

ИНДУЦИРОВАНИЕ АРГИНАЗЫ У ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ
CHLORELLA PYRENOIDOSA

А. П. ГРИГОРЯН, А. Х. АГАДЖАНЫ, Н. Н. ТАМБЯН, М. А. ДАВТЯН

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

У зеленых водорослей *Ch. pyrenoidosa* обнаружена слабо выраженная активность аргиназы. До 7-го дня выращивания она повышается, после чего на 10-й день совсем исчезает.

Осуществлено индуцирование аргиназы аргинином и другими соединениями. Смесь аргинина с глутаматом значительно усиливает индукцию аргиназы по сравнению с аргинином, в то время как глутамат в отдельности не вызывает индуцирующего эффекта. Биосинтез фермента подвергается катаболической репрессии глюкозой и пролином.

Ch. pyrenoidosa փոքր քանակությամբ արգինազի ակտիվությունը հայտնաբերվել է արգինազային խառնուրդում և արգինինի առկայության ժամանակ: 7-րդ օրը այն մեծանում է, որից հետո 10-րդ օրը լրիվ անհետանում է:

Կատարվել է արգինազային ինդուկցում արգինինով և այլ միացություններով: Արգինինի և գլուտամատի խառնուրդը նշանակալիորեն ուժեղացնում է արգինազային ինդուկցումը արգինինի համեմատ, միևնույն պայմանում առանձին վերջրած ինդուկցող ազդեցությունն չի ունենում: Ֆերմենտի բիոսինթեզը ենթարկվում է կատարվել սկզբնական փուլից առկա գլյուկոզի և պրոլինի:

In green seaweeds of *Ch. pyrenoidosa* slightly expressed activity of the arginase was discovered. It constantly increased up to the 7th day, and after that it disappeared on the 10th day. The induction of arginase with arginine and other combinations was held. The glutamate and arginine mixture to a great extent intensified the induction of arginase in comparison with arginine, while the glutamate separately could not cause an induction effect.

The enzyme biosynthesis was exposed to catabolic repression by glucose and proline.

Водоросли *Ch. pyrenoidosa*—аргинин—аргинин—глутамат

О наличии аргиназы у хлореллы имеются противоречивые данные. Бейкер и Томсон [8] показали, что голодающие по азоту клетки *Chlorella vulgaris* осуществляют ряд реакций этого цикла, но обнаружить аргиназу у хлореллы им не удалось. В связи с этим было сделано предположение, что хлорелла расщепляет аргинин с помощью аргининдегидриазы. В нашей же лаборатории у хлореллы была обнаружена хотя и очень слабая, но достоверная активность аргиназы [2]. По-видимому, для ее обнаружения существенные значения имеют фазы развития этой культуры.

Интересно, что хлорелла не содержит уреазы, но прекрасно усваивает мочевину. При росте на мочевины в клетках *Ch. pyrenoidosa* накапливается значительное количество аргинина и аргининянтарной кислоты [15].

Роон и Левенберг [13] показали, что у некоторых видов хлореллы происходит зависящее от АТФ расщепление мочевины. Эта точка зрения была подтверждена результатами работ других авторов [14], выделивших два фермента утилизации мочевины, первый из которых катализирует синтез аллофаната, а второй расщепляет его на CO_2 и NH_3 .

Нами исследована активность аргиназы в разные дни роста культуры *Ch. pyrenoidosa* и осуществлена субстратная индукция фермента.

Материал и методика. Объектами исследования служили одноклеточные водоросли *Ch. pyrenoidosa*-82, полученные из Института агрохимических проблем и гидропоники АН АрмССР. Хлореллу выращивали на аппарате УНВ [5]. В течение опыта поддерживалась температура в пределах 28–30°. Культура продувалась увлажненным воздухом, содержащим 2–3% CO_2 .

Для выращивания хлореллы использовали питательный раствор Тамия, содержащий (г/л): KNO_3 —5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ —2,5, KH_2PO_4 —1,25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ —0,003 и EDTA—0,037. Исходный показатель pH 5,5. Первоначальная плотность—1 млн клеток/мл.

