

Биол. журн. Армении, 3-4 (59), 2007

УДК 577.17:591.8

## ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ИСТОЧНИКА АЗОТА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНДУКЦИЮ ОКСИДАЗЫ L-АМИНОКИСЛОТ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

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

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 0025*

Исследовано влияние изменения концентрации источника азота питательной среды  $[(NH_4)_2SO_4]$  на активность оксидазы L-аминокислот различных популяций пероксисом *Aspergillus niger* R-3. Показано, что активность фермента во всех пероксисомальных фракциях обеспечивается при сочетании высоких концентраций L-аланина с низкими концентрациями экзогенного сульфата аммония. Очевидно, аммиак в высоких концентрациях подавляет индукцию оксидазы L-аминокислот. При сочетании L-аланина с низкими концентрациями аммиака обеспечивается индукция фермента, вероятно, вследствие включения аммиака через биосинтез глутамина в биосинтез важнейших для роста, в том числе и индукции ферментов, соединений.

Հետազոտվել է *Aspergillus niger* R-3 սննդամիջավայրի ազոտի աղբյուրի  $[(NH_4)_2SO_4]$  կոնցենտրացիայի փոփոխությունները տարբեր պերօքսիսոմալ ֆրակցիաների L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա. Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ֆերմենտի ակտիվությունը բոլոր պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում դրսևորվում է L-ալանինի բարձր կոնցենտրացիաների և էկզոգեն ամոնիում սուլֆատի ցածր կոնցենտրացիաների համատեղման ժամանակ: Ակնհայտ է, որ ամոնիակի բարձր կոնցենտրացիայի պայմաններում ընկճվում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը: L-ալանինի և ամոնիակի ցածր կոնցենտրացիաների համադրության պայմաններում ապահովվում է ֆերմենտի ինդուկցիան, որը հավանաբար, հետևանք է գլյուտամինի կենսասինթեզի միջոցով ամոնիակի ներառմանը աճման, այդ բովում և ֆերմենտների ինդուկցիայի իրար, կարևոր միացությունների կենսասինթեզում:

The influence of nitrogen source  $[(NH_4)_2SO_4]$  concentrations in growth medium on the activity of L-amino acid oxidase in different peroxisome fractions of *Aspergillus niger* R-3 has been investigated. The enzyme activity in all peroxisome fractions provided by combination of high concentrations of L-alanine with low concentrations of ammonium sulphate has been shown. Evidently, ammonia in high concentrations represses the induction of L-amino acid oxidase. Combination of L-alanine with low concentrations of ammonia provides the enzyme induction, which is probably due to inclusion of ammonia in biosynthesis of important for growth compounds including enzyme induction through glutamine biosynthesis.

### *Аминокислотные оксидазы - пероксисомы - индукция*

Пероксисомы, обнаруженные в микробных, растительных и животных клетках, характеризуются специфическим набором ферментов, который в зависимости от изменений условий окружающей среды подвергается качественным и количественным изменениям. Интересно, что

в печени крыс методом дифференциального центрифугирования выделены различные фракции пероксисом, различающихся по набору и активности ферментов [2, 3, 12].

В отношении штамма плесневого гриба *Aspergillus niger* R-3 установлено, что существуют различные популяции пероксисом, отличающиеся собственным набором различных окислительных ферментов (каталаза, оксидазы D-, L-аминокислот) и их активностью, причем при различных метаболических ситуациях ингибируется или стимулируется образование тех или иных популяций пероксисом, чем обеспечивается адаптация организма к изменениям состава питательной среды [4, 7, 8, 9].

В данной работе была поставлена цель углубить исследование влияния изменений концентрации источников азота питательной среды на изменения популяций пероксисом. Конкретно, исследовались изменения концентрации сульфата аммония питательной среды на активность оксидазы L-аминокислот различных популяций пероксисом грибной культуры *Aspergillus niger* R-3.

**Материал и методика.** Выращивание культуры гриба *Aspergillus niger* R-3, получение гомогената и выделение пероксисомальных фракций (II, III, IV) проводили по ранее описанным методикам [7]. В основную среду роста вносили различные источники азота ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, L-аланин) в эквивалентных по азоту количествах. Активность оксидазы L-аминокислот выражали в мкМ образовавшегося аммиака на 1 г мицеллы, инкубации - 1 ч при 37°. Количество образовавшегося аммиака определяли микродиффузионным методом Зелингсона в молификации Спалаковой [10]. Количество белка определяли методом Лоури [11].

