

Биолог. журн. Армении, 1-2 (56), 2004

УДК 577.15:591.8

ПЕРОКСИСОМАЛЬНЫЕ ТРАНСАМИНАЗЫ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

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

Ереванский государственный университет, 375049

For the first time in subcellular units of *Aspergillus niger* R-3, isolated by isopycnic centrifugation in gradient of 0.5M sucrose and 15% percoll, were found out L-alanine-glyoxylate, L-methionine-glyoxylate, L-serine-glyoxylate, L-valine-glyoxylate, L-leucine-glyoxylate, L-serine-piruvate and L-methionine-piruvate transaminases. The peroxisomal fractions separated from *A.niger* R-3 differed by a set of transaminases, mentioned above, and by their activities.

Трансаминазы - перколл

Известно, что важнейшие ферменты аминокислотного метаболизма локализованы как в митохондриях, так и в растворимой фракции цитозоля эукариотических клеток. Однако в большинстве случаев ферменты цитозоля связаны с мембранными структурами и другими надмолекулярными образованиями клетки [8-10]. В частности, в пероксисомах цитозоля различных объектов животного и растительного происхождения обнаружены ферменты, принимающие участие в разнообразных метаболических процессах, связанных с окислением различных субстратов, с пуриновым обменом, предотвращением токсического действия перекиси водорода, а также участвующие в глюконеогенезе, липолизисе и фотодыхании [2]. Пероксисомы – микротельца, обнаруженные в печени и почках млекопитающих, гепатоцитах, в зеленых листьях и жирозапасающих тканях растений, в дрожжах. Они содержат оксидазу мочево́й кислоты, аминотрансферазы, лактат дегидрогеназы, α -глицерофосфатдегидрогеназу, оксидазу D-аминокислот и каталазу [1, 4, 8, 9].

Задачей настоящей работы явилось исследование процесса трансаминирования в субклеточных единицах *Aspergillus niger* R-3, а именно в пероксисомах.

Материал и методика. Объектом исследования служил плесневой гриб-продуцент лимонной кислоты *A. niger* R-3 отечественного производства [3]. Культуру выращивали на отходе сахарного производства – мелассе. Выращивание гриба и получение субклеточных единиц проводили по ранее описанной методике [5]. Из исходного экстракта нами были получены четыре фракции (I, II, III, IV). I фракция содержит в основном большие митохондрии, II – мелкие митохондрии и микротельца, III – пероксисомы и лизосомы, IV – легкие пероксисомы и рибосомы в цитозоле [5].

Активность фермента определяли инкубированием ферментных препаратов в

ультратермостате при 37° в пирофосфатном буфере, pH 8.3-8.5, содержащем 0.2М L-аминокислоты, 0.05М глиоксилата или пирувата и 0.4мМ перидоксила. Общий объем инкубационной смеси – 0.5мл. Реакцию останавливали 25%-ным ТХУ. Активность трансаминаз определяли по методу Бергмуера и Бернта [7], основанному на определении количества оксалоацетата или пирувата (мкМ) в исследуемом образце с использованием фенилгидразина. Активность пероксисомального фермента – оксидазы D-аминокислот определяли по методу Боудуина [6] и выражали в мкМ образовавшихся кетокислот в 1мл экстракта. Белок определяли по методу Лоури [11].

Результаты и обсуждения. На первом этапе мы исследовали активность трансаминаз и оксидаз D-аминокислот в субклеточных фракциях мицелиального гриба *A. niger* R-3, выделенных посредством ультрацентрифугирования. Данные табл. 1 свидетельствуют о наличии L-Ала-глиоксилат, L-Мет-глиоксилат, L-Сер-глиоксилат трансаминаз в надосадках гомогената *A. niger* R-3, где локализованы пероксисомы. Активность L-Ала-глиоксилат, L- Мет-глиоксилат, L-Сер-глиоксилат трансаминаз при 3300g составляли 20%, 25% и 10% соответственно от исходной активности. Активность вышеуказанных трансаминаз в цитозоле, полученном посредством дифференциального центрифугирования (100000g), составляла 30%, 10% и 10% соответственно. По степени трансаминазной активности в надосадочной фракции (25000g, 100000g) аминокислоты можно расположить в следующем убывающем порядке: Мет>Ала>Сер.

Таблица 1. Активность трансаминаз в надосадках гомогената *A. niger* R-3, полученных дифференциальным центрифугированием

	Исходная активность фермента, мкмоль пирувата на г/мицелия	Центрифугирование при					
		3300g		25000g		100000g	
		A*	%	A	%	A	%
Оксидаза D-Мет	6.0	3.60	60	3.48	58	4.80	80
L-Ала-глиоксилат трансаминаза	1.4	0.28	20	0.36	26	0.42	30
L-Мет-глиоксилат трансаминаза	1.2	0.30	25	0.36	30	0.48	40
L-Сер-глиоксилат трансаминаза	1.6	0.16	10	0.20	13	0.16	10

Условное обозначение, здесь и в таблице 2: *А - активность трансаминаз.