Индукирование аргиназы. После выращивания клетки центрифугировали, промывали дистиллированной водой и переносили в свежую среду Тамия, содержащую индуктор. Инкубация в этой среде продолжалась в течение 24 ч в ростовых условиях. Затем клетки центрифугировали, 3 раза промывали дистиллированной водой. Полученную пасту использовали для индуктирования фермента. Для индуктирования аргиназы в среду выращивания водорослей вносили $3 \cdot 10^9$ клеток. Гомогенизацию проводили в 0,05 М глициновом буфере (pH 9,5). Бесклеточный экстракт получали при центрифугировании 27.000 г на центрифуге с рефрижератором. Активность аргиназы определяли по методу Ратнера [12] / мочевины—по Аринбальду [7], деаминазную активность—по методу Огнеского [11].

Гельфильтрацию белков проводили на сефадексе G-150.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены результаты изучения активности аргиназы у хлореллы в разные дни выращивания.

Таблица 1. Активность аргиназы в разные дни выращивания *Ch. pyrenoidosa* ($n=5$)

Сроки выращивания, сутки	Число клеток, млн/мл	Активность аргиназы мкМ на 1 г сырой биомассы
1	1	$0,46 \pm 0,06$
3	50	$1,6 \pm 0,06$
4	200	$2,3 \pm 0,12$
7	500	$4,56 \pm 0,14$
9	500	$1,37 \pm 0,10$
10	400	0

Заметная активность аргиназы обнаруживается у семидневной культуры водорослей, а на 10-й день она полностью исчезает.

Исследования показали также (табл. 2), что при инкубации 7-дневной культуры в присутствии L-аргинина индуцируется аргиназа, активность которой наиболее выражена на 24-м часу инкубации водорослей.

В следующей серии экспериментов исследовали аргининдеаминазный путь катаболизма аргинина у *Ch. pyrenoidosa*, т. е. возможность

Таблица 2. Влияние сроков инкубации на индукцию аргиназы *Ch. pyrenoidosa* (индуктор L-арг $5 \cdot 10^{-2}$ М)^{***} (n = 5)

Время инкубации, ч	Активность аргиназы, мкМ на 1 сырой биомассы
0	4.56±0.43
4	8.00±1.11
10	9.9
24	14.75±1.21
49	5.97±0.85

^{***} В сериях, посвященных изучению субстратной индукции аргиназы, было использована 7-дневная культура водорослей.

образования цитруллина из аргинина и далее генерации АТФ за счет катаболизма цитруллина. Катализирующие эти две последовательные реакции ферменты (аргининдеминиаза и цитруллингидролаза) не были обнаружены.

Таким образом, изученный нами вид водорослей отличается от водорослей *Ch. vulgaris*, которые, согласно данным литературы, обладают аргининдеминиазным механизмом распада аргинина [8].

Применение в качестве индуктора L-аргинина (табл. 3) показывает, что по мере увеличения его концентрации индукция аргиназы усиливается и достигает максимума при концентрации 10^{-1} М. При этом активность аргиназы возрастает примерно в 3 раза. Дальнейшее увеличение концентрации индуктора приводит к снижению активности аргиназы.

Таблица 3. Индуцирование аргиназы *Ch. pyrenoidosa* L-аргином (n = 5)

Концентрация аргинина, М	Накопление биомассы, мг	Активность аргиназы, мкМ на 1 сырой биомассы
Контроль	223	4.54±0.57
10^{-4}	473	5.57±0.31
10^{-3}	532	6.33±0.42
$3 \cdot 10^{-3}$	543	7.87±0.59
$5 \cdot 10^{-3}$	534	9.45±0.88
$6 \cdot 10^{-3}$	623	11.55±1.03
10^{-1}	632	13.49±1.16
1	512	9.8±0.56

Пролин оказывает репрессирующее влияние на аргиназу водорослей, примерно в два раза снижая как имеющуюся активность, так и активность после субстратной индукции (табл. 4)

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что изученная культура водорослей обладает механизмом индукции аргиназы аргинином и репрессии пролином. Репрессия аргиназы пролином указывает на возможность ее функционирования в системе биосинтеза пролина из аргинина. Ранее было установлено, что и у аэробных инфузо-

