

29. Sve hag S. E., Nilsen H. Endocytosis and Exocytosis Host. Def. Symp. Celebration 10th. Anniv. Univ. Zinköping, 1980 Basel, 112—129, 1980
30. Schwarr R. S. Kidney Int., 19, 3, 474—484, 1981.
31. Vorlaender K. O. Kolloquia rheumatol., 8 7—19, 1980

«Биологический журнал», т. XXVII, № 5, 1984

УДК 577.15.591.8

ОЧИСТКА Д-АМИНОКИСЛОТНЫХ ОКСИДАЗ ASPERGILLUS NIGER R-1

С. П. ОГАНЕСЯН, М. А. ДАВТЯН

Разработан способ очистки Д-оксидаз аминокислот гриба *Asp. niger* R-1, предварительно выращенного на мелассе. Степень очистки фермента 10, выход—70%.

Ключевые слова: плесневые грибы, аспергилл, оксидазы.

В предыдущем сообщении нами были описаны некоторые свойства Д-аминокислотных оксидаз у *Asp. niger* R-1 [1].

Нами предпринята попытка очистки и получения высокоактивного препарата Д-аминокислотных оксидаз с целью применения его при разделении Д- и L-форм из рацематов, результаты которой приводятся в настоящем сообщении.

В литературе имеется описание ряда методов очистки Д-аминокислотных оксидаз из различных объектов [2, 3, 4]. В отношении *Asp. niger* предложен только один метод очистки Д-аминокислотных оксидаз [2]. Авторам при помощи обработки бесклеточного экстракта протамин сульфатом, фракционирования $(NH_4)_2SO_4$, хроматографии на геле фосфата кальция и гельфильтрации через биогель G-200 из мицелия *Asp. niger*, предварительно выращенного на синтетической среде с Д-фала, выделен и очищен фермент в 100 раз, выход составлял 30%.

Материал и методика. Объектом исследования служили плесневые грибы *Asp. niger* R-1. Выращивание и определение ферментативной активности проводилось по ранее описанной методике [1]. Активность фермента выражалась в мкмольх NH_3 , выделяющегося при часовой инкубации на 1 г свежего мицелия.

Результаты и обсуждение. Проведена очистка ферментного препарата Д-аминокислотных оксидаз производственного штамма *Asp. niger* R-1.

Первый этап—получение бесклеточного экстракта. Сырой мицелий (5 г в 25 мл буфера) подвергался гомогенизации в течение 10 мин в стеклянном гомогенизаторе типа Эльведжем-Поттера в 0,05 м К-Na-фосфатном буфере, pH 8,3, при температуре 0—2°, после чего гомогенат центрифугировался при 10000—14000 об/мин (8000—10000 г) в течение 20 мин. При этом активность проявлялась в надосадочной фракции.

Второй этап — обработка надосадочной жидкости 1%-ным раствором протамин сульфата. Надосадочную жидкость с протамином сульфатом перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин при +2° и затем центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин. Активность фермента определялась как в надосадке, так и в осадке и была обнаружена в надосадочной жидкости (табл. 1). Как видно из приведенных в табл.

Таблица 1
Этапы очистки Д-аминокислотных оксидаз у *Asp. niger* R-1
(субстрат Д-Мет)

Этапы очистки	Общий белок и инк убационом объем, мг	мкМоль NH ₂ и индубационом объем — 4,5 мл	мкМоль NH ₂ на 1 г мицелля	Удельная актив- ность мкМоль NH ₂ на 1 мг белка	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	12	9,2	35	0,68	100	0,68
1%-ный сульфат	6,25	6,25	25	1,00	71	1,45
40-80%-ный (NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	14,4	25	2,85	71	4,2
Гельфильтрация на сефа- дексе G-150	1,8	11,6	25	6,50	71	9,0

данных, удельная активность фермента повысилась в 2 раза, что объясняется удалением загрязняющих веществ, понижающих ферментативную активность.

Третий этап — высаливание. Надосадочная жидкость, полученная после обработки протамином сульфатом, подвергалась высаливанию (NH₄)₂SO₄ (40%, 80% насыщения). Надосадочную жидкость с сульфатом аммония перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин при 2° и затем центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин. Осадок после 40%-, 80%-ного насыщения сульфатом аммония подвергали обессоливанию на колонке с сефадексом G-25 (2×40 см), уравновешенной 0,05 М К-Na-фосфатным буфером, при скорости фильтрации 1 мл/мин. Обессоленную фракцию (от 15 до 21,5 мл) собирали для дальнейшей очистки.

