

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ ДРОЖЖЕВОЙ И ПЕЧЕНОЧНОЙ АРГИНАЗ

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

Изучались некоторые физико-химические и кинетические свойства аргиназ, выделенных из печени крупного рогатого скота и дрожжей *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43. Существенные различия в свойствах позволили предположить, что дрожжевой фермент представляет собой одну из неуротелических форм аргиназы.

Ստուժանախորհրդի և խոշոր եզրուրազոր անասունների լյարդի և *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43 խմորասնկերի արգինազաների որոշ ֆիզիկա-քիմիական և կինետիկ նատիոֆունկցիոնների Հատկությունների մեջ եղած էական տարբերությունները նախազորություն և՛ սովել ենթադրելու, որ խմորասնկերի ֆերմենտը նախասնկում է արգինազայի ոչ ուրոտելիկ ձևերից մեկը:

Some physico-chemical and kinetic properties of arginases, isolated from the liver of big-horned cattle and yeasts *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43 have been studied. Essential differences in properties have allowed to assume that the yeast enzyme is one of the nonurotelic forms of arginase.

Ключевые слова: аргиназа, физико-химические и кинетические свойства

Известно, что аргиназы, выделенные из различных организмов, отличаются по физико-химическим, кинетическим, иммунохимическим и регуляторным свойствам [16, 18, 20]. Наиболее существенные различия наблюдаются между уротелической—печеночной аргиназой млекопитающих и неуротелической, выделенной из разных организмов и не участвующей в процессах нейтрализации аммиака [12, 22]. Очевидно, эти ферменты имеют неодинаковое происхождение и возникли на разных этапах эволюционного развития организмов [5].

Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что у дрожжей рода *Candida* имеются все ферменты орнитинового цикла [1]. Однако пока трудно утверждать, что эти ферменты функционируют в едином механизме биосинтеза мочевины. В равной мере остается открытым вопрос о том, является ли аргиназа дрожжей уротелическим ферментом. В этой связи представляло интерес провести сравнительное изучение некоторых физико-химических и кинетических свойств аргиназы печени млекопитающих и дрожжевой аргиназы.

Материал и методика. В работе использовали препараты аргиназы печени крупного рогатого скота (Реанал, ВНР), трипсина (Слофа, ЧССР), уреазы (Олапский завод), N-этилмаленимида, (NЭМ) (Серва, ФРГ), L-лизин HCl, L-орнитин HCl, L-пролин, L-треонин, L-лейцин, L-глутамин, ГАМК (Реанал, ВНР). Дрожжевую аргиназу выделяли из культуры дрожжей *C. guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43, как описано ранее [6]. Препарат в среде три-ацетатного буфера (рН 8) с 1 мМ $MnCl_2$ и 5 мМ L-треонина был очищен в 79 раз.

Растворы аргиназы в концентрации $1,5-7,5 \cdot 10^{-6}$ М готовили на 0,05 М глициновом буфере (рН 9,5). Трипсин перед употреблением выдерживали в кислой среде в течение 16 ч при 37° для инактивации примесей химотрипсина [7]. Затем фильтровали, с помощью добавок 1 N NaOH доводили рН до 8-9,5. Концентрацию белка определяли по методу Лоурн [17].

Обработку трипсином проводили при 37° в течение 20—25 мин при весовом соотношении фермент:субстрат—1:1 или 1:3. Аргиназную активность определяли по методу Райнер с некоторыми изменениями, как описано ранее [2]. Перед определением активности пробы разбавляли в 40—50 раз. При исследовании влияния на протеолиз аминокислот растворы их добавляли к раствору аргиназы, выдерживали в течение 15 мин, затем проводили протеолиз. Конечная концентрация аминокислот в пробах— 10^{-2} — $5 \cdot 10^{-3}$ М. Аргинин добавляли к раствору аргиназы непосредственно перед началом реакции протеолиза.

