

3. Гринштейн Д., Яковец М. Химия аминокислот и пептидов. Пер с англ. 425. М., 1965.
4. Куркин А. П., Порохова В. Г. Аминокислоты. М., 1970.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 2. М., 298.
6. Палецкая Е. Н. Методы экспериментальной химиотерапии 109, 143. М., 1971.
7. Dimmock J. R., Nyathi C. B., Smith P. J. J. *Phytm. Sci.*, 47, 15'3, 1978.
8. Schönenberger H., Bastug H. *Arzneim.-Forsch.*, 21, 68, 1971.

Поступило 7.VII 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 5, 1988

УДК 577.15:591.8

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

С. П. ОГАНЕСЯН, А. Г. БАБАНИ

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Выделена и очищена оксидаза D-аминокислот из клеточных грибов *Aspergillus niger* R-3. В очищенном препарате обнаружены два белка, обладающие D-аминокислотной оксидазной активностью. Изоферменты очищены в 65 и 60 раз, выход составляет 38 и 30% соответственно. Изучены некоторые физико-химические свойства.

Մեկուսով գրա սնկերով *Aspergillus niger* R-3 սերքից կուտրակարգ անշատվել է մաքրվել է D-ամինոֆորմիլն օքսիդազը: Մաքրված պրեկարատում հայտնաբերվել է D-ամինոֆորմիլն օքսիդազային ակտիվությամբ ստեղծած երկու սպիտակուցներ: Ուսումնասիրվել է դրանց որոշ ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները: Երկու իզոֆերմենտները մաքրվել է 65 և 60 անգամ, էլիք անոստարտ աստիճանաբար կազմել է 38 և 30 տոկոս:

D-amino acid oxidase has been isolated and purified from the cell-free extracts of *Aspergillus niger* R-3, grown on the mold-ses. The existence of two proteins with D-amino acid oxidase activity has been identified in the purified preparation. Some of their physico-chemical properties have been investigated. The degrees of purification of the isoenzymes are 65 and 60, the yield 38 and 30 per cent, respectively.

Известные грибы *Aspergillus niger*—оксидаза D-аминокислот.

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3.)—фермент, катализирующий окислительное дезаминирование аминокислот с образованием соответствующей α-кетокислоты и аммиака. Имеет широкое биологическое распространение, обнаружен как в прокариотических, так и эукариотических органах. Однако физиологическая роль и значение D-аминокислотных оксидаз окончательно не выяснены.

Исследование D-аминокислотных оксидаз представляется актуальным как в связи с решением вопроса о физиологической их роли, так и в прикладном отношении, поскольку его можно применять для разрушения D-аминокислот в рацемических смесях с целью получения оптически чистых природных аминокислот.

Цель настоящего исследования заключалась в очистке и исследовании некоторых физико-химических свойств оксидазы D-аминокислот

из плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3, используемых в производстве лимонной кислоты.

Известна методика получения очищенного препарата оксидазы D-аминокислот из дикого штамма [7]. В нашей лаборатории разработан более простой способ получения частично очищенного препарата фермента из штамма *Aspergillus niger* R-1 [3]. Данная работа представляет собой усовершенствование указанных способов получения очищенного препарата оксидазы D-аминокислот.

Материал и методика. Объектом исследований служили плесневые грибы *Aspergillus niger* R-3, полученные из Спитякского завода по производству лимонной кислоты. Культуру выращивали на отходах сахарного производства—мелассе.

Питательную смесь готовили следующим образом: 40 г мелассы растворяли в 40 г кипяченой охлажденной водопроводной воды, pH среды доводили до 7—10%-ным раствором Na_2CO_3 , затем добавляли 2 мл 10%-ного раствора желтой кровяной соли и смесь кипятили в течение получаса для осаждения тяжелых металлов.

Объем доводили до 1 л кипяченой водой, добавляли 10 мл 1%-ного раствора K_2HPO_4 и 1 мл 1%-ного раствора ZnSO_4 . Посев производили при температуре 42°, инкубацию—в термостате в течение четырех суток при температуре 32°. Полученную поверхностную культуру гомогенизировали в 0,05 М K/Na фосфатном буфере в течение 10 мин в стеклянном гомогенизаторе типа Эльвержем-Пюттера. Полученный гомогенат центрифугировали при 11.000 об/мин в течение 30 мин.

