

- микробиометода. Новосибирск, 1981.
8. Кузнецова Н.И., Смирнова Т.А., Шамшина Т.Н., Ганушкина Л.А., Азизбеян Р.Р. Биотехнология, 3-4, 11-14, 1995.
  9. Меликсетян В.Ш., Кулькова Т.А., Чилингарян К.О., Африкян Э.Г., Алексеев А.П., Карпов Э.Г., Игнатьев В.И. АС СССР №1398120, 1987
  10. Швецова О.И., Зурабова Э.Р. ОНТИ Микробиопром, М., 1972.
  11. Barjac H., de Bonnefoi A.A. Entomophaga, 7, 1, 1962.
  12. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.W. The Genus *Bacillus*. USDA, Washington, 283, 1973.
  13. Lopez-Meza J.E., Federici B.N., Johnson J.J., Ibarra J.E. FEMS Microbiol. Lett., 134, 2-3, 195-201, 1995.
  14. Sylvester C.J., Costilow R.N. J. Bacteriol., 87, 114-119, 1964.
  15. Waalwijk C. Opportun. Mol. Biol. Crop. Prod.: Proc. Int. Symp., Cambridge, 47-58, 1993.
  16. Wu Jixing, Chen Zaier, Xie Tianjian, Zhong Zian-Sheng Weishengwuxue tongbao= Микробиология, 22, 4, 195-197, 1995.
  17. Zou Hua, Mi Tiejuan, Zhang Zhongze, Su Fengyan, Hao Dongmei, Wang Yuying, Ding Jine Weishengwuxue tongbao=Microbiology, 34, 4, 310-315, 1994.

Поступила 10.XI.1997

Биолог. журн. Армении, 3 (51), 1998

577.15.591.8

## ИССЛЕДОВАНИЕ L-АМИНОКИСЛОТНОЙ ОКСИДАЗЫ У *ASPERGILLUS NIGER* R-3

С.П. ОГАНЕСЯН, А.Р. ПАПОЯН, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Проводилось исследование субклеточных фракции (пероксисом) мультиспорового гриба *Aspergillus niger* R-3, полученных посредством изотопической сепарации в градиенте 0,5M раствора сахарозы и 15% перколла. Показано, что для проявления активности оксидазы L-аминокислот наиболее оптимальным являются 0.5% D-глюкоза и 1/4 нормы источника азота - L-аланина в питательной среде.

Աստղծասիրվել են *Aspergillus niger* R-3 միջելիալ սնկի ենթարքջային ֆրակցիաները պերօքսիսոմները, ստացված 0,5մ սախարոզի և 15% պերկոլի գրուդիենտում իզոպիկնիկ բաժանման միջոցով: Հաստատվել է, որ L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության դրսևորման համար առավել բարենպաստ են 0,5% D-գլյուկոզի և ազոտի օպտիմալ աղբյուրի L-ալանինի, 1/4 կոնցենտրացիայի պարունակությունը սննդամիջավայրում:

The subcellular fractions (peroxisomes) of *Aspergillus niger* R-3 have been studied by isopicnic separation in gradient of 0.5M sucrose and 15% Percoll. The presence of 0.5% D-glucose and 1/4 concentration of L-alanine as source of nitrogen in growth medium is the optimal condition for synthesis of L-aminoacid oxidase activity.

*Aspergillus niger* - L-аминокислотная оксидаза - пероксисомы

Образование и утилизация аммиака все еще остается предметом изучения как с точки зрения эволюционного становления осуществляющих их систем, так и понимания механизмов сопряжения с энергопотребляющими и производящими процессами.

Очевидно, оксидазы L-аминокислот играют существенную роль в образовании аммиака из аминокислот лишь у тех организмов, которые обладают высокоактивными ферментами окисления L-аминокислот [2,3,14,15]. Полагают, что в тканях животных они не могут играть существенной роли, а присутствующая у животных высокоактивная оксидаза D-аминокислот является пока необъяснимым фактом [4,5,13,15].

В литературе существует мнение о четкой структурированности "растворимых" ферментов шитозоля за счет связи с компонентами мембран и других надмолекулярных образований клетки [1,7]. Растворимые оксидазы D-аминокислот [4] широко исследованы в качестве маркерного фермента пероксисом, тогда как оксидазы L-аминокислот практически не изучены.

