

2. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., 1969.
3. Малащенко А. М., Егоров И. К. Генетика, 3, 59, 1967.
4. Саноцкий И. В., Авхименко М. М., Иванов В. Н. Токсикология новых промышленных химических веществ. 9, 71, Л., 1967.
5. Саноцкий И. В., Фоменко В. Н. и др. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию. М., 1977.
6. Саноцкий И. В., Фоменко В. П. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. М., 1979.
7. Чиркова Е. М. Автореф. канд. дисс., М., 1970.
8. Bartisch H. et al. Arch. Toxicol., 11, 249, 277, 1979.
9. Benjamin L. Cancer Research, 35, 2533, 1975.

«Биолог. ж. Армении». г. XXXVI, № 8, 1983

УДК 577.15.591.8

## АКТИВНОСТЬ АСПАРАГИНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ CANDIDA GUILLIERMONDII ВКМ-У-42 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ИХ ХРАНЕНИЯ

К. Р. СТЕПАНЯН, М. А. ДАВТЯН

В зависимости от значения рН среды хранения дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ-У-42 аэрация по-разному влияет на активность аспарагиназы. При низких значениях рН буфера (рН 3,0) она способствует сохранению активности фермента, при средних (рН 6,4) снижает ее, а при высоких существенного влияния на этот показатель не оказывает.

Под влиянием низкой рН внешней среды (рН 3,0) медленно (в течение 24 ч) понижается внутриклеточный рН, что, вероятно, и является причиной потери активности фермента.

*Ключевые слова:* дрожжи, аэрация, аспарагиназа.

Биологическая роль аспарагиназы, особенно у микроорганизмов, не выяснена. Можно только предполагать, что фермент способствует усвоению аспарагина и регулирует уровень аспарагина, аспартата и аммиака в клетке. Для выяснения роли ферментов в организме, в том числе и аспарагиназы, ценную информацию может дать исследование их активности при разных физиологических состояниях клетки (при варьировании источников азота и углерода, физико-химических параметров среды и т. д.).

Изучение влияния различных физико-химических факторов на активность фермента имеет большое прикладное значение с точки зрения разработки способов хранения и обеспечения максимального выхода ферментных препаратов при их получении, особенно в промышленных масштабах. В этом аспекте представляет определенный интерес изучение активности аспарагиназы при длительном хранении дрожжей в буфере с различными значениями рН.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что в некоторых экстремальных условиях роста дрожжей, в частности при азотном голодании в среде с 2%-ной глюкозой, активность аспарагиназы резко снижается. Снижается она и в процессе роста дрожжей и накопления биомассы [4].

В настоящей работе приводятся результаты исследования зависимости активности аспарагиназы дрожжей, выращенных до середины логфазы роста, от условий хранения.

*Материал и методика.* Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводились по ранее описанным методикам [5]. В качестве ферментного препарата использовались высушенные дрожжевые клетки [1]. Измерение количества биомассы проводилось нефелометрически (ФЭК 56, нейтральный фильтр). Дрожжи, выращенные до середины логфазы роста, после центрифугирования и трехкратного промывания холодной дистиллированной водой хранились в течение 25 ч в разных условиях. При хранении без аэрации колбы не встряхивались, в вариантах с аэрацией—подвергались встряхиванию на круговой качалке (180 об/мин при 30°). рН буфера доводили до 3,0 и 9,0, 0,05 М НСl и 0,05 М NaOH соответственно.

Условия хранения дрожжей: 0,05 М Na-, К-фосфатный буфер, рН 3,0; 6,4; 9,0, без аэрации и с аэрацией соответственно. К буферу с рН 3,0 без аэрации добавлены источники азота:  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , аспарат, аспарагин. Ростовая среда, рН 3,0 и 6,4, без аэрации.

*Результаты и обсуждение.* Данные табл. 1 показывают, что аспарагиназная активность дрожжей полностью подавляется при хранении в Na-, К-фосфатном буфере, рН 3,0, без аэрации, причем это происхо-

Таблица 1

Активность аспарагиназы дрожжей, выращенных до середины логфазы роста (исходная), и после хранения в разных условиях при 20° в течение 25 ч

