



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(64), 2012

ASPERGILLUS NIGER ԲՈՐԲՈՍԱՄՆԿԻ ՊԵՐՕՔՍԻՍՈՄՆԵՐՈՒՄ ԱՄԻՆԱԹՎԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա.Ո. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

*Երևանի պետական լսարան, կենսաքիմիայի ամբիոն
bio_chem@ysu.am*

Հայտնաբերվել է ջրածնի պերօքսիդով ինդուկցված *L*-ամինաթթվային օքսիդազի բարձր ակտիվություն *Aspergillus niger* բորբոսասնկի բջիջների պերօքսիսոմներում:

L-ամինաթթվային օքսիդազ — ջրածնի պերօքսիդ — պերօքսիսոմ — ինդուկցիա

Обнаружена высокая активность индуцированной перекисью водорода *L*-аминокислотной оксидазы в пероксисомах клеток плесневого гриба *Aspergillus niger*.

L-аминокислотная оксидаза – перекись водорода – индукция – пероксисомы

High activity of *L*-aminoacid oxidase induced by hydrogen peroxide in peroxisomes of mould fungi *Aspergillus niger* has been shown.

L-aminoacid oxidase – hydrogen peroxide – peroxisomes – induction

Պերօքսիսոմները միաշերտ մեմբրանով շրջափակված ենթաբջջային կառուցվածքներ են, որոնք պարունակում են զանազան սուբստրատների օքսիդազներ՝ ուրատ օքսիդազան, *L*-հիդրօքսիթյունների օքսիդազներ, *D*-ամինաթթվային օքսիդազ, կատալազա [3]: Նրանք հայտնաբերվել են բուսական, կենդանական բջիջներում, միկրոօրգանիզմներում [2, 3, 11, 10]: Ապացուցվել է անհատական զարգացման տարբեր փուլերում սննդային միջավայրի փոփոխությունների ժամանակ պերօքսիսոմների տարբեր պոպուլյացիաների առաջացումն իրենց յուրահատուկ ֆերմենտներով և ակտիվությամբ [2, 4]:

Գրականությունից հայտնի է ընդամենը առնետի լյարդի, երիկամների, *Tetrahymena pyriformis*-ի պերօքսիսոմներում տեղաբաշխված *L*-լեյցինի, բայց ոչ *L*-ալանինի դեզամինացման ցածր ակտիվության փաստը [10]: Ներկայացված աշխատանքում հետազոտվել է *Aspergillus niger* բորբոսասնկի բջիջների պերօքսիսոմներում ջրածնի պերօքսիդով ինդուկցված *L*-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը:

Նյութ և մեթոդ: Որպես հետազոտման օբյեկտ ծառայել է *Aspergillus niger*-ի բորբոսաստնկը, որն օգտագործվում է լիմոնաթթվի արտադրության մեջ: Սունկն աճեցվել է Ռոլենի սինթետիկ սննդամիջավայրում հետևյալ բաղադրությամբ՝ գլյուկոզ — 2գ, KH_2PO_4 — 0.05 գ, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.05 գ, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.005 գ լուծված 100 մլ ծորակի ջրի մեջ: Աճման միջավայրում ավելացվել է նաև 0.5մլ 33%-ոց H_2O_2 —ի լուծույթ: Որպես ազոտի աղբյուր օգտագործվել է *L*-ալանին-4գ լուծված 1000 մլ-ում:

Ցանքը կատարվել է 100մլ ծավալով միջավայրում՝ (pH-7.0) 42°C, իսկ աճեցումը՝ 35°C: *Aspergillus niger* R-3-ի 4 օրվա աճեցված կուլտուրան ենթարկվել է հոմոգենիզացիայի թորած ջրում էլվեջեն-Պոտտերի հոմոգենիզատորով (6 ր): Պատրաստված 10%-ոց հոմոգենատը ցենտրիֆուգվել է 600-700 g (3000 պտ/ր) արագությամբ 10 ր կորիզային ֆրակցիան հեռացնելու համար: Միկրոսոմալ ֆրակցիան ստանալու համար 1լ վերնստվածքային հեղուկը ենթարկվել է իզոպիկնիկ ցենտրիֆուգման 0.5 մոլ սախարոզի և ֆիկոլի գրադիենտում 6000 պտոյտ/րոպե, -4-0°C պայմաններում, որի արդյունքում ստացվել է 3 ֆրակցիա (I, II, III):