Для определения оксидазной активности пробу инкубировали при 37° в течение 60 мин в 0,05 М K/Na фосфатном буфере (pH 8,3) в присутствии 10 мкМ аминокислоты. Реакцию останавливали 20%-ным ТХУ, после чего в экстракте определяли выделившийся аммиак микродиффузионным методом Зеландсона и модификации Силаковой [11]. Белок определяли по методу Лоури [9] и спектрофотометрически на СФ-16 (при 280 нм). Активность фермента выражали в мкМ аммиака, выделившегося при часовой инкубации на 1 г мицелия. Удельную активность выражали в мкМ NH_3 на 1 г белка.

Результаты и обсуждение. В целях получения активного препарата оксидазы D-аминокислот предварительно изучали динамику образования фермента у производственного штамма *Aspergillus niger*, цикл развития которого длится семь суток. Данные табл. 1 показывают, что активность оксидазы в клетках плесневых грибов проявляется на второй день инкубации и достигает максимального уровня на четвертый день. Ранее используемый нами штамм *Aspergillus niger* R-1 проявлял максимальную активность на третьи сутки роста [2].

Таблица 1. Активность оксидазы D-аминокислот в динамике роста плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3

Дни инкубации	Количество биомассы	Активность, мкМ NH_3 на 1 г мицелия	Дни инкубации	Количество биомассы	Активность, мкМ NH_3 на 1 г мицелия
1	0,5	0	5	9,0	15
2	2,8	5	6	8,0	12,5
3	6,0	12,5	7	7,0	10
4	9,0	21,5			

Исследования показали также, что в клетках исследуемого штамма фермент имеет цитоплазматическую локализацию. Это согласуется с литературными данными, касающимися *Aspergillus niger* [2, 7]. В от-

лично от них, у дрожжей фермент локализуется в митохондриях [1]. Дальнейшие исследования мы проводили на клеточном экстракте четырехсуточной культуры. В следующей серии экспериментов была осуществлена очистка фермента (табл. 2).

Таблица 2. Этапы очистки оксидазы D-аминокислот из *Aspergillus niger* R-3

Этапы очистки	Объем, мл	Белок, мг	Активность фермента, мЕМ	Удельная активность	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	25	351	90	0.2	1	100
Экстракт	21	200	86	0.5		
Фракционирование $(NH_4)_2SO_4$, с последующей гельфильтрацией на сефадексе G-200	20	9	63	7	35	70
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ—сефадексе А--25						
Изофермент I	12	2.6	34	13	65	38
Изофермент III	12	2.4	27	12	60	30

На первом этапе бесклеточный экстракт подвергали обессоливанию сульфатом аммония. Активность фермента обнаруживалась во фракции белков, осаждаемых при 40—80%-ном насыщении сульфатом аммония, режим центрифугирования—11.000 об/мин в течение 30 мин. Осадок сульфатно-аммонийного препарата белков растворяли в 0.05 M K₂Na фосфатном буфере (pH 8,3) и подвергали гельфильтрации на колонке с сефадексом G-200 (65X80 см), уравновешенной тем же буфером. Профиль элюции с сефадекса G-200 представлен на рис. 1. Активность оксидазы проявляется во фракциях 9—15. В результате ферментный препарат очищается в 35 раз. Выход составляет 70%.