При сравнении данных, полученных после обработки экстракта протамином сульфатом и дальнейшего его высаливания, обнаружилось, что общая активность (мкМоль на 1 г мицелля) не изменяется, однако после высаливания удельная активность повышается в 2,85 раза, фермент очищается в 2,5—3 раза. Выход фермента в обоих случаях одинаков и составляет 71%. По сравнению с необессоленным экстрактом фермент очищается в 4,2 раза.

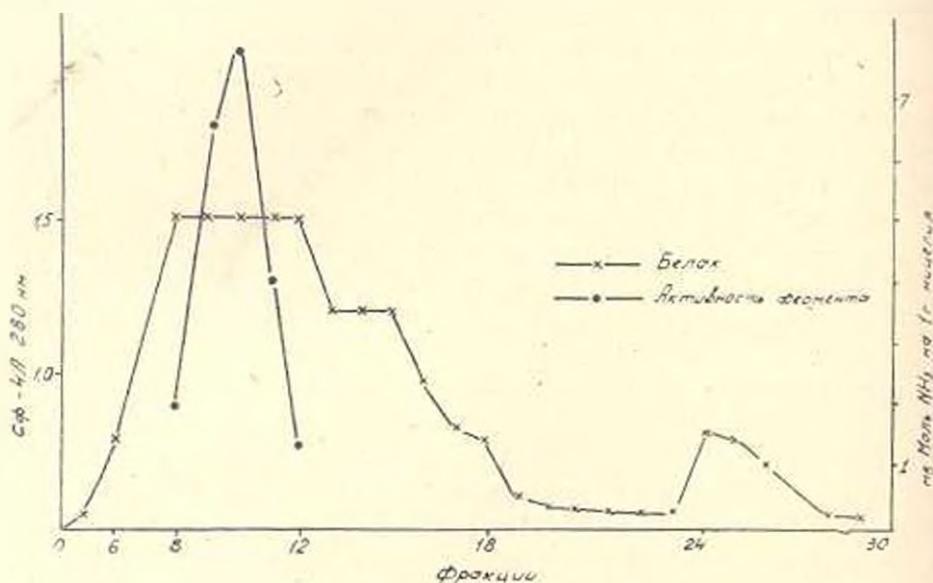
Четвертый этап — гельфильтрация. Полученный на III этапе обессоленный экстракт подвергался гельфильтрации на колонке с сефадексом G-150 (2,5×80 см), уравновешенной 0,05 М К-Na-фосфатным буфером (скорость фильтрации 5 мл за 15 мин, объем фракции 5 мл).

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что удельная активность фермента после гелифильтрации составляет 6,25 мкМоль/мг белка, и он очищается в 10 раз по сравнению с экстрактом.

Этапы очистки Д-аминокислотных оксидаз у *Asp. niger* R-1
(субстрат Д-Мет)

Этапы очистки	Белок в инкубационном объеме, мг	мкМоль NH_2 в инкубационном объеме, м.л.	мкМоль NH_2 на 1 г мицелия	Удельная активность мкМоль NH_2 на 1 мг белка	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	11	6,8	28,2	0,61	100	0,6
40-80%-ый $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7	11,6	20,4	1,70		2,8
Гельфильтрация на сефадексе G-150						
VIII фракция	1,15	2,1	1,85	1,82		10
IX фракция	1,25	7,58	6,65	6		
X фракция	1,60	8,4	7,46	5,25		
XI фракция	1,60	4,7	4,19	2,93		
XII фракция	1,35	1,58	1,39	1,17		
Сумма фракций	6,95	24,2	21,3	17,17	75	

Нас интересовал также вопрос очистки Д-аминокислотных оксидаз при исключении этапа с протамин сульфатом. Из данных табл. 2 видно, что удельная активность фермента после высаливания по сравнению с экстрактом составляет 1,7 мкМоль/мг белка, фермент очищается в 2,8 раз, а выход его составляет 75%. Эти результаты сходны с данными

Рис. Активность Д-аминокислотной оксидазы после гельфильтрации *Asp. niger* R-1.

ми, полученными при обработке экстракта перед высаливанием протамин сульфатом. Относительно гельфильтрации можно сказать, что активность Д-аминокислотных оксидаз сохраняется такой же, какой она была в предыдущих опытах, фермент очищался в 8,4—9 раз. Из указанного следует, что обработка экстракта 1%-ным раствором прота-

мин сульфата не ведет к повышению удельной активности Д-аминокислотных оксидаз, и, следовательно, применение его для очистки может быть исключено.

Как видно из рис., в результате гельфильтрации получены два белковых пика. Активность Д-аминокислотных оксидаз определялась во всех фракциях, однако активными оказались 5 фракций (VIII—XII).