Таблица 4. Репрессия активности аргиназы пролином у *Ch. pyrenoidosa* (инкубация 24 ч с аргинином и пролином и без них (n=5))

Концентрация, М	Активность аргиназы, мкМ на 1 г сырой биомассы
Контроль (без арг и про)	4.54±0.57
с про $6 \cdot 10^{-2}$	2.26±0.42
с арг $6 \cdot 10^{-2}$	11.5±1.03
с арг: $6 \cdot 10^{-2}$ и про 10^{-2}	5.49±0.38

рий *Paramecium multimicronucleatum* аргиназа подвергается репрессии пролином [6].

Серия экспериментов была посвящена изучению распределения фермента между растворимой и нерастворимой фракциями клеток водорослей. С этой целью после субстратной индукции клетки гомогенизировали и подвергали центрифугированию при 27 000 g 30 мин. Активность определяли в осадке и надосадочной фракции гомогената.

Таблица 5. Распределение индуцированной аргиназы между растворимой и нерастворимой фракциями клеток водорослей *Ch. pyrenoidosa* (n=5)

Фракция	Активность аргиназы, мкМ на 1 г сырой биомассы
Целый гомогенат	11.51±1.06
Надосадок	1.68±0.33
Осадок	12.63±1.29

Полученные данные показали, что аргиназа локализована в основном в осадочной фракции (90%), тогда как в растворимой обнаруживается менее 10% общей активности аргиназы целого гомогената. Многочисленные процедуры (гомогенизация в различных солевых растворах, замораживание и оттаивание гомогената, применение бутанола, глицерина и др.) для перенесения фермента в растворимое состояние не дали положительных результатов.

Изучена также возможность индукции аргиназы некоторыми другими соединениями и ее репрессии глюкозой. Результаты суммированы в табл. 6.

Данные таблицы показывают, что индукция аргиназы протекает более интенсивно, когда в среде наряду с аргинином присутствует один из следующих компонентов: глутамат, глутамин, аспарагин и сукцинат. Индуцирование аргиназы смесью аргинин+глутамат установлено также у *Bacillus licheniformis* [10]. Авторы предполагают, что индукция аргиназы происходит пирролин-5-карбоксилатом, являющимся общим промежуточным продуктом на пути распада пролина, аргинина и орни-

тина. По их данным, орнитин индуцирует аргиназу лучше, чем аргинин.

Индуцирование аргиназы аргинином, орнитином, α , γ -дiamiнобутиратом, лизином, гомоаргинином показано также у *Saccharomyces cerevisiae* [9].

Таблица 6. Индукция и репрессия аргиназы у *Ch. pyrenoidosa* ($n=5$)

Соединения и концентрации, М	Активность аргиназы, мкМ на 1 г сырой биомассы
Контроль	4.47 $\pm$ 0.36
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	11.47 $\pm$ 1.05
D-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	0
DL-арг 3 $\cdot$ 10 $^{-2}$	8.11 $\pm$ 0.45
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$ + Глут 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	34.22 $\pm$ 1.43
Глут 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	4.30 $\pm$ 0.28
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$ + Глут 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$, глюкоза 7 $\cdot$ 10 $^{-1}$	5.63 $\pm$ 0.54
Глюкоза 7 $\cdot$ 10 $^{-1}$	3.56 $\pm$ 0.52
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$, глутамин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	42.48 $\pm$ 0.50
Глутамин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	30.00 $\pm$ 1.15
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$, аспарагин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	21.00 $\pm$ 1.27
Аспарагин 5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	13.04 $\pm$ 0.85
L-орн 10 $^{-2}$	12.11 $\pm$ 1.14
L-арг 1.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$ и сукцинат 6.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	19.80 $\pm$ 1.06
Сукцинат 6.5 $\cdot$ 10 $^{-2}$	4.52 $\pm$ 0.64
Мочевина 10 $^{-2}$	1.62 $\pm$ 0.71

Глюкоза, как следует из табл. 6, довольно сильно подавляет индукцию аргиназы, что свидетельствует о катаболической репрессии расщепления аргинина.