Ապա հիշատակված ենթաբջջային ֆրակցիաներում որոշվել է [KΦ.1.4.3.3.], L-ամինաթթվային օքսիդազների [KΦ.1.4.3.2.] ակտիվությունը [8]:

Սկզբնական հոմոգենատում և պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում D-, L-ամինաթթվային օքսիդազների ակտիվության որոշման համար ֆերմենտային նմուշը ինկուբացվել է 60-90 րոպե պիրոֆոսֆոտային բուֆերում (pH=8.3) համապատասխան սուբստրատների (10մկմոլ) առկայությամբ՝ անընդհատ թափահարելով: Ռեակցիան կանգնեցվել է 0.1-0.2%-ոց դինիտրոֆենիլհիդրազինով, 10 ր հետո ավելացվել է 2 մլ 0.1 N NaOH: Ստացված գույնի ինտենսիվությունը գնահատվել է գունաչափական մեթոդով՝ ՓՅK-56, λ =570 [1]:

Ֆերմենտների ակտիվությունը արտահայտվել է մկմոլ կետոթթու 1գ միցելում:

Արդյունքներ և քննարկում: Հայտնի է, որ բջիջներից պերօքսիսոմներն անջատելու համար օգտագործվում է իզոպիլինիկ ցենտրիֆուգում 0.2 մոլ սախարոզի և 15% պերկոլի գրադիենտում [5]: Մեր կողմից կատարվել է *Aspergillus niger* բորբոսամսկի բջիջներից պերօքսիսոմների ֆրակցիաների անջատումը 0.2 մոլ սախարոզի և 20% պերկոլի գրադիենտում: Վերջիններիս իդենտիֆիկացիան իրականացվել է մարկերային ֆերմենտ D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության որոշմամբ:

Աղյուսակ 1. L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը 0.25 մոլ սախարոզի և 20% ֆիկոլի գրադիենտում անջատված պերօքսիսոմների ֆրակցիաներում (մկմոլ կետոթթու 1 գ միցելում, n = 5, p < 0.05):

Սուբստրատ	L-ալանին	D-ալանին
Սկզբնական էքստրակտ	0	9.5 [±] 1.3
Ֆրակցիա		
I	0	2.1 [±] 0.5
II	3.1 [±] 0.7	4.1 [±] 1.9
III	2.2 [±] 0.4	8.6 [±] 0.1

Ծանոթություն. Յենտրիֆուգում 700 g, 90 ր

Աղ. 1-ում ներկայացված փորձնական արդյունքներից պարզվել է, որ *Aspergillus niger* R 3-ի սկզբնական էքստրակտում առկա է D-ամինաթթվային օքսիդազը, որի ակտիվությունը կազմում է 9.5 մկմոլ 1գ միցելում, իսկ L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվություն չի հայտնաբերվել: Դա բացատրվում է հյուսվածքների հոմոգենիզացիայի ժամանակ ամինաթթուների դեզամինացման ընդհատումով՝ կապված ամոնիակի չեզոքացման և հեռացման գործընթացների խանգարման հետ [5]:

Aspergillus niger R 3-ի բջիջներից (նման պերկոլի գրադիենտին) 0.2 մոլ սախարոզի 20 % ֆիկոլի գրադիենտում նույնպես հնարավոր է անջատել պերօքսիսոմներ պարունակող I, II, III ֆրակցիաներ, որը հաստատվում է պերօքսիսոմների օրգանոսպեցիֆիկ մարկերային ֆերմենտի՝ D-ամինաթթվային օքսիդազի տեղաբաշխման պատկերով՝ պերօքսիսոմալ I ֆրակցիայում D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը կազմում է 2.1 մկմոլ NH₃ 1 գ միցելում, II ֆրակցիայում՝ 4.1 մկմոլ NH₃ 1գ միցելում, II, իսկ III ֆրակցիայում՝ 8.6 մկմոլ NH₃ 1գ միցելում: Իրականում մարկերային D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը փաստում է I, II և III ֆրակցիաներում պերօքսիսոմների առկայության մասին:

