2. Алоджиков М. И., Мельник-Александрова Е. А., Махтарян В. Г. Биолог. ж. Армения, 27, 12, 28, 1974.
3. Ереван Л. Н., Алоджиков М. И. Гр. Ереванского мед ин-та. Биологически активные вещества в норме и патологии, вып. 19, кн. 2, 77, 1980.
4. Насонов И. И., Мегалек М. И., Тарусов Б. И. В сб.: 3-4 Всесоюз. биологический съезд. Тезисы симп. докл., 188, 1971, Рига.
5. Махтарян В. Г., Бобочян Г. Е. Ж. жистер. и клин. мед., 9, 7, 1978.
6. Graess G. W., Eskbas K., Inglett G. E. J. Amer. Chem. Soc., 49, 855, 1972.
7. Morimatsu Nishikimi, N. Arpaiz Ryo and Kazuo Jaji. Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 2, 849, 1972.

«Биолог. ж. Армения», т. XXVI, № 3, 1983

УДК 577.15.591.8

АКТИВНОСТЬ АСПАРАГИНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* ВКМ-У-42 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ВЫРАЩИВАНИЯ

М. А. ДАВТЯН, К. Р. СТЕПАНИАН

Показано влияние различных источников азота на изменение pH среды и процессе роста дрожжей. При использовании аспартата pH непрерывно повышается, а при $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — понижается. В случае с аспаргином и глутамином pH среды снижается в течение 23 ч выращивания дрожжей, а в процессе дальнейшего их роста повышается. Примерно с такой же закономерностью изменяется и активность аспарагиназы. Найдены оптимальный состав и соотношение источников азота ростовой среды, при которых pH в процессе выращивания дрожжей поддерживается на постоянном уровне.

Показана высокая аспарагиназная активность дрожжей в первой стадии роста на твердом агаре. Увеличение срока выращивания приводит к снижению активности фермента.

Ключевые слова: дрожжи, аспарагиназа

Известно, что существуют различные механизмы регуляции биосинтеза аспарагиназы у микроорганизмов. На образование фермента по-разному влияют источники азота и углерода, pH среды, фаза роста и т. д.

В предыдущих наших работах исследовалось влияние азотного голодания и различных источников азота на активность аспарагиназы дрожжей. Были получены предварительные данные о зависимости активности фермента от фазы роста дрожжей (в течение 24 ч) при использовании в качестве источника азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и постоянном уровне pH среды, достигнутом путем периодической нейтрализации раствором NaOH [1].

В настоящей работе приводятся данные о зависимости активности аспарагиназы дрожжей от фазы их роста на твердом агаре, от срока выращивания (40 ч и более) в жидкой синтетической среде при использовании различных источников азота, а также результаты более детального исследования при этом динамики измерения pH ростовой среды.

Материал и методика. Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводилось по ранее описанным методикам [3].

В качестве ферментативного препарата использовались высушенные дрожжевые клетки [2]. Наличие аммиака в ростовой среде определяли реактивом Неслера.

Результаты и обсуждение. Эксперименты показали, что при использовании в качестве источника азота аспартата рН среды в процессе роста дрожжей непрерывно повышается, а $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, аспарагина и глутамина—снижается (табл. 1). В связи с этим появилась возможность найти оптимальный состав и соотношение источников азота ростовой среды, при которых рН последней в процессе выращивания дрож-

Таблица 1

Изменение активности аспарагиназы и рН среды в процессе выращивания дрожжей на разных источниках азота

Время выращивания дрожжей, ч	Источники азота	Значение рН среды в процессе выращивания дрожжей	Активность аспарагиназы, γNH_3	%
0	аспартат	6,4	32	16
12		6,8	187	100
15		7,0	154	82
18		7,13	148	79
21		7,2	100	53
23		7,35	95	50
41		8,65	128	68
0	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,4	32	16
12		3,7	187	100
15		3,2	150	80
18		3,0	100	53
21		2,85	71	38
23		2,6	25	13
41		2,1	00	00
0	аспарагин	6,4	32	16
12		6,25	190	100
15		6,15	154	81
18		5,25	131	69
21		4,55	113	59
23		4,20	93	49
41		8,25	135	71
0	глутамин	6,4	32	16
14		6,05	175	100
17		5,35	152	86
20		4,90	138	79
23		4,35	110	63
38			8,10	125
0	аспартат + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ соотношение по азоту 3:2	6,4	32	16
12		6,4	197	100
15		6,35	156	78
18		6,35	133	67
21		6,50	119	60
23		6,50	98	50
41		8,0	104	52
0	аспартат + аспарагин соотношение по азоту 1:2	6,4	32	16
12		6,35	195	100
15		6,50	152	78
18		6,50	125	64
21		6,50	98	50
23		6,50	93	48
41		8,20	130	66

жей поддерживается на постоянном уровне. Как видно из табл. 1, когда источником азота служит аспаргин с аспаргатов (в соотношении 2:1 по азоту), а также аспаргатов с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (в соотношении 2:3 по азоту), pH ростовой среды дрожжей поддерживается на постоянном уровне. Это свидетельствует о том, что при совместном присутствии данных источников азота в ростовой среде усвоение их происходит параллельно. Хроматографический анализ ростовой среды на разных этапах выращивания дрожжей также подтверждает вышесказанное, хотя, по нашим данным, пока нельзя утверждать, что они используются с одинаковой скоростью.