**Результаты и обсуждение.** Даутия и сотрудники [5] утверждают, что основной причиной прекращения дезаминирования аминокислот при гомогенизации тканей является нарушение процессов нейтрализации и удаления аммиака, приводящее к накоплению в гомогенате высоких концентраций аммиака, ингибирующих глутаматдегидрогеназу и оксидазу L-аминокислот. Фракции пероксисом выделяли из гомогената грибов методом изополихлорического центрифугирования в градиенте 0.5 М сахарозы и 19 мг/мл пероксида, при котором сохраняется целостность внутриклеточных структур.

Ранее нами было показано наличие в отдельных фракциях пероксисом культуры *Aspergillus niger* R-3 активности оксидазы L-аминокислот, распределение которой между фракциями и ее уровень широко варьирует в зависимости от состава питательной среды. В частности, оптимальной средой для проявления активности указанного фермента во всех фракциях является среда роста, содержащая 0.5% D-глюкозы и L-аланин в концентрации 1/4 части от нормы азота.

В данной работе приведены результаты экспериментов по определению оптимальной концентрации экзогенного сульфата аммония, обеспечивающего проявление активности фермента в пероксисомальных фракциях. Показано, что при варьировании концентрации L-аланина и сульфата аммония резко варьируют и показатели проявления активности оксидазы L-аминокислот в различных пероксисомальных фракциях.

Таблица 1. Активность оксидаз L-, D-аминокислот *A. niger* R-3 в зависимости от количества азота питательной среды

Фракции	Белок, мг	Оксидаза L- аминокислот			Оксидаза D-аминокислот		
		мкМ NH <sub>4</sub> / г мицелия	удельная активность, ед/мг белка	%	мкМ NH <sub>4</sub> / г мицелия	удельная активность, ед/мг белка	%
Источник азота (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (норма)							
II	6,3	0	0	0	5,9	10	44
III	6,5	0	0	0	0	0	0
IV	6,3	0	0	0	7,5	1,2	55,9
Источник азота (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1/4 от нормы)							
II	6,5	0	0	0	4,95	0,76	22
III	4,5	0	0	0	12,0	2,66	55
IV	5,2	3,6	0,69	100	4,9	0,94	22,4
L-аланин (норма)							
II	6,3	4,2	0,6	100	3,2	0,5	23
III	8,5	0	0	0	4,6	0,5	33,8
IV	9,1	0	0	0	5,8	0,65	42,6

Примечание: Для (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> нормой считается 0,35 г на 100 мл, для L-аланина нормой считается 0,4 г на 100 мл.

Согласно данным табл. 1, при высоких концентрациях сульфата аммония (в норме) в отдельных пероксисомальных фракциях активность L-аминокислотной оксидазы не проявляется, что, очевидно, связано с ингибирующим влиянием сульфата аммония на индукцию фермента. При 4-кратном уменьшении концентрации экзогенного сульфата аммония среды роста L-аминокислотная оксидазная активность обнаруживается в IV фракции (3,6 мкМ NH<sub>4</sub>/г мицелия), а в варианте с высокой концентрацией L-аланином (в норме) активность фермента проявляется только во II фракции. Что же касается активности D-аминокислот, то она обнаруживается во всех фракциях, как в варианте с сульфатом аммония, так и с L-аланином.

Таблица 2. Активность оксидаз L-, D-аминокислот *A. niger* R-3 при варьировании концентраций источников азота в среде роста

Фракции	Белок, мг	Оксидаза L- аминокислот			Оксидаза D-аминокислот		
		мкМ NH <sub>4</sub> / г мицелия	удельная активность	%	мкМ NH <sub>4</sub> / г мицелия	удельная активность	%
Источник азота 3/4 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 1/4 L-аланин							
II	6,3	0	0	0	7,9	1,2	44
III	6,5	0	0	0	0	0	0
IV	6,3	0	0	0	10	1,5	55,8
Источник азота 3/4 L-ала + 1/4 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>							
II	4,3	2,9	0,7	24	0	0	0
III	5,1	4,5	0,9	37,5	10,04	1,9	50
IV	4,7	4,8	1,0	40	10,1	2,1	50

При сочетании в среде роста различных концентраций сульфата аммония и L-аланина активность оксидазы L-аминокислот также варьирует. Активность фермента во всех пероксисомальных фракциях обеспечивается при сочетании высоких концентраций L-аланина с низкими концентрациями экзогенного сульфата аммония (табл. 2). При обратном соотношении, т.е. при высокой концентрации сульфата аммония и низкой концентрации L-аланина, активность фермента не проявляется ни в одной из пероксисомальных фракций.