Условия хранения дрожжей	Активность аспарагиназы, мкг $\text{NH}_3$		
	исходная	после хранения	% от исходной
В ростовой среде без аэрации			
рН 3,0	176	82	46
рН 6,4	178	180	100
В Na-, К-фосфатном буфере без аэрации			
рН 3,0	175	0	0
рН 3,0 + $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	178	30	22
рН 3,0 + аспарат	173	51	29
рН 3,0 + аспарагин	178	60	35
рН 6,4	176	176	100
рН 9,0	162	108	66
В Na-, К-фосфатном буфере с аэрацией			
рН 3,0	178	95	53
рН 6,4	158	105	67
рН 9,0	140	100	71

дит постепенно в течение 25—27 ч (табл. 2). В тех же условиях, но при рН 6,4 активность фермента не изменяется. При перенесении дрожжей после потери активности фермента (после хранения их в Na-, К-фосфатном буфере, рН 3,0, без аэрации) в буферную среду с рН 6,4 или 8,0 она не восстанавливается даже после хранения их в течение 25 ч.

Таблица 2

Зависимость активности аспарагиназы дрожжей, выращенных до середины логфазы роста, от продолжительности хранения в Na—, K—фосфатном буфере, рН 3,0, 20° (без аэрации)

Время хранения, ч	Активность аспарагиназы, мкг NH <sub>3</sub>	% от исходной
0	156	100
4,5	134	86
9,5	96	61
22,5	48	30
26,0	0	0

Общеизвестно, что рН среды оказывает большое влияние как на рост и размножение клеток, так и на другие процессы, происходящие в них, в частности, на активность отдельных ферментов. Высокая организованность живой клетки предполагает определенную резистентность рН внутренней среды при изменении концентрации водородных ионов внешней среды. Возможно, изменение рН среды вызывает в метаболизме сдвиги, которые и обуславливают жизнедеятельность клетки в указанных неблагоприятных условиях внешней среды.

Для внесения ясности в эти вопросы был определен рН гомогената дрожжевых клеток до и после хранения их при разных значениях рН внешней среды. Данные табл. 3 показывают, что в нормальных условиях рН клетки равен 6,6, а при хранении дрожжей в условиях низкого значения рН внешней среды (рН 3,0) он понижается до 4,6. В случае высоких значений рН внешней среды (рН 9,0) рН клетки изменяется незначительно.

Таблица 3

Изменение рН дрожжевого гомогената под влиянием рН внешней среды в процессе хранения дрожжей (без аэрации)

Среда хранения	Время хранения, ч	рН среды	рН гомогената
Na—, K—фосфатный буфер	25	3,0	4,6
	25	6,4	6,6
	25	8,3	6,85
Ростовая среда	17	4,7	6,35
	35	8,3	6,8
	35	8,7	7,0

Из полученных данных можно заключить, что дрожжи довольно долго сохраняют рН клетки, защищаясь от влияния рН внешней среды.

Следующим этапом работы было изучение влияния низких значений рН (рН 4,6) в гомогенате дрожжей на активность аспарагиназы. С этой целью выращенные в нормальных условиях (рН 6,4) дрожжи гомогенизировали в воде, и полученный водный экстракт гомогената разделяли на две части. В одной из них рН не изменяли, а в другой — снижали 0,1 М HCl до 4,6. Определение активности фермента через час показало, что в первом варианте она высокая, а во втором отсутствует.

Можно заключать, что под влиянием низкого рН внешней среды (рН 3,0) по крайней мере через 24 ч понижается внутриклеточный рН, что и может быть непосредственной причиной потери активности фермента.

Примечательно, что дрожжи с подавленной аспарагиназной активностью (после хранения их в Na-, K-фосфатном буфере, рН 3,0, без аэрации) и свежие дрожжи (после выращивания до середины логфазы роста) при перенесении в нормальную ростовую среду с первых же минут размножаются одинаково эффективно. Это дает основание предполагать, что хранение дрожжей при низких значениях рН буфера вызывает обратимые сдвиги в отношении их роста.

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что при хранении дрожжей в ростовой среде с рН 3,0 сохраняется почти 50% активности фермента, хотя рост клеток прекращается из-за отсутствия аэрации. Возникает вопрос, чем же обусловлено сохранение активности аспарагиназы в этих условиях. Проведенные в этом направлении исследования показали (табл. 1), что добавление различных источников азота значительно сохраняет активность фермента от инактивации при хранении в Na-, K-фосфатном буфере с рН 3,0.

