует в зависимости от содержания воды в биомассе перед замораживанием, причем по мере уменьшения содержания межклеточной воды (высушивание биомассы фильтровальной бумагой) активность аспарагиназы повышается. При центрифугировании гомогената замороженных дрожжей примерно 40% общей активности фермента переходит в осадок. Отметим, что эти данные могут сильно колебаться в зависимости от степени замораживания дрожжей и их разрушения при гомогенизации.

Замораживание дрожжевых клеток при температуре —12° приводит к повышению активности фермента в течение 12—15 ч до максимального значения, сохраняющегося постоянным при дальнейшем замораживании. Такую же максимальную активность проявляют клетки при их замораживании жидким азотом (—196°) в течение 15—20 мин. Наблюдения показали, что при выращивании замороженных и незамороженных дрожжей в течение 24 ч (стационарная фаза роста) накопле-

ние биомассы одинаково. Но оказалось, что в начале логарифмической фазы роста (рис. 1) у замороженных клеток в первые 7 ч увеличения биомассы не наблюдается, тогда как незамороженные клетки интенсивно размножаются.

Опыты проводились следующим образом: дрожжи выращивались до начала логарифмической фазы роста, после чего центрифугировались. Половина их замораживалась в жидком азоте в течение 30 мин, а другая оставлялась при комнатных условиях. Далее клетки переносились в колбы со свежей средой, и в процессе выращивания определялся прирост биомассы в обоих вариантах.

Эксперименты показали, что высушенные клетки (30°, 30 ч) без предварительного замораживания также проявляют аспарагиназную активность, причем такую же, какую гомогенат интактных клеток. Ферментативная активность высушенных дрожжей проявляется с первых же минут инкубации (рис. 2), и скорость реакции почти не меняется в

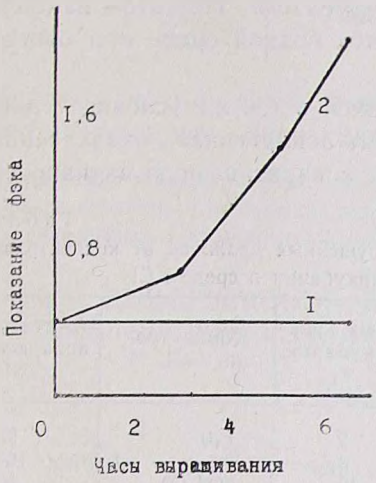

Рис. 1.

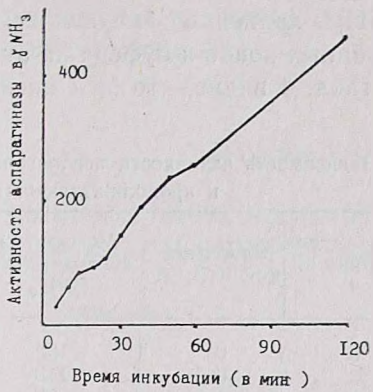

Рис. 2.

Рис. 1. Накопление биомассы в начале логарифмической фазы роста: 1—замороженные клетки, 2—незамороженные клетки.

Рис. 2. Зависимость активности аспарагиназы высушенных клеток от продолжительности инкубации.

течение двух часов. По данным некоторых авторов, у высушенных организмов повышена проницаемость клеточной мембраны, что способствует проникновению субстрата в клетку [3, 6, 7, 12, 13]. Следует отметить, что при хранении высушенных дрожжей в течение 24 ч при 60°, 100° и 110° активность аспарагиназы сохраняется на 88, 78 и 63% соответственно (табл. 3), что свидетельствует о высокой стабильности аспарагиназы высушенных дрожжей.

Таким образом, несложной технологией высушивания дрожжей можно получить весьма удобный и стандартный объект для исследования аспарагиназы (возможно и других ферментов). Ферментный препарат можно хранить в обычных комнатных условиях, и при этом активность аспарагиназы сохраняется очень долго без заметных изменений.

Таблица 3

Зависимость активности аспарагиназы высушенных дрожжей при хранении в течение 24 ч

Температура хранения, °С	Активность аспарагиназы, γNH_3	% от исходной	Температура хранения, °С	Активность аспарагиназы, γNH_3	% от исходной
20	192	100	100	150	78
60	170	88	110	120	63

При выращивании высушенных дрожжей оказалось, что лагфаза роста длится 35—40 ч, вместо обычных 8—10. Ранее нами было показано, что при хранении фермента в фосфатном буфере и в присутствии ионов K, Na различной концентрации активность фермента снижалась, причем степень снижения зависела как от концентрации, так и от времени контактирования этих сред с ферментом. При этом наибольшая активность аспарагиназы проявлялась в водной среде при отсутствии ионов [10].