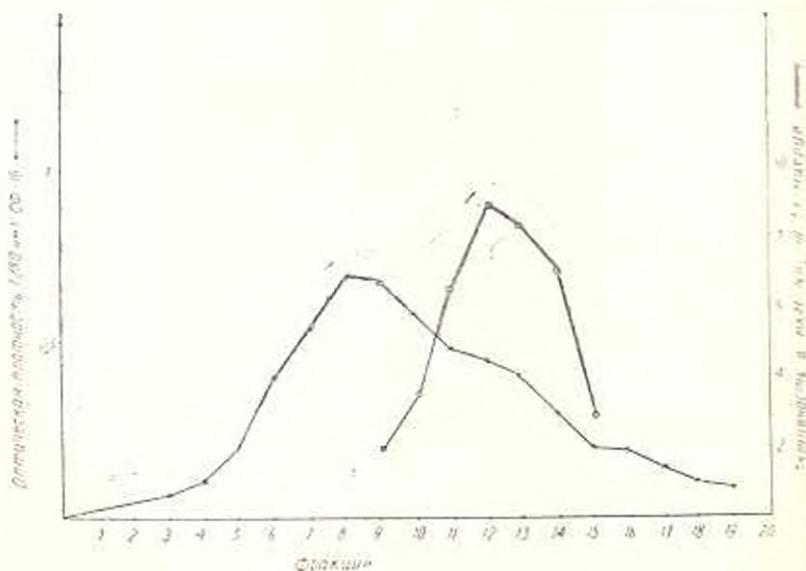


Рис. 1. Активность D-аминокислотной оксидазы после гельфильтрации на сефадексе G-200.

Полученные активные фракции подвергали дальнейшей очистке с помощью метода ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-25 (3X20 см), уравновешенной 0,05 М К⁺Na фосфатным буфером, рН 8,3. Объем фракции 4 мл, скорость элюции 1 мл в 1 мин. Белки, не связавшиеся с ионообменником, вымывались тем же буфером. Элюцию оставшихся на колонке белков проводили с помощью возрастающей концентрации NaCl—0,05, 0,1, 0,15, 0,2 М. Профиль элюции с сефадекса А-25 представлен на рис. 2.

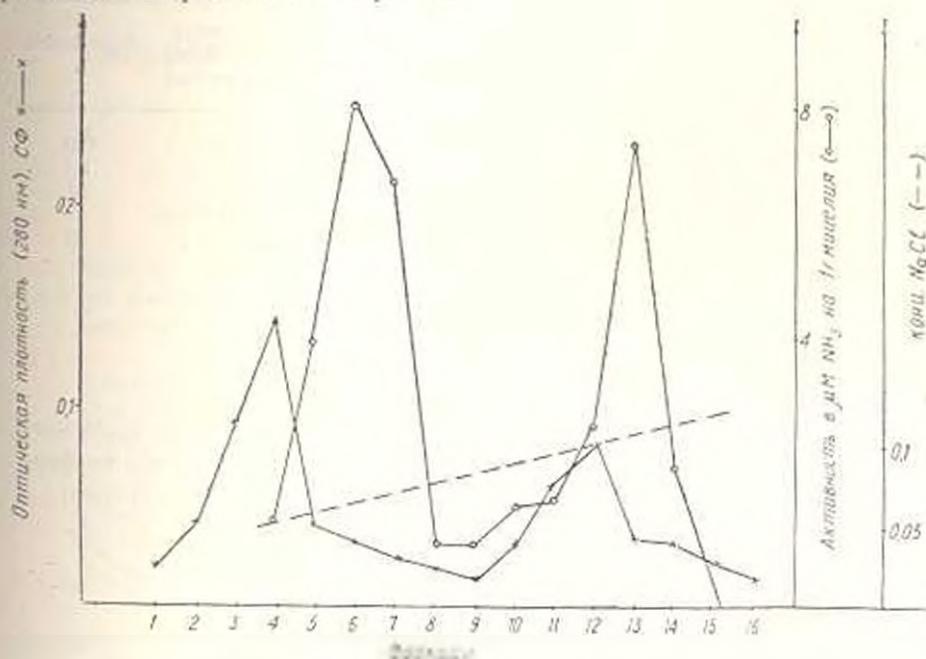


Рис. 2. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-25.

В результате ионообменной хроматографии были получены две белковые фракции, обладающие D-аминокислотной оксидазной активностью. Первая элюируется 0,05 М К⁺Na фосфатным буфером, а вторая — 0,1 М NaCl. Очевидно, получены два изофермента оксидазы D-аминокислот почти с одинаковой удельной активностью (12 и 13) и степенью очистки (30 и 32). Выход при этом составлял 38 и 30% соответственно. Таким образом, разработанная методика позволяет получать высокоактивные препараты изоэнзимов оксидазы D-аминокислот из производственного штамма *Aspergillus niger* R-3 с высоким выходом. Следует отметить, что в литературе известно наличие изоэнзимов оксидазы D-аминокислот лишь у *Triganopsis variabilis* [1]. Дальнейшие исследования были посвящены изучению некоторых свойств обнаруженных изоферментов.