При исследовании термостабильности растворы ферментов выдерживали на водяной бане при соответствующей температуре в течение 10 мин, затем определяли аргиназную активность при 37°, разбавив пробу 0,05 М глициновым буфером (рН 9,5) в 50 раз.

Величины ингибиторных констант определяли по методу Диксона [8]. В опытах по изучению влияния НЭМ растворы аргиназы (рН 7,8) с реагентом инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре (20°C), затем определяли остаточную активность, предварительно разбавив пробу в 6 раз.

Результаты и обсуждение. Протеолитическая чувствительность растворимых ферментов является важным свойством, определяющим время полужизни их в живых клетках. Факторы, которые влияют на это свойство, могут играть в организме существенную роль. Как показано в ряде работ [14, 23], аргиназа очень чувствительна к изменению метаболических условий в организме. Нами была исследована кинетика инактивации аргиназы печени крупного рогатого скота и дрожжевой аргиназы при протеолизе трипсином.

Как видно из рис. 1, аргиназа печени крупного рогатого скота теряет активность под действием трипсина. В течение 20 минут инкубации при 37°C и соотношении фермент:субстрат—1:4 активность снижается на 90%. Это свидетельствует о том, что чувствительные к трипсину сайты расположены вблизи от активного центра и играют важную роль в проявлении активности фермента.

В одной из работ [11] было показано, что протеолитическая чувствительность аргиназы печени быка в присутствии ионов марганца (1—50 мМ) увеличивается. Другие авторы обнаружили, что добавление этих ионов приводит к значительному снижению степени инактивации аргиназы печени крыс при взаимодействии с лизосомальными ферментами [15]. В наших экспериментах, однако, предварительная инкубация аргиназы печени крупного рогатого скота при 37° в течение 20 мин с 2,5 мМ $MnCl_2$ не влияла на степень инактивации фермента трипсином (рис. 1А).

Исследование влияния разных аминокислот на инактивацию аргиназы трипсином (рис. 1), показало, что некоторые из них замедляют этот процесс в указанных условиях. Наиболее эффективно предохраняют аргиназу от потери активности аргинин и орнитин: через 20 мин инкубации с трипсином в присутствии этих аминокислот активность аргиназы снижается только на 40%. Лизин, лейцин и пролин, которые являются ингибиторами аргиназы [13, 19, 21], значительно менее эффективны, а глутамин совсем не влияет на процесс инактивации аргиназы.

Как показано в работе [11], ни используемые аминокислоты, ни ионы марганца не влияют на активность трипсина.

Дрожжевая аргиназа также инактивируется под действием трипсина (рис. 1 Б). При соотношении фермент:субстрат—1:3 и рН 8 активность этого фермента полностью подавляется уже через 5 мин после начала реакции. Аргинин и орнитин в этом случае также оказывают частичное защитное влияние: через 5 мин инкубации дрожжевой аргиназы

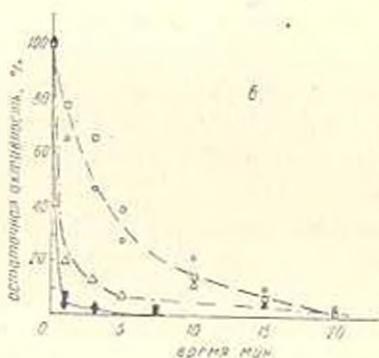
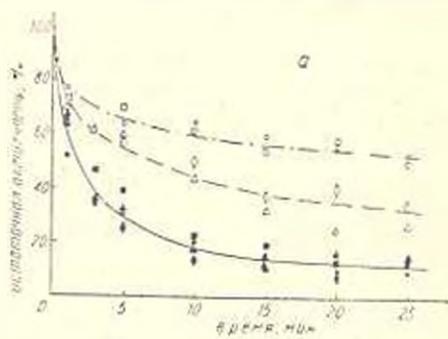


Рис. 1.