Наша задача заключалась в получении пероксисомальных фракций из мицелиального гриба *Aspergillus niger* R-3, обладающего выраженной активностью оксидазы D-аминокислот [9], и выяснении наличия в них активности L-аминокислотной оксидазы.

**Материал и методика.** Объектом исследований служил плесневой гриб *Asp. niger* R-3 - продуцент лимонной кислоты. Культуру выращивали на отходе сахарного производства - мелассе и на синтетической среде Раффена [6]. В качестве источника азота использовали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3,5г) или L-аланин (4,1г) в 1000 мл культуральной среды. Посев производили в среде объемом 100 мл при 42°, выращивание - при 35-37°.

10%-ный гомогенат 4-дневной культуры, полученный посредством гомогенизации в дистиллированной воде в течение 1,5 мин в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльвуджейма, центрифугировали при 600-700g при 10° в течение 10 мин для удаления ядерной фракции. Для получения гранулярной фракции 1 мл надосадочной жидкости подвергали изополихлоридной сепарации в градиенте 0,5M раствора сахарозы, содержащего 1 мл перколла (Fine chemical AB) 11,29 г/л. Полученную таким образом смесь объемом 2 мл центрифугировали при 12000-14000g в течение 10 мин при 10°, после чего микромануальной посредством медницеского шприца разделяли на 4 фракции, каждая объемом 0,5 мл. I фракция содержала большие митохондрии, II - малые митохондрии, III - пероксисомы, IV - пероксисомы и цитозоль. В трех фракциях (II, III, IV) была обнаружена активность пероксисомального маркерного фермента - оксидазы D-аминокислот [9,16]. Для определения активности оксидазы D- и L-аминокислот пробу инкубировали при 40° в течение 90 мин в 0,05M K/Na-фосфатном буфере, pH 8,3, в присутствии 10 мкМ D- или L аланина, при постоянном встряхивании (100 раз в мин). Реакцию останавливали 10% ТХУ, после чего в надосадочной жидкости и в соответствующих фракциях определяли выделившийся аммиак микродиффузионным методом Зеллинсона в модификации Силаковой [12]. Активность фермента выражали в мкМ аммиака на 1г мицелия. Белок определяли по методу Лоури [21].

**Результаты и обсуждение.** В опубликованной ранее работе [9] в субклеточных фракциях (II, III, IV), соответствующих различным субклеточным структурам *Asp. niger* R-3, нами были обнаружены активности оксидазы D-аминокислот, выраженные в разной степени. В новой серии экспериментов мы в тех же фракциях одновременно определяли как D-, так и L-аминокислотные оксидазы при росте гриба на мелассе, содержащей 15% глюкозы. В качестве субстрата использовали L-аланин. Во II, III и IV

субклеточных фракциях *Asp. niger* R-3, полученных посредством изопикнической сепарации в градиенте 0,5М раствора сахарозы и 15% перколла (табл. 1) обнаружена активность оксидазы L-аминокислот (активность составляла 18, 26 и 56% соответственно), в то время как активность фермента в экстракте не обнаруживается. Экстракт и фракции обладают высокой активностью в отношении D-метионина и сравнительно низкой - L-аланина.

Таблица 1. Активность D- и L-аминокислотной оксидазы *Asp. niger* R-3 при росте на мелассе

Субстраты	Белок, мг/мл	мкМ NH <sub>2</sub> /мл	мкМ NH <sub>2</sub> /г мицелия	Удельная активность, мкМ NH <sub>2</sub> /мг белка
Экстракт	3,80			
D-мет		4,70	47,0	1,23
D-ала		2,50	25,0	0,65
L-ала		0	0	0
II фракция	1,0			
D-мет		0,80	8,0	0,80
D-ала		0,56	5,60	0,56
L-ала		0,28	2,8	0,28
III фракция	1,20			
D-мет		1,70	17,0	1,42
D-ала		1,14	11,4	0,95
L-ала		0,40	4,0	0,33
IV фракция	0,98			
D-мет		1,90	19,0	1,90
D-ала		0,37	3,70	0,38
L-ала		0,84	8,40	0,86