Степень очистки фермента после высаливания и гельфильтрации увеличивалась в 1 раз. Это интересно с той точки зрения, что, очевидно, на всех этапах очистки фермент остается связанным с коферментом—ФАД, в добавлении которого на уровне очищенного фермента нет нужды.

Таким образом, для очистки Д-аминокислотных оксидаз у *Asp. niger* R-1 необходимы следующие этапы: высаливание бесклеточного экстракта при 40—80%-ном насыщении сульфатом аммония, гельфильтрация с использованием С-150.

Целью следующей серии опытов было выяснение термостабильности Д-аминокислотных оксидаз (табл. 3).

Таблица 3
Термообработка Д-аминокислотных оксидаз у *Asp. niger* R-1
(субстрат Д-Мет)

Субстрат Д-Мет	Общий белок в инкубационном объеме, мг	мкмоль NH ₂ в инкубационном объеме 4,5 мл	мкмоль NH ₂ на 1 г мицелия	Удельная актив- ность мкмоль NH ₂ на 1 мг белка	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	14	5,9	24	0,4	100	
45°, 10 мин	12	3,4	12,3	0,28	50	0,7
55°, 10 мин	8	2,5	8,9	0,30	37	0,7

Полученный бесклеточный экстракт подвергли термической обработке при 45° и 55° в течение 5, 10 мин. Экстракт (5 мл) энергично перемешивали на аппарате Варбурга, потом быстро охлаждали, помещая его в баню со льдом и солью (температура от 2°—3°), затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин при +3°.

Результаты этой серии эксперимента показали, что термическая обработка при 45° в течение 10 мин приводит к падению активности фермента в 2 раза. Выход, по сравнению с экстрактом, для Д-мет составляет 50%. Обработка при 55° в течение 10 мин снижала активность фермента в 3—4 раза, а выход составлял 20—30%.

Из полученных данных следует, что Д-аминокислотные оксидазы у *Asp. niger* R-1 термолабильны, и термическая обработка как этап очистки неприемлема.

Евлевский государственный университет,
кафедра биохимии

Поступило 11.VII 1983 г.

ASPERGILLUS NIGER R-1-ի D-ԱՄԻՆԱԹՔԱՅԻՆ
ՕՔՍԻԳԵՉԱՆԵՐԻ ԻԱՔՐՈՒՄԸ

Ս. Պ. ՀՈՎԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻԱՆ

Մշակվել է մեղասալի վրա աճեցրած *Asp. niger* R-1-ի բջիջների D-ամին-
ոպթիմալին սթրիպազների մաքրման մեթոդ: Ֆերմենտար մաքրվել է տասն ան-
գամ՝ 70 տոկոս ելքով:

PURIFICATION OF D-AMINOACID OXIDASES
OF *ASPERGILLUS NIGER* R-1

S. P. HOVANESIAN, M. A. DAVTIAN

D-Aminoacid oxidase has been isolated and purified from the cell-
free extracts of *Asp. niger* R-1, grown on the molasses. The degree
of purification of the enzyme is 10, the yield is 70 per cent.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян М. А., Оганесян С. П. Биолог. ж. Армения, 16, 11, 1983.
2. Kishore G., Vaidyanathan G. S. India J. Biochem. Biophys., 13 216, 1976.
3. Posenfeld M., Letter G., Edward H. Can. J. Biochem., 55, 1, 66, 1977.
4. Raunto R. P., Jenkins W. T. J. Bacteriol., 115, 25, 60, 1973a.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVII, № 5, 1984

УДК 591.1.05

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ
АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ, МОЗГА И ПОЧЕК
В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ КУР

Т. Г. АРУТЮНЯՆ, С. А. КԱՐԱՔԵՏՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎՅԱՆ

Исследована электрофоретическая подвижность аргиназ экстракта и отдельных
ее пиков, полученных при гельфильтрации мозга, печени и почек в эмбриогенезе кур.
В экстрактах мозга и печени всего эмбриогенеза аргиназная активность проявляется
в двух полосах, мигрирующих к аноду и катоду. В почках 11-дневного эмбриона она
обнаружена в одной из белковых фракций, мигрирующих к аноду, а у вылупившихся
цыплят появляется дополнительная активность, движущаяся к катоду. В фореграм-
мах экстрактов печени 6-дневного эмбриона аргиназная активность выявлена в одной
из белковых фракций, мигрирующих к аноду, и в двух—к катоду, которые постепен-
но исчезают.

Ключевые слова: эмбриогенез кур, аргиназы, изоферменты, электрофорез.

Для изучения роли различных изоэнзимов аргиназы в метаболизме
клетки, помимо метаморфозирующихся организмов [5, 6], удобным объ-
ектом является куриный эмбрион, который в процессе эмбриогенеза пре-
терпевает смену типов азотистого катаболизма [9, 11].