Рис. 1. Кинетика инактивации аргиназы печени крупного рогатого скота (а) и дрожжевой аргиназы (б) при взаимодействии с трипсином (●) и влияние на этот процесс аргинина (□), лизина (Δ), орнитина (○), пролина (■), лейцина (—), глутамина (▲) и ионов марганца (◆).

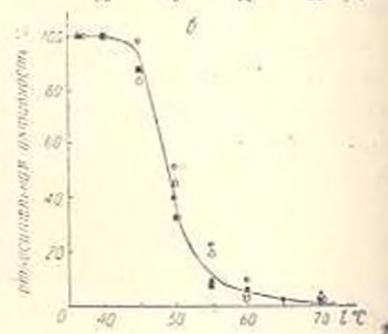
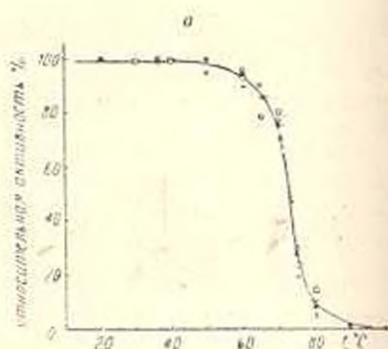


Рис. 2.

Рис. 2. Терминактивация печеночной (а) и дрожжевой (б) аргиназы и влияние на нее орнитина (○), лизина (х), троеонина (Δ), пролина (■) и ионов марганца (□). Время инкубации—10 мин.

с трипсином в присутствии этих аминокислот сохраняется около 40% исходной активности. Защитное влияние лизина выражено слабее, а лейцин и пролин не оказывают влияния на процесс инактивации фермента. Таким образом, аргинин и орнитин в одинаковой мере частично предохраняют аргиназу печени крупного рогатого скота и дрожжевую аргиназу от инактивации в присутствии трипсина. Наличие этих аминокислот в клетке в достаточной концентрации, возможно, оказывает влияние на скорость деградации аргиназы под действием протеолитических ферментов.

Изучение термостабильности аргиназы показало, что печеночный фермент сохраняет активность при нагревании до 60–65° (рис. 2А). Дальнейшее повышение температуры приводит к снижению активности фермента. При 80° в течение 10 мин она снижается на 90%. Кинетика инактивации печеночной аргиназы при 75° показана на рис. 3. Дрожже-

вая аргиназа оказалась более термолабильной. Инкубация ее при 60° в течение 10 мин приводит к почти полной потере активности (рис. 2 Б). Кинетика инактивации этого фермента при 55° приведена на рисунке 3.

Те же эксперименты были проведены в присутствии некоторых аминокислот (рис. 2). Из рисунка видно, что присутствие орнитина, лизина, пролина и треонина не отражается на скорости инактивации печеночной и дрожжевой аргиназ в данных условиях. Присутствие ионов марганца в концентрации 0,25 М в растворе также не влияет на чувствительность печеночной аргиназы к нагреванию.

Реагент на сульфгидрильные группы в белках—НЭМ не влияет на активность аргиназы печени крупного рогатого скота даже при использовании его в высоких концентрациях, что хорошо согласуется с литературными [18], а также нашими данными, полученными при изучении влияния на этот фермент парахлормеркурибензоата [4]. Дрожжевая аргиназа эффективно ингибируется НЭМ (рис. 4). Наличие существен-

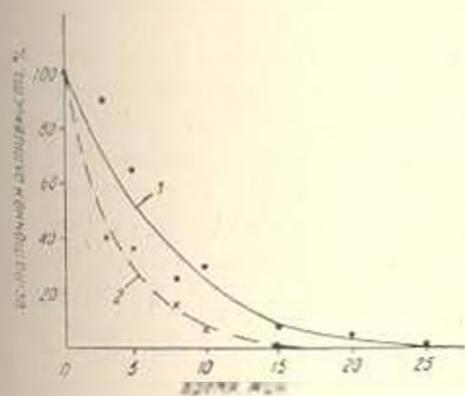


Рис. 3.