При хранении высушенных дрожжей в тех же условиях влияние указанных ионов и буфера на активность аспарагиназы оказалось иным. Из табл. 4 видно, что KCl ингибирует аспарагиназную активность вы-

Таблица 4

Зависимость активности аспарагиназы высушенных дрожжей от концентрации и продолжительности предынкубации в среде KCl

Время предынкубации, ч	Концентрация KCl, М	Активность аспарагиназы, γNH_3	Время предынкубации, ч	Концентрация KCl, М	Активность аспарагиназы, γNH_3
0	0	150	2	1,0	95
0	0,5	113	0	0	168
1	0,5	98	16	0(H_2O)	53
2	0,5	100	16	0,2	90
0	1,0	103	16	0,4	84
1	1,0	99	16	1,0	76
2	0	154	16	2,0	74

сушенных дрожжей, причем его концентрация (0,5—1,0 М) и время контактирования (0—2 ч) относительно мало влияют на степень ингибиции. Такая же картина наблюдается в случае предынкубации высушенных дрожжей с различными концентрациями NaCl в течение 14—16 ч (табл. 5). Иной результат получается при хранении высушенных дрожжей в различных концентрациях фосфатного буфера: по мере увеличения концентрации активность фермента сохраняется лучше, причем самую низкую аспарагиназную активность имеют дрожжи при хранении их в воде (табл. 5).

Таким образом, влияние различных концентраций фосфатного буфера и ионов K, Na на активность аспарагиназы проявляется по-разному как в качественном, так и в количественном отношении, в зависимости от исходного состояния дрожжей (гомогенат интактных клеток,

высушенные клетки). Причины указанных различий трудно объяснить. Это может быть обусловлено как изменением свойств самого фермента при высушивании клеток, так и изменением проницаемости мембран высушенных дрожжей при их гидратации в ходе наших исследований.

Таблица 5

Зависимость активности аспарагиназы высушенных дрожжей от концентрации и продолжительности предынкубации в среде NaCl и фосфатного буфера

NaCl			K-, Na-фосфатный буфер		
время предынкубации, ч	концентрация, NaCl. M	активность, γNH_3	время предынкубации, ч	концентрация буфера, M	активность γNH_3
0	0	168	0	0,05	154
16	0 H_2O	53	14	0 H_2O	32
16	0,005	58	14	0,005	96
16	0,01	58	14	0,01	101
16	0,025	38	14	0,025	105
16	0,05	38	14	0,05	121

Очевидно, в жидкой среде происходит набухание клеточной мембраны и закрываются поры, образующиеся во время сушки.

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

Поступило 7.V 1980

CANDIDA GUILLIERMONDII BKM-Y-42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՍԱՌԵՑՐԱԾ ԵՎ ՉՈՐԱՑՎԱԾ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Կ. Ռ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

Candida guilliermondii BKM-Y-42 *խմորասնկերի ամբողջական բջիջները սառեցնելիս և չորացնելիս ցուցաբերում են ասպարագինազային ակտիվություն, որը բացակայում է ինտակտ բջիջների մոտ։*

Չորացված բջիջների ասպարագինազան ունի բարձր կայունություն սենյակային պայմաններում ֆերմենտի ակտիվությունը մի տարուց ավելի մնում է գրեթե անփոփոխ, իսկ 110° 24 ժամ պայմաններում պահելուց հետո պահպանում է իր ակտիվության 63%-ը։

KCl-ը ընկճում է չորացված բջիջների ասպարագինազային ակտիվությունը, իսկ ֆերմենտի ակտիվության պահպանման և ցուցաբերման համար ուսումնասիրված միջավայրից ամենալավը 0,05 մոլյար ֆոսֆատային բուֆերն է։*

Չորացված և սառեցված խմորասնկերից ասպարագինազային ակտիվությունը մոտավորապես հավասար է ինտակտ խմորասնկերի հոմոգենատի ակտիվությանը։

THE ASPARAGINASE ACTIVITY OF DRIED AND FROZEN YEAST *CANDIDA GUILLIERMONDII* BKM-Y-42

M. A. DAVTIAN, K. R. STEPANIAN

The dried (30, C, 30 h) and frozen (—12 C, 12 h; —196 C, 20 m) cells of *Candida guilliermondii* BKM-Y-42 yeast show the asparaginase activity which is absent in native yeast. Asparaginase of the frozen yeast may be stable for a year at the room temperature and retain 63% of the catalitic activity at 110 C. Asparaginase is inhibited by KCl. The phosphate buffer is the best of the media used for keeping the stability and the activity of enzyme. The asparaginase activity of frozen and dried yeast is nearly equal to the activity of the homogenate of the native yeast.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анабиоз и преданабиоз микроорганизмов. Тез. симпоз. Рига, 1971.
2. Анабиоз и преданабиоз микроорганизмов. Сб. Рига, 1973.
3. *Бекер М. Е.* Обезвоживание микробной биомассы, Рига, 1967.
4. *Бирюзова В. И., Рапопорт А. И.* Микробиология, *47*, вып. 2, 1978.
5. *Давтян М. А., Габриелян Г. А., Акопян Б. А.* Биолог. ж. Армении, *27*, 10, 1974.
6. *Меледина Т. В., Витринская А. М., Соболева Г. А.* Микробиология, *47*, вып. 1, 1978.
7. *Проскуряков Н. И., Опарышева Е. Ф.*, Микробиология, *25*, 6, 1956.
8. *Рапопорт А. И., Бекер М. Е.* Микробиология, *47*, вып. 1. 1978.
9. *Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А.* Биолог. ж. Армении, *28*, 9, 1975.
10. *Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А.* Биолог. ж. Армении, *30*, 3, 1977.
11. *Туманян Л. Р., Давтян М. А.* Биолог. ж. Армении, *30*, 1, 1977.
12. *Ebbutt L. J. K.* J. Gen. Microbiol, *25*, 87, 1961.
13. *Wagman J. J.* Bacteriol., *80*, 88, 1960.