В ранних исследованиях [10,11] выявлено, что уменьшение концентрации глюкозы (2%, 0,5%) в среде роста способствует образованию оксидазы D-аминокислот в экстракте *Asp. niger* R-3, как в случае использования мелассы, так и синтетической среды, хотя выход биомассы при этом уменьшается. С целью подбора оптимальных условий для выявления активности оксидазы L-аланина *Asp. niger* R-3 в среде роста при постоянной концентрации оптимального количества азота варьировали концентрацию D-глюкозы. При выращивании на среде с L-аланином в качестве источника азота и с 0,5% D-глюкозы (табл.2) активность изучаемого фермента выявляется во II фракции, а при выращивании на среде с L-аланином и 0,2% D-глюкозы активность выявляется в IV фракции. Что касается D-метионин оксидазы, то ее активность проявляется в III и IV фракциях, при росте в среде с 0,5% D-глюкозы. В исходном экстракте не выявляется активность оксидазы L-аминокислот и при уменьшении концентрации D-глюкозы. Очевидно, высокий уровень аммиака в исходном экстракте препятствует выявлению активности L-аланин оксидазы, но не является препятствием для выявления активности высокоактивного фермента D-метионин оксидазы.

В результате изопикнической сепарации экстракта *Asp. niger* R-3 в градиенте 0,5М сахарозы и 15% перколла сохраняется микроокружение и

целостность мембран субклеточных единиц в исследуемых фракциях, обеспечивающие экскреции в среде, чем создаются условия для проявления активности L-аланин оксидазы.

Таблица 2. Активность D- и L-аминокислотных оксидаз *Asp. niger* R-3 в зависимости от наличия в среде роста количества D-глюкозы

Субстраты	Белок, мг/мл	мкМ NH <sub>4</sub> /мл	мкМ NH <sub>4</sub> /г мицелия	Удельная активность, мкМ NH <sub>4</sub> /мг белка
Выращивание на среде, содержащей 0,5% D-глюкозы и L-аланина в качестве источника азота				
Экстракт L-ала	2,86	0	0	0
II фракция D-мет L-ала	0,65	0 0,42	0 3,6	0 0,64
III фракция D-мет L-ала	0,85	0,41 0	3,5 0	0,5 0
IV фракция D-мет L-ала	0,91	0,64 0	5,4 0	0,7 0
Выращивание на среде, содержащей 0,2% D-глюкозы и L-аланина в качестве источника азота				
Экстракт L-ала	1,82	0	0	0
II фракция L-ала	0,27	0	0	0
III фракция L-ала	0,33	0	0	0
IV фракция L-ала	0,39	0,7	6,7	1,79

В наших предыдущих исследованиях [11] для биосинтеза оксидазы аминокислот *Asp. niger* R-3 оптимальной явилось выращивание в среде, содержащей L-аланин в количестве, соответствующем 1/4 части полной нормы азота питательной среды и 2% D-глюкозы. С целью подбора оптимальных условий для выявления активности оксидазы L-аланина в среде роста использовали 0,5%, 1%, 2% D-глюкозы и 1/4 часть оптимальной нормы азота в виде L-аланина (табл.3). Полученные данные свидетельствуют, что для выявления L-аминокислотной оксидазной активности наиболее оптимальными являются условия роста в среде с 0,5% D-глюкозы и 1/4 часть нормы азота в виде L-аланина. При этом при фракционировании экстракта во II фракции обнаруживается 23% активности, а в III и IV фракциях - 40% и 36% соответственно. Привлекает внимание тот факт, что во II фракции активность L-аминокислотной оксидазы превышает активность D-метионин оксидазы, где наряду с пероксисомами содержатся и мелкие митохондрии. В случае с 1% и 2% D-глюкозы L-аминокислотная оксидазная активность в исследуемых фракциях не выявлена. На основании вышеуказанного можно отметить, что

выявление активности оксидазы L-аминокислот зависит от условий культивирования гриба *Asp. niger* R-3, от концентрации углерода, а также от качественного и количественного состава азота среды роста.

Таблица 3. Активность D- и L-аминокислотных оксидаз *Asp. niger* R-3 при росте на синтетической среде, содержащей различные количества D-глюкозы и 1/4 часть нормы азота в виде L-аланина