Таблица 3. Активность оксидазы L-аминокислот *A. niger* R-3 при варьировании концентраций источников азота в среде роста

Фракции	Источник азота							
	3/4 L-аланин + 1/4 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				1/5 L-аланин + 1/5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
	Белок, мг	мкМ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / г мицелия	удельная активность	%	Белок, мг	мкМ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / г мицелия	удельная активность	%
II	4,3	2,9	0,7	24	4,5	6,0	1,3	30
III	5,1	4,5	0,9	37,5	5,9	5,3	0,9	27
IV	4,7	4,8	1,0	40	9,1	8,3	0,9	43

В дальнейших исследованиях (табл. 3), при уменьшении концентрации экзогенного сульфата аммония в среде роста (до 1/5 части) наблюдается значительное повышение активности оксидазы L-аминокислот во всех пероксисомальных фракциях, причем это повышение проявляется во фракциях неодинаково. И в данном случае, очевидно, аммиак в высоких концентрациях подавляет индукцию оксидазы L-аминокислот. А при сочетании L-аланина с низкими концентрациями аммиака обеспечивается индукция фермента, вероятно, вследствие включения аммиака через биосинтез глутамина в биосинтез важнейших для роста, в том числе и индукции ферментов, соединений, каковыми являются пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, гексозамины, некоторые эссенциальные аминокислоты (триптофан, гистидин). В этом отношении заслуживает внимания стимулирующее влияние введения в питательную среду очень низких концентраций сульфата аммония на усвоение D- или D L-аминокислот, биосинтез биомассы и индукцию оксидазы L-аминокислот у дрожжей рода *Candida* [6, 1]. Что же касается оксидазы D-аминокислот, то ее активность при изменении источников азота питательной среды меняется незначительно. Полученные данные подтверждают ранее сделанный вывод относительно того, что в зависимости от состава питательной среды образуются различные популяции пероксисом с различными наборами ферментов, обеспечивающих адаптацию грибов к условиям внешней среды. При этом, очевидно, индуцируются или репрессируются различные пероксисомы вместе с содержащимся в них набором ферментов. Подобным закономерностям подвергается и индукция оксидазы D и L-аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багдасарян Е.Г. Автореф. докт. дисс., Ереван, 2004.
2. Белицер Н.В. Успехи современной биологии. Киев. 84, 2 (5), 189-206, 1977.
3. Грубан З., Рехцигс М. Микротельца и родственные им структуры, М., 1972.
4. Давтян М.А., Папоян А.Р., Оганесян С.П. Вопросы современной ботаники и микологии (сб. статей, посвя. К 75-летию каф ботаники ЕГУ), Ереван, 75-77, 1999.
5. Давтян М.А. Эволюционные аспекты образования и нейтрализации аммиака. III Сисакяновские чтения, Ереван, 2004.
6. Нерсисян А.А., Оганесян С.П., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении. 26, 6, 1973.
7. Оганесян С.П., Давтян М.А., Хандога Я. Биохимия, 55, 12, 2221-2225, 1990.
8. Оганесян С.П., Папоян А.Р., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 51, 3, 229, 1998.
9. Папоян А.Р., Оганесян С.П., Давтян М.А. Прикладная биохимия и микробиология, 37, 3, 297-300, 2001.
10. Силакова А.И., Труш Г.П. и др. Вopr. мед. химии, 8, 538-545, 1962.
11. Lowry O.H. et. al. J. Biol. Chem., 193, 1, 256-261, 1951.
12. De Duve C., Baudhuin P. Physiol. Rev, 46, 323-357, 1969.

Поступила 24.X.2007