Изменение pH среды роста при различных источниках азота, вероятно, объясняется следующим образом. Так как аспаргатов добавляется в ростовую среду после его нейтрализации раствором NaOH до pH 6,4, возможно, в процессе выращивания дрожжей в результате усвоения аспаргатов pH среды повышается за счет того же NaOH. Снижение pH среды при использовании в качестве источника азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ происходит, по-видимому, вследствие преимущественного усвоения дрожжами ионов аммония и накопления в среде ионов сульфата. Снижение pH среды в первые 24 ч роста дрожжей на аспаргине и глутамине можно было бы объяснить преимущественным использованием амидного азота с накоплением в среде моноаминодикарбоновых кислот (аспарагиновая и глутаминовая). Однако хроматографический анализ среды в процессе выращивания дрожжей показал, что при усвоении дрожжами аспаргина аспаргатов в среде не образуется и, как уже было сказано, в вариантах с одновременным использованием в качестве источника азота аспаргина с аспаргатов усвоение их происходит параллельно. Это подтверждается и сохранением pH среды на постоянном уровне при выращивании дрожжей в указанных условиях. Очевидно, снижение pH ростовой среды в этих условиях (в вариантах с источником азота амидов аспаргина и глутамина) вызвано накоплением в ней кислых метаболитов, в частности, органических кислот.

Из табл. 1 видно, что в процессе роста дрожжей, независимо от источников азота, активность фермента снижается (раньше это было показано только в отношении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Наименьшую аспарагиназную активность дрожжи проявляют на 23-м часу роста (стабилизированная фаза) — 50% от исходного значения (при $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ активность аспарагиназы почти исчезает).

Таким образом, хотя при разных источниках азота pH ростовой среды меняется по-разному, изменение активности фермента (кроме варианта с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) примерно одинаково. Это происходит и при выращивании дрожжей в среде с постоянным pH, и при варьировании его, и при применении разных источников азота. А в вариантах с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ активность аспарагиназы снижается быстрее, чему, вероятно, способствует и резкое снижение pH в данном случае.

Из полученных данных видно, что при всех используемых источниках азота интенсивное образование аспарагиназы идет в начале лог-фазы роста, т. е. в энергично делящихся клетках. А в процессе выращивания и накопления биомассы активность ее снижается, причем поч-

ти одинаково, независимо от источника азота и значения рН среды. Даже при низких начальных значениях рН (рН=3,35, источник азота—аспартат без нейтрализации NaOH) проявляется высокая активность фермента в начале логфазы роста дрожжей (табл. 2).

Таблица 2

Изменение аспарагиназной активности и рН среды в процессе выращивания дрожжей на аспартате при низких начальных значениях рН среды

Время выращивания дрожжей, ч	рН среды	Активность аспарагиназы, γ NH ₃	Время выращивания дрожжей, ч	рН среды	Активность аспарагиназы, γ NH ₃
0	3,35	32	19	3,50	не определено
14	3,35	260	21	3,55	не определено
17	3,45	220	38	7,20	82

Опыты показали, что дрожжи обладают высокой аспарагиназной активностью и на первых стадиях их роста на твердом агаре (табл. 3), а при увеличении срока выращивания активность фермента снижается.

Таблица 3

Изменение активности аспарагиназы дрожжей в процессе их роста на твердом агаре

Дни выращивания дрожжей	Активность аспарагиназы, γ NH ₃	Дни выращивания дрожжей	Активность аспарагиназы, γ NH ₃
1	83	4	37
2	52	5	30
3	43		

При выращивании дрожжей в течение более длительного времени (от 24 ч до 40 ч и более), кроме варианта с (NH₄)₂ SO₄, рН ростовой среды повышается до значения 8 и более. При этом повышается и активность аспарагиназы по сравнению с ее минимальным значением (23 ч роста).

В случае использования в качестве источника азота аспарагина и глутамина при выращивании дрожжей в течение 30 и более часов полностью расходуются и источники азота, и глюкоза. По всей вероятности, при этом в дрожжах происходит катаболизм некоторых белков, что и может привести к индукции катаболических ферментов, в том числе и аспарагиназы. Исследования показали, что при этом в среде выделяется аммиак, что, по-видимому, и способствует повышению ее рН. Если же в среду добавляется глюкоза, то рН и количество аммиака начинают понижаться, одновременно снижается и активность аспарагиназы (табл. 4).