Рис. 3. Кинетика термоинактивации печеночной (1) и дрожжевой (2) аргиназ при температурах 75° и 55° соответственно

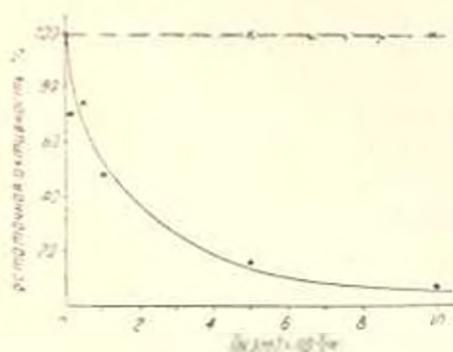


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость остаточной активности дрожжевой аргиназы от концентрации НЭМ. Концентрация аргиназы в пробах— $2,4 \cdot 10^{-6}$ М.

ных для активности сульфгидрильных групп у этого фермента было показано нами ранее с помощью ПХМБ [9]. Данные, полученные при химической модификации дрожжевой аргиназы НЭМ, подтверждают эти результаты. Таким образом, эти ферменты отличаются друг от друга и по чувствительности к сульфгидрильным реагентам.

Определение величин констант ингибирования аргиназы некоторыми аминокислотами показало, что и в этих свойствах имеются различия (табл.). Так, хотя орнитин и лизин для обоих ферментов являются конкурентными ингибиторами, однако значения ингибиторных констант у них различны. Кроме того, пролин не ингибирует дрожжевую аргиназу, но является конкурентным ингибитором для печеночного фермента ($K_i = 2,4$ мМ). ГАМК не влияет на активность обоих ферментов.

Величина K_m для аргиназы печени крупного рогатого скота при pH 9,5 равна 2,5 мМ [4], а для дрожжевой аргиназы—5,6 мМ [10]. Отличаются они и по молекулярной массе: у дрожжевого фермента—

Таблица. Величины констант ингибирования аргиназы аминокислотами (рН 9,5)

Фермент	K_i (мМ)			
	L-орнитин	L-лизин	L-пролин	ГАМК
Дрожжевая аргиназа	1,3	1,4	—	—
Аргиназа печени крупного рогатого скота	18	6	24	—

151000 Да [10], а у аргиназы печени крупного рогатого скота—120000 Да [3].

Таким образом, в свойствах исследуемых нами ферментов имеются существенные различия. Дрожжевая аргиназа, в отличие от печеночной, чувствительна к сульфгидрильным реагентам, имеет большую молекулярную массу и значительно менее термостабильна. Имеются различия и в кинетических свойствах: сравнительно низкое сродство к субстрату у аргиназы из дрожжей, существенная разница в величинах констант ингибирования аминокислотами (табл.). Отличаются они и чувствительностью к протеолизу трипсином. Полученные данные указывают на то, что у этих ферментов имеются существенные различия в структуре, что отражается на их физико-химических и кинетических свойствах. Это позволяет предположить, что дрожжевая аргиназа представляет собой одну из неуротелических форм аргиназы. Дальнейшие исследования, возможно, выявят и другие различия в структуре и свойствах этих ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян Г. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1980.
2. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 9, 44—49, 1974.
3. Геворкян М. Л., Закарян А. Е. В сб.: Вопросы биологии, 2, 90—100, 1981.
4. Геворкян М. Л. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1985.
5. Давтян М. А., Буянтян Г. Х. Биохимия, 35, 412—417, 1970.
6. Давтян М. А., Чубарян С. В., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 32, 9, 906—911, 1979.
7. Девени Г., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976.
8. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. М., 1982.
9. Туманян Л. Р., Чубарян С. В., Торчян Р. О., Мовсисян А. С. Биолог. ж. Армении, 36, 6, 485—489, 1983.
10. Чубарян С. В., Туманян Л. Р., Торчян Р. О. Биолог. ж. Армении, 36, 3, 233—238, 1983.
11. Bond J. S. Biochem. Biophys. Acta, 327, 1, 157—165, 1973.
12. Grazi E., Magri E. Biochem. J., 126, 3, 667—674, 1972.
13. Greenberg D. M., Mohamed M. S. Arch. Biochem., 4, 1, 365—375, 1945.
14. Greenberg D., Sahib M. K., Kline W. E. Arch. Biochim. Biophys., 2, 137, 477—482, 1970.
15. Halder M., Segal H. L. Arch. Biochim. Biophys., 148, 1, 228—237, 1972.
16. Hirsch-Kolb H., Heine J. P., Kolb H. J., Greenberg D. M. Comp. Biochem. Physiol., 37, 3, 345—359, 1970.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 265—275, 1951.