В следующей серии экспериментов нами была исследована активность трансаминаз в субклеточных фракциях, выделенных из экстракта методом изопикнического центрифугирования в градиенте 0.5М сахарозы и 15%-ного перколла (700g).

Данные табл. 2 свидетельствуют о наличии активности L-Ала-глиоксилат, L-Мет-глиоксилат, L-Сер-глиоксилат, L-Лей-глиоксилат, L-Мет-пируват, L-Сер-пируват, L-Сер-пируват-трансаминаз как в митохондриях (I, II), так и в пероксисомальной фракции (III) и цитозоле (IV).

В митохондриальной фракции активность L-метионин-глиоксилат и L-метионин-пируват аминотрансфераз (9%, 24%) уступает активности L-серин-глиоксилат и L-серин-пируват трансаминаз (16%, 40%). В III

пероксисомальной фракции активность L-метионин-глиоксилат трансминазы выше (41%) по сравнению с активностью L-серин-глиоксилат (18%), в то время как активность L-метионин-пируват трансминазы и трансминаз сравнительно ниже (16%), чем активность L-серин-пируват аминотрансферазы (37%).

Таблица 2. Трансминазная активность в субклеточных фракциях *A. niger* R-3

	Исходная активность фермента, мкмоль пирувата на г/мицелия	Фракции							
		I		II		III		IV	
		A	%	A	%	A	%	A	%
Белок, мг/мл	2.0	0.2		0.3		0.9		0.7	
Оксидаза D-аминокислот	6.0	0.2	3	0.9	15	1.9	31	26	43
L-Ала-глиоксилат трансминаза	1.39	0.1	7	0.3	21	0.4	28	0.5	35
L-Мет-глиоксилат трансминаза	1.18	0.1	9	0.2	18	0.5	41	0.6	50
L-Сер-глиоксилат трансминаза	1.6	0.27	16	1.3	16	0.3	18	0.3	18
L-Вал-глиоксилат трансминаза	14	0.6	38	0.25	16	0.46	33	0	0
L-Лей-глиоксилат трансминаза	3.0	0.8	26	0.8	26	0.6	20	0.6	20
L-Мет-пируват трансминаза	2.5	0.6	24	10	42	0.4	16	0.4	16
L-Сер-пируват трансминаза	4.0	1.6	4.0	1.6	40	1.5	37	1.8	45

Активность L-Лей-глиоксилат аминотрансферазы обнаружена как в I (26%), так и в III пероксисомальной (20%) и IV фракциях (20%). В IV фракции преобладает активность L-Мет-глиоксилат (50%) и L-Сер-пируват (45%) трансминаз.

Таким образом, во всех субклеточных фракциях *A. niger* R-3 обнаружена различная активность трансминаз, что свидетельствует о наличии различных популяций пероксисом *A. niger* R-3, различающихся как по набору трансминаз, так и по их активности.

Изучение распределения ферментативной активности в субцеллюлярных фракциях *A. niger* R-3 показывает, что трансминирование L-Ала, L-Сер, L-Мет и L-Лей с глиоксилатом осуществляется энзимом, который представлен в различных тканях животных как L-Сер-пируват трансминаза или L-Ала-глиоксилат трансминаза и локализован в пероксисомах [8].

В отличие от животных объектов, эти трансминазы у *A. niger* R-3 локализованы также в цитозоле. В отличие от активности L-Лей-глиоксилат трансминазы, L-Вал-глиоксилат трансминаза в основном содержится в

пероксисомах (II фракция), связанных с мелкими митохондриями и отсутствует в микропероксисомах, содержащихся в IV фракции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антоненков В.Д., Герасимов А.М. Цитология, 20, 6, 676-681, 1978.
2. Белицер Н.Б. Успехи совр. биол., 84, 2(5), 189-206, 1977.
3. Журавский Г.И., Новоселова М.И. Производство пищевых кислот, М., Пищепромиздт. 1-234, 1953.
4. Луста К.А., Троценко Ю.А. Биохимия, 61, 2, 236-253, 1996.
5. Оганесян С.П., Давтян М.А., Хандога Я. Биохимия, 55, 12, 2221-2225, 1990.
6. Baudhuin P., Beaufay H. et al. Biochem J. 92, 179-184, 1964.
7. Bergmeyer H.U., Berni E. Methoden der enzymatischen analyse, Verlag Chemie, 1, 785-791, 1974.
8. Chandoga J, Krizko J. Biologia (Bratislava), 37, 4, 383-392, 1982.
9. Chandoga J, Krizko J. Biologia (Bratislava), 38, 12, 1251-1257, 1983.
10. Donaldson R.P., Yobbert N.E. et al. Arch. Biochem. and Biophys., 152, 190-215, 1972.
11. Lowry H.O. et al. J. Biol. Chem., 251, 4408-4415, 1951.

Поступила 12.11.2004