Таким образом, использованные источники азота предотвращают ингибирование аспарагиназы. По-видимому, проникая в клетку и включаясь в метаболизм, они либо способствуют созданию условий для сохранения активности аспарагиназы, либо непосредственно стабилизируют активность фермента. Более вероятным представляется первое предположение, так как последующие наши исследования показали, что в условиях хранения дрожжей в фосфатном буфере с рН 3,0 и активной аэрации, т. е. при сохранении активного метаболизма клетки, предотвращается ингибирование аспарагиназы. Несколько сложнее объяснить отрицательное влияние аэрации на сохранение активности аспарагиназы при хранении дрожжей в фосфатном буфере с рН 6,4.

В случае хранения дрожжей в буфере с рН 9,0 без аэрации активность фермента понижается и составляет примерно 66% от исходной, при этом в среде отмечаются следы аммиака. Почти такая же картина наблюдается в условиях аэрации.

Таким образом, в зависимости от значения рН буфера аэрация по-разному влияет на аспарагиназную активность дрожжей при их хранении. При низких значениях рН буфера (рН 3,0) она способствует сохранению активности аспарагиназы, при средних (рН 6,4) снижает ее и не оказывает существенного влияния в случае рН 9,0.

По литературным данным, аэрация при выращивании по-разному влияет на проявление активности аспарагиназы у разных микроорганизмов. У некоторых из них она угнетает образование аспарагиназы [2, 6, 7], у других синтез фермента повышается [8, 9], а в некоторых случаях существенного влияния на активность аспарагиназы не оказывает [3].

Опыты показывают, что активность аспарагиназы не изменяется, когда дрожжи хранятся в ростовой среде без аэрации при рН 6,4. Следует отметить, что активность аспарагиназы не зависит от ростовой сре-

ды, свежая она или использованная (среда дрожжей, выращенных до середины логфазы роста).

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

Поступило 21.VII 1982 г.

CANDIDA GUILLIERMONDII BKM-Y-42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ  
ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ՝ ՆՐԱՆՑ ՏԱՐՔԵՐ  
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ՊԱՇՆԵԼԻՍ

Կ. Ռ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

Կախված *Candida guilliermondii* BKM-Y-42 խմորասնկերի պահելու միջավայրի pH-ի արժեքից՝ աէրացիան տարբեր ձևով է ազդում ասպարագինազայի ակտիվության վրա:

Ընդ որում, բուֆերի pH-ի (pH 3,0) ցածր արժեքների դեպքում այն նպաստում է ֆերմենտի ակտիվության պահպանմանը, միջին արժեքների (pH 6,4) դեպքում՝ իջեցնում, իսկ բարձրի դեպքում՝ որոշակի ազդեցություն չի թողնում այդ ցուցանիշի վրա: Արտաքին միջավայրի ցածր pH-ի (pH 3,0) ազդեցության տակ դանդաղորեն (24 ժամվա ընթացքում) իջնում է ներքաշին pH-ը, որն էլ հանդիսանում է ֆերմենտի ակտիվության կորստի պատճառը:

ACTIVITY OF *CANDIDA GUILLIERMONDII* BKM-Y-42 YEASTS  
ASPARAGINASE UNDER DIFFERENT CONDITIONS  
OF THEIR PRESERVATION

K. R. STEPANIAN, M. A. DAVTIAN

In dependence of significance of pH of *Candida guilliermondii* BKM-Y-42 yeasts keeping medium aeration differently influences on the activity of asparaginase.

The low pH of buffer solution promotes the preservation of the enzyme activity; pH 6,4 decreases it and alkaline one has almost no influence on that index.

The intercellular pH slowly decreases under the influence of low pH of outward medium (pH 3,0). The latter is the cause of the loss of enzymes activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А., Степанян К. Р. Биолог. ж. Армении, 34, 8, 1981.
2. Еременко В. В., Соколов Н. Н. Прикладная биохимия и микробиология, 10, 1, 1974.
3. Еременко В. В., Евсеев Л. Г., Николаев А. Я. Микробиология, 37, 2, 1975.
4. Степанян К. Р., Давтян М. А., Биолог. ж. Армении, 34, 3, 1981.
5. Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 28, 9, 1975.
6. Тюльпанова Э. С., Еременко В. В., Мардашев С. Р. Микробиология, 41, 3, 1972.
7. Чайковская С. М., Макарова Р. А., Мешков А. Н., Левитов М. М. Прикладная биохимия и микробиология, 10, 3, 1974.
8. Robertis J., Burson G., Hill J. M. J. Bacteriol., 95, 2117, 1968.
9. Cedar H., Schwartz J. H. J. Bacteriol., 96, 6, 1968.