18. Muszynska G., Severina L. O., Lobyrcva L. W. Acta biochim. polon., 19, 2, 109—116, 1972.
19. Palk W. K., Nochumson S., Sangduk K. Biochem. Med., 19, 1, 39—46, 1978.
20. Porembka Z. Post. Biochem., 17, 3, 451—452, 1971.
21. Rau R. V. R., Reddi R. R., Swami K. S. Int. J. Biochem., 4, 19, 62—70, 1973.
22. Reddi S. R. R., Campbell J. W. Comp. Biochem. Physiol., 28, 515—534, 1969.
23. Schimke R. T. J. Biol. Chem., 237, 6, 1921—1927, 1962.

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

Поступило 5.X 1985 г.

УДК 582.287.238:581.19

АНТИФУНГИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ШЛЯПОЧНОГО ГРИБА *NEMATOLOMA FASCICULARE* (HUDS.: FR.) KARST.

С. М. БАДАЛЯН

Изучение антифунгиальной активности штаммов *Nematoloma fasciculare* по отношению к 21 виду микромицетов выявило 2 типа взаимоотношений. Существует корреляция между географической распространенностью вида, породой субстрата, скоростью роста мицелия и формой проявления антагонизма.

Nematoloma fasciculare-ի շտամերի անտիֆունգիալ ակտիվության ուսումնասիրությանը 21 տեսակի միկրոմիցետների նկատմամբ բացահայտել ֆունգարիտիբուցների 2 տիպ: Չորսմյուսն ունի ֆունգիալ: տեսակի աշխարհագրական տարածվածության, սուբստրատի տեսակի, միցելիայի աճման արագության և անտագոնիզմի ցրեկորման ձևի միջև:

The study of antifungal activity of *Nematoloma fasciculare* strains in connection with 21 species of micromycetes has revealed 2 types of interrelation. There exists a correlation between the geographical spreading of the species, the kind of substratum, the growth rate of micelle and the form of display of antagonism.

Ключевые слова: шляпочный гриб, микромицеты, антифунгиальная активность.

В настоящее время в связи с поисками новых фармакологических препаратов интерес к базидиальным грибам как продуцентам биологически активных соединений заметно повысился [5—8].

Объект наших исследований — *Nematoloma fasciculare* — в этом аспекте изучен недостаточно, хотя единичные литературные данные свидетельствуют о высокой физиологической активности этого гриба.

В настоящей работе приводятся результаты изучения антифунгиальных свойств *N. fasciculare*.

Материал и методика. Изучение антифунгиальной активности штаммов, выделенных в культуру тканевым методом, проводили в совместной культуре с 5-ю видами микромицетов: *Aspergillus versicolor* (Vahl.) Tex., *A. niger* v. *Tiegli*, *Penicillium verrucosum* (Dier.), *Alternaria chartarum* (Fr.), *Trichoderma viride* Pers.

Стерильные чашки Петри с агаризованным сусликом одновременно инокулировали мицелием *N. fasciculare* и микромицета в 20 возможных вариантах (табл.), после чего помещали их в термостат при 20°. Наблюдения проводили в течение 50 суток начиная с первых дней совместного роста культур. Для оценки антифунгиальной (антагони-