Что касается влияния различных аминокислот, а также мочевины на активность индуцируемой аргинином аргиназы целого гомогената, то все они, за исключением орнитина и пролина, почти также ингибируют аргиназу водорослей, как и у других организмов, изученных в этом плане. Однако орнитин и пролин проявляют стимулирующее влияние на аргиназу хлореллы. Подобное влияние этих аминокислот на аргиназу — редко встречающееся явление. Согласно многочисленным исследованиям, орнитин для аргиназы различного происхождения является классическим ингибитором. Стимулирование активности аргиназы орнитином обнаружено лишь в проростках кукурузы [4].

Что касается пролина, то он также является ингибитором аргиназы некоторых организмов [1, 2] и сведения относительно его стимулирующего действия на этот фермент отсутствуют.

Фракционирование гельфильтрацией на сефадексе G-150 бесклеточного экстракта хлореллы для изучения изоэнзимного спектра индуцированной аргиназы выявило два пика активности в 8.9-й и в 18-й фракциях. Константа Михаэлиса (K_m) высокомолекулярного изоэнзима составляет 6,75 мМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. Х. Биолог. ж. Армения, 34, 845, 1985.
2. Аракелян Г. В., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 27, 94, 1974.
3. Арутюнян Л. М., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 36, 43, 1983.
4. Варданян Дж. А., Давтян М. А. Биолог. ж. Армения, 37, 1, 1984.
5. Владимирови М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных микроорганизмов. М., 1962.
6. Заробян Т. Я. Канд. дисс., Ереван, 1977.
7. Archibald R. M. J. Biol. chem., 156, 121, 1945.
8. Baker J. E., Thomson J. F. Plant Physiol., 37, 618, 1962.
9. Dubois E. Revue des fermentations et des industries alimentaires, 30, 6, 1975.
10. Zalshtey E. J., Berlohr R. W. J. Bacteriol., 95, 322, 1968.
11. Oginsky R. J., Gerrig R. F. J. Biol. Chem., 198, 791, 192.
12. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1183, 1949.
13. Roan R. J., Levenberg B. J. Biol. Chem., 243, 5213, 1968.
14. Thomson J. F., Muenster A. M. E. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 43, 1049, 1971.
15. Walker J. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 561, 1952.

Поступило 23.VII 1987 г.

Биолог. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 547.963.3

ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ НА ВЯЗКОУПРУГИЕ СВОЙСТВА И ГИДРАТАЦИЮ ПЛЕНОК ДНК

Э. Э. ХУДАВЕРДЯН, С. Г. ГЕВОРКЯН

Ереванский государственный университет,
Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Показано, что модуль Юнга денатурированных пленок ДНК селезенки крупного рогатого скота больше, чем у нативных. Все особенности изменения модуля Юнга и логарифмического декремента затухания нативных пленок ДНК, которые наблюдаются при изменении гидратации, у денатурированных исчезают. Изотермы гидратации пленок нативного и денатурированного ДНК различаются и зависят от способа денатурации.

Ցույց է տրվել, որ խոշոր կզերազոր կենդանիների փայծաղի ղկնատուրացված ԴՆԲ-ի թաղանթների Յունգի մոդուլը ավելի մեծ է, քան նատիվ ԴՆԲ-ի թաղանթների: Նատիվ ԴՆԲ-ի թաղանթների Յունգի մոդուլը և մարման լոգարիթմական ղկրեմենտի փոփոխության բոլոր առանձնահատկությունները, որոնք եկառուվում են հիդրատացիայի փոփոխության ժամանակ՝ ղկնատուրացված թաղանթների համար անհետանում են: Նատիվ և ղկնատուրացված ԴՆԲ-ի թաղանթների հիդրատացիայի իզոթերմները տարբերվում են իրարից և կախված են ղկնատուրացման ձևից:

It has been shown that Young's modulus of denaturated membranes of the spleen of big horned cattle is greater than of native ones. All the properties of dependence of Young's modulus and logarithmic decrement of shading of native membranes during hydration disappear for denaturated membranes. The isotherms of hydration of native and denaturated films are different and depend on the means of denaturation.