В табл. 3 представлены данные по субстратной специфичности изоэнзимов I и II, согласно которым как по субстратной специфичности, так и по интенсивности дезаминирования изученные белки близки. В обоих случаях дезаминируются шесть из десяти использованных D-аминокислот, причем с одинаковой интенсивностью. Исключение составляет лишь D-аланин, который дезаминируется в 2,5 раза интенсивнее изо-

ферментом II, по сравнению с первым. Изоферменты не проявляли активности по отношению к L-аминокислотам. Изучение влияния различных концентраций субстрата (D-метионина) на интенсивность дезаминирования показало, что насыщение фермента субстратом происходит при концентрации 5 мкМ.

Таблица 3. Дезаминирование аминокислот очищенными препаратами изоэнзимов (I и II) оксидазы D-аминокислот из *Aspergillus niger* R-3

Субстрат 151±10 мкМ	Изоэнзим I		Изоэнзим II	
	Активность, мкМ NH ₃ на 1 г мицелия	Активность, %	Активность, мкМ NH ₃ на 1 г мицелия	Активность, %
D-метионин	6.2	100	5.6	100
D-α-аминомасляная кислота	5.2	84	4.8	85
D-аланин	1.6	26	3.9	67
D-валин	2.7	41	2.5	45
D-н-валин	2.9	47	2.8	50
D-глицофан	0	—	0	—
D-пролин	0	—	0	—
D-серин	0	—	0	—
D-лязин	0	—	0	—
D-аргинин	0	—	0	—
L-валин	0	—	0	—

Значение K_m определяли по методу Лайнувер-Бэрка с использованием пяти концентраций субстрата (рис. 3). Установлено, что изоферменты близки по сродству к субстрату (0.75 и 1 мкМ соответственно).

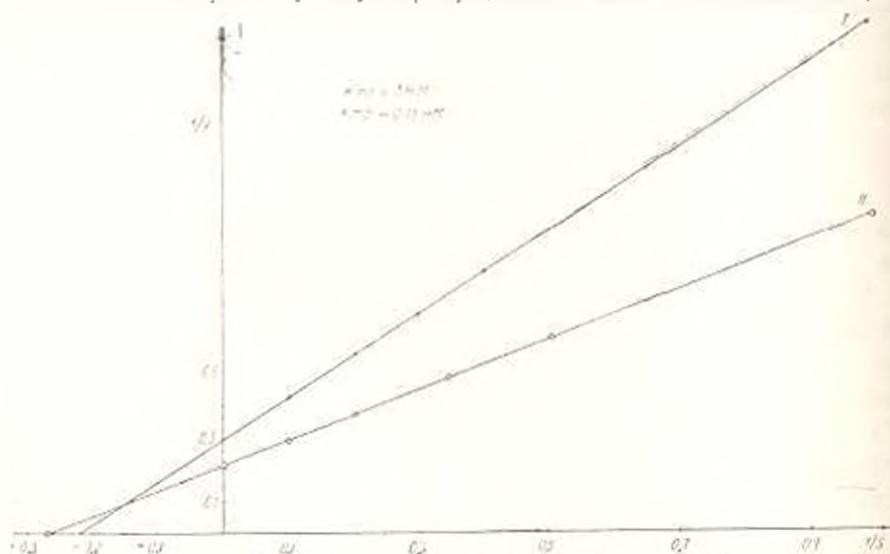


Рис. 3. Определение значения K_m для D-метионина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багдасарян Е. Г., Даян М. А. Авторск. свид. № 780333.
2. Даян М. А., Оганесян С. П. Биолог. ж. Армении, 36, 11, 1983.
3. Оганесян С. П., Даян М. А. Биолог. ж. Армении, 37, 5, 1984.
4. Силахова А. И., Труш Г. П. Вопросы мед. химии, 8, 538—545, 1962.
5. Berg Clarence P., Roden Franz. Anal. Biochem., 71, 213—222, 1975.
6. Cirtly Bruno, Ronchi Severino. Biochem. et biophys. acta, 327, 2, 1973.