При использовании в качестве единственного источника азота аспартата, по массе равного аспарагину (соотношение по азоту 1:2), в течение 40 и более часов выращивания дрожжей аммиак в среде не образуется, но рН среды при этом повышается от 3,35 (исходное значение)

Таблица 4

Активность аспарагиназы дрожжей, выращиваемых на аспарагине в течение 40 ч, и после добавления в среду глюкозы и выращивания их в течение разного времени

Время выращивания дрожжей	pH среды	Наличие в среде аммиака	Активность аспарагиназы, γ NH ₃
40 ч (до полного расхода аспарагина и глюкозы)	8,2	+	114
После 40 ч роста + глюкоза и продолжение выращивания дрожжей			
2 ч	7,55	+	100
1 ч	7,55	+	78
22 ч	7,60	-	40

ние pH среды без нейтрализации NaOH) до 7,2 (табл. 3). По всей вероятности, в этих случаях образование аммиака не является единственной причиной повышения pH ростовой среды дрожжей.

Интересно, что в тех же условиях при добавлении в среду аспарта-та, вдвое превышающего массу аспарагина (соотношение по азоту 1:1), в среде образуется аммиак, что, по-видимому, объясняется высокой насыщенностью дрожжевых клеток азотом.

Наблюдаемые при $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ отклонения от обычной динамики изменения активности фермента, а именно резкое подавление активности при росте дрожжей и отсутствие реактивации на поздних стадиях роста, очевидно, объясняется резким падением pH среды уже на ранних стадиях выращивания дрожжей.

Таким образом, с одной стороны, самая высокая аспарагиназная активность у дрожжей проявляется в начале логфазы роста, когда протекают в клетке интенсивные анаболические процессы, с другой — активность фермента повторно повышается в глубокой стационарной фазе роста дрожжей, когда, вероятно, одновременно активно идут и катаболические процессы, вызывающие индукцию катаболических ферментов, в том числе и аспарагиназы.

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

Поступило 28 VI 1982 г.

CANDIDA GUILLIERMONDII BKM-Մ-42

ԿԱՆԴԻԴԱՆԿԵՐԻ ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆ, ԱՃԵՑՄԱՆ ՏԱՐՐԵՐ ՊԱՅԻՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Մ. Ա. ԴԱԳՔՅԱՆ, Կ. Ռ. ԱՍԵՓԱՆՅԱՆ

Հոդվածում ցույց է տրված խմորասնկերի աճման պրոցեսում ազոտի տարրեր աղբյուրների ազդեցությունը միջավայրի pH-ի վրա՝ նրբորակա ազոտի աղբյուր օգտագործվում է ասպարտատը, միջավայրի pH-ն անընդհատ բարձրանում է, իսկ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ի դեպքում՝ նվազում է նետարրերի է, որ ասպարազինի և գլուտամինի կիրառման դեպքում միջավայրի pH-ը նվազում է խմորասնկերի աճման 23 ժամվա ընթացքում, իսկ հետա-

գա ածման պրոցեսում՝ բարձրանում: Մոտավորապես նույն օրինաչափությամբ էլ (բացի $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ի տարբերակից) փոփոխվում է ասպարագինազային ակտիվությունը: Գտնվել են ազոտի աղբյուրների այնպիսի բաղադրություններ, որոնց դեպքում խմորասնկերի ածման ընթացքում միջավայրի pH-ը պահպանվում է հաստատուն:

Յույց է տրված, որ խմորասնկերը բարձր ասպարագինազային ակտիվությամբ են օժտված պինդ ազոտի վրա ածելու սկզբնական փուլում, իսկ ածման ժամանակամիջոցի երկարացմանը զուգընթաց ֆերմենտի ակտիվությունը նվազում է:

ACTIVITY OF ASPARAGINASE OF YEAST *CANDIDA GUILLIERMONDII* IN DIFFERENT CONDITIONS OF GROWTH

M. A. DAVTIAN, K. R. STEPANIAN

The composition of media containing certain nitrogen sources of nutrition and keeping the optimum stable pH has been determined. The maximum asparaginase activity has been observed during the growth of yeasts on agar medium. Enzymatic activity is decreased in prolonged cultures.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А., Степанян К. Р. Биолог. ж. Армении, 34, 8, 1981.
2. Степанян К. Р., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 34, 3, 1981.
3. Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 28, 9, 1975.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 3, 1983

УДК 577.15.591.8

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОЙ ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНАЗЫ

С. В. ЧУБАРЯН, Л. Р. ТУМАНЯН, Р. О. ТОРЧЯН

При исследовании свойств частично очищенной дрожжевой аргиназы максимальной активность фермента обнаружена при pH 9,6. Показано различное влияние ионов двухвалентных металлов на активность дрожжевой аргиназы. K_m исследованного фермента равен $5,6 \times 10^{-3} \text{M}$, K_1 для орнитина— $1,3 \times 10^{-3} \text{M}$, для лизина— $1,4 \times 10^{-3} \text{M}$. Пролин и ГАМК не оказывают влияния на активность фермента. Молекулярный вес равен 151400.

Ключевые слова: дрожжи, аргиназа.

В предыдущем сообщении нами были представлены результаты исследования аргиназной активности у различных представителей дрожжей рода *Candida*, а также разработанный нами способ очистки фермента из *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* ВКМ У-43,