Субстраты	Белок, мг/мл	мкМ NH <sub>4</sub> /мл	мкМ NH <sub>4</sub> /г мицелия	Удельная активность, мкМ NH <sub>4</sub> /мг белка
Выращивание на среде, содержащей 2% D-глюкозы и 1/4 L-аланина в качестве источника азота				
II фракция D-мет L-ала	0,27	0,50 0	5,0 0	1,85 0
III фракция D-мет L-ала	0,44	0 0	0 0	0 0
IV фракция D-мет L-ала	0,39	1,40 0	13,8 0	3,9 0
Выращивание на среде, содержащей 1% D-глюкозы и 1/4 L-аланина в качестве источника азота				
II фракция D-мет L-ала	0,25	0,80 0	7,8 0	3,2 0
III фракция D-мет L-ала	0,39	0,90 0	9,2 0	2,3 0
IV фракция D-мет L-ала	0,45	1,20 0	12,5 0	2,89 0
Выращивание на среде, содержащей 0,5% D-глюкозы и 1/4 L-аланина в качестве источника азота				
II фракция D-мет L-ала	0,81	0,32 0,40	4,0 5,0	0,4 0,5
III фракция D-мет L-ала	0,78	0,98 0,90	9,5 8,7	1,25 1,15
IV фракция D-мет L-ала	1,0	1,10 0,78	9,6 7,8	1,1 0,78

Примечательным является то, что при выращивании грибов при различных соотношениях содержания в среде роста D-глюкозы и L-аланина активности оксидаз D- и L-аминокислот проявляются в различной степени в субклеточных фракциях экстракта, содержащих пероксисомы различных размеров.

Очевидно, при изменении в средах роста содержания D-глюкозы и L-аланина меняется и соотношение различных популяций пероксисом,

обладających разной активностью оксидаз D- и L-аминокислот. В связи с этим привлекает внимание утверждение ряда авторов относительно изменения соотношения популяций пероксином в зависимости от изменений метаболизма клеток [4,5,7,8].

### ԼԻՏԵՐԱՏՄՐԱ

1. Антоненков В.Д., Герасимов А.М. Цитология, 20, 6, 676-681, 1978.
2. Браунштейн А.В., Азарх Р.М. Биохимия, 9, 260-270, 1944.
3. Браунштейн А.В., Бычков С.М. Биохимия, 5, 337-359, 1940.
4. Грубан З., Рехциг М. Микротельца и родственные им структуры. М., 1972.
5. Давтян М.А., Багдасарян Е.Г. АС СССР №780533, 1980.
6. Журавский Г.И., Новоселова Л.В. и др. Производство пищевых кислот. 213, М., 1953.
7. Луста К.А., Троценко Ю.А. Биохимия, 61, 2, 236-249, 1996.
8. Мейсель М.Н., Козлова Т.М. Микробиология, 46, 1977.
9. Оганесян С.П., Давтян М.А., Хандога Я. Биохимия, 35, 2221-2225, 1990.
10. Оганесян С.П., Бабаян А.Г. Ученые записки, 3 (174), 110-113, 1990.
11. Оганесян С.П., Бабаян А.Г. Биол. журн. Армении, 43, 6, 508-512, 1990.
12. Силакова А.И., ТРУШ Т.П. Вопросы мед. химии, 8, 538-545, 1962.
13. Kishone G., Vaidyanathan G.S. Indian J. Biochem. Biophys., 13, 216-223, 1976.
14. Lowry O.H. et al. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
15. Maister A. Biochemistry of Aminoacids. 711, AP New-York, 1965.

Ինտրոդուկցիա 8.IV.1998

Биол. журн. Армении, 3 (51), 1998

УДК 579.64.631.46

## ERWINIA ԵՎ FLAVOBACTERIUM ՑԵՂԵՐԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼԵՐԸ ՈՐՊԵՍ ԴԻԱԶՈՏՐՈՖՆԵՐԻ ՊԱՇՏՊԱԼՆԵՐ

Վ. Գ. ՆԻԿՈՑՅԱՆ

ՀՀ ԳԱՍ Սիկրորբիոլոգիայի ինստիտուտ, 378510, ք. Արմավյան

Հացագրիների արմատային համակարգից մեկուսացվել են ազոտֆիքսող մարմուկները : արդ կազմ ունեցող երկու համակեցություններ : Յուրյ է տրված, որ դիազոտորոֆները համակեցության պայմաններում չեն ենթարկվում շրջապատի կոնկուրենտների անտազոնիստական ազդեցությանը : Ազոտֆիքսատորների հետ համատեղ զարգացող *Erwinia* և *Flavobacterium* ցեղերի բակտերիաները ակտիվորեն ճնշում են դիազոտորոֆների նկատմամբ անտազոնիստ սպորալոր բակտերիաների զարգացումը : Պարզվել է նաև, որ դիազոտորոֆների այդ պայտպանները ճնշիչ ներգործություն չեն ցուցաբերում ազոտֆիքսող բացիլների հանդեպ :