Ինչ վերաբերում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությանը, ապա այն կազմում է պերօքսիսոմներ պարունակող II ֆրակցիա՝ 3.1մկմոլ կետոթթու 1գ միցելում և III ֆրակցիա՝ 2.2, իսկ I ֆրակցիայում բացակայում է: Կենսաքիմիայի ամբիոնում կատարված նախկին գիտահետազոտական աշխատանքները ցույց են տվել, որ սննդամիջավայրում ջրածնի պերօքսիդի ցածր կոնցենտրացիաների առկայության ժամանակ ինդուկցվում է L-ամինաթթվային օքսիդազան, որի արդյունքում նրա ակտիվությունը հայտնաբերվում է անգամ սկզբնական էքստրակտում [7]: Այդ իսկ նպատակով *Aspergillus niger* R 3 սուսկն աճեցվել է ինդուկցիայի պայմանները ապահովող սննդամիջավայրում հետևյալ բաղադրությամբ՝ 500 մգ D-գլյուկոզ, 0.1 գ L-ալանին, 0.09 մոլ H₂O₂ —100 մլ: Ուսումնասիրվել է *Aspergillus niger* R 3-ի բջիջների L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը 0.25 մոլ սախարոզի և 20% ֆիկոլի գրադիենտում անջատված պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում (աղ. 2):

Աղյուսակ 2. Ջրածնի պերօքսիդով ինդուկցված L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը պերօքսիտմների ֆրակցիաներում (մկմոլ կետոթթու 1 գ միցելում, n = 5, p < 0.05):

Սուբստրատ	L-ալանին	D-ալանին
Սկզբնական էքստրակտ	8.2 [±] 0.5	10.1 [±] 0.7
Ֆրակցիա		
I	0	0.5 [±] 0.2
II	7.3 [±] 0.9	9.5 [±] 0.5
III	4.9 [±] 0.4	5.4 [±] 0.3

Ծանոթություն. Ցենտրիֆուգում 700 g, 90 p

Ստացված (աղ. 2) արդյունքները պարզել են, որ ջրածնի պերօքսիդ պարունակող սննդամիջավայրում աճեցված բորբոսասնկի բջիջներում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը կազմում է 8 մկմոլ կետոթթու 1 գ միցելում, իսկ նրանից անջատված պերօքսիտմալ II և III ֆրակցիաներում ավելի բարձր է ինդուկցված ֆերմենտի ակտիվությունը համեմատած աղ. 1-ում արտացոլված տվյալների հետ: Այսպիսով, փորձնական արդյունքները փաստում են բջիջ *Aspergillus niger* բորբոսասնկի բջիջներում L-ամինաթթվային օքսիդազի ինդուկցիայի գործընթացում մետաբոլիկ տարբեր նշանակություն ունեցող պերօքսիտմների պոպուլյացիաների մասնակցության մասին, քանի որ նրանք որակավորվում են ինչպես L-, այնպես էլ D-ամինաթթվային օքսիդազների ակտիվության տարբեր մակարդակներով:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В.*, Биохимия, М., с. 86, 1988.
2. *Белицер А.В.*, Цитохимия и кругооборот микротелец в клетках животных и растений. Успехи современной биохимии, **84**, вып. 2, 5, с. 189-206, 1977.
3. *Грубан Н.М., Рехцигл М.*, Микротельца и родственные им культуры, М., Мир, 1-310, 1972.
4. *Давтян М.А.* Эволюционные аспекты образования и нейтрализации аммиака, III Сисакяновские чтения, Ереван, Армения, стр. 106-154, 2004.
5. *Кольман Я., Рем К.Г.*, Наглядная биохимия, М., Мир, стр. 201, 2000.
6. *Оганесян С.П.*, Аминокислотные оксидазы и их взаимосвязь с пероксисомами, Автореферат, Ереван, 2001
7. *Оганесян С.П., Габриелян Г.А., Давтян М.А., Григорян А.Р.*, Влияние перекиси водорода на индукцию L-аминокислотной оксидазы *Aspergillus niger* R 3, Вестник МАНЭБ, **15**, #3, вып. 1, 2010.
8. *Папоян А.Р., Оганесян С.П., Давтян М.А.*, Активность оксидазы L-аминокислот у гриба *Asp. niger* R 3 в зависимости от источника азота в среде, Прикладная биохимия и микробиология, **37**, 297-300, 2001.
9. *Baudhuin P., Beafay A., Rahman-Li Y., Sellinger O.Z., Wattiaux R., Jacques P., De Duve.*, Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and katalase in Rate-liver tissue. J. Biochem., **92**, p. 179-184, 1964.
10. *Baudhuin P., Muller N., Poole B. and De Duve*, Non-mito. Chondrial oxidasing particles (microbodies) in rat liver and kidney and in Tetrahymena periformis., Biochem Biophys. Des. Commun., **20**, 53, 1964b.
11. *De Duve, Baudhuin P.*, Peroxisomes (microbodies and related particles), Physiol., Oev. **46**, p. 323-357, 1966.

Մտագրվել է 03.07.2012