



Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОРНИТИНОВОГО ЦИКЛА У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

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

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
bio_chm@ysu.am

Изучалось влияние перекиси водорода на активность ферментов орнитинового цикла у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3. Показано, что при выращивании плесневых грибов на питательной среде, содержащей H_2O_2 в концентрации 0.016 М, резко стимулируются ферменты орнитинового цикла (карбамоилфосфатсинтетаза I, орнитинтранскарбамоилаза, аргининосукцинатсинтетаза, аргининосукцинатлиаза, аргиназа).

*Аргиназа – карбамоилфосфат синтетаза I – орнитинтранскарбамоилаза –
аргининосукцинатсинтетаза – аргининосукцинатлиаза*

Ուսումնասիրվել է ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը *Aspergillus niger* R-3 բորբոսասկերի օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտների ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ 0.016 Մ կոնցենտրացիայով ջրածնի պերօքսիդ պարունակող սննդամիջավայրում աճեցված բորբոսասկերի էքստրակտներում զգալի խթանվում են օրնիտինային ցիկլի բոլոր 5 ֆերմենտները (կարբամոլիֆոսֆատ սինթետազ I, օրնիտինտրանսկարբամոլազ, արգինինոսուկցինատսինթետազ, արգինինոսուկցինատլիազ, արգինազ):

*Արգինազ – կարբամոլիֆոսֆատ սինթետազ I – օրնիտինտրանսկարբամոլազ –
արգինինոսուկցինատսինթետազ – արգինինոսուկցինատլիազ*

We studied the influence of hydrogen peroxide on the activity of urea cycle enzymes in *Asp. niger* R-3 yeasts. It has been shown that the enzymes of urea cycle are stimulated (carbamoyl phosphate synthetase I, ornitine transcarbamoylase, argininosuccinate synthetase, argininosuccinase, arginase) when the yeast grow in a medium containing 0.016 M H_2O_2 .

*Carbamoyl phosphate synthetase I – ornitine transcarbamoylase – argininosuccinate
synthetase – argininosuccinase – arginase*

Установлено, что перекись водорода в высоких концентрациях (0.1-2.2 ммоль) разрушает клеточные структуры, разрушает цепи ДНК [7, 18-20, 22], резко снижает содержание нуклеозидтрифосфатов, что приводит к смерти [12], подавляет гликолиз [22]. А при низких концентрациях (0.1-50.0 мкмоль), наоборот, стимулирует многие клеточные процессы. В частности, H_2O_2 активизирует K^+ каналы плазматической мембраны [9-11], стимулирует циклооксигеназный путь биосинтеза простагландинов [13], участвует в биосинтезе тиреоидных гормонов [4, 5], активизирует различные фосфолипазы [6, 14], стимулирует активность тирозин протеинкиназы [8, 21].

Доказано, что H_2O_2 в высоких концентрациях (10^{-2} – 10^{-5} М) подавляет рост дрожжей *Sachar. cerevisiae*, а при низких (10^{-7} М), наоборот, стимулирует их рост [3]. Нашими предыдущими исследованиями показано, что H_2O_2 , добавленная к инкубируемому экстракту плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 при концентрации 0.018 М, резко стимулирует активность L-аминокислотной оксидазы. Нужно отметить, что исследуемые грибы в ходе проявления ферментативной активности вырабатывают перекись водорода. Было бы интересно исследовать влияние H_2O_2 на активность ферментов, не вырабатывающих H_2O_2 . Перед нами была поставлена задача исследовать влияние H_2O_2 (при концентрации 0.018 М) на активность ферментов орнитинового цикла важнейшего механизма нейтрализации токсического аммиака у уреотелических организмов. Известно, что орнитиновый цикл мочевинообразования открыт Кребсом и Гензелейтом еще в 30-е годы прошлого века. Цикл состоит из 5 ферментов, которые вовлекают аммиак в биосинтез мочевины. Первым ферментом цикла является аммиакзависимая карбамоилфосфатсинтетаза I, второй фермент – орнитинтранскарбамоилаза, катализирующая синтез цитруллина из орнитина и карбамоилфосфата, третий фермент – аргининосукцинатсинтетаза, катализирующая конденсацию цитруллина с аспартатом, в результате чего синтезируется аргининосукцинат. Четвертый фермент – аргининосукцинатлиаза катализирует гидролиз аргининосукцината с образованием аргинина и фумаровой кислоты и пятый фермент – аргиназа, гидролизующая аргинин на мочевину и орнитин.

Материал и методика. В качестве объекта исследований служил плесневой гриб *Asp. niger* R-3, который используется в производстве лимонной кислоты. Гриб выращивается в синтетической питательной среде Роленя следующего состава: глюкоза – 2 г., KH_2PO_4 – 0.05 г., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05 г., $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005 г, растворенных в 100 мл водопроводной воды. В среду роста добавляли также 0.5 мл 33%-ной H_2O_2 . В качестве источника азота использовали L-аланин – 0.4 г. Посев производился в 100 мл среде (pH-7.2, 42°C), выращивание – при 32°C. Четырехдневная выращенная культура *Asp. niger* R-3 подвергалась гомогенизации в дистиллированной воде в гомогенизаторе типа Поттера-Элледжиема (6 мин).

В первую очередь мы определяли влияние перекиси водорода на активность ферментов карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы, которые катализируют биосинтез цитруллина из аммиака, углекислого газа и орнитина. Активность указанных ферментов определяли по Браунштейну и сотр. [1]. Клетки разрушали в изотоническом растворе KCl. В опытную пробу вносили: 0.5 мл 5%-ного гомогената, АТФ-10мкМ, MgSO_4 – 35 мкМ, L-орнитин – 20 мкМ, L-глю – 60 мкМ, NH_4Cl – 35 мкМ, NaHCO_3 – 30 мкМ и KCl до изотонической концентрации среды. Все растворы готовили в 0.05 М К-фосфатном буфере, pH 7.2. Общий объем смеси составил 3.5 мл. Инкубация проводилась при 37°C в течение одного часа. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 20 % ТХУ. Пробы центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли цитруллин.

Цитруллин определяли колориметрическим методом Арчибальда [2]. В пробирку наливали 1 мл надосадочной жидкости, 2,5 мл кислотной смеси (1 часть концентрированной фосфорной кислоты и 3 части концентрированной серной кислоты в присутствии водных растворов солей FeCl_3 , MgSO_4) и 0.25 мл 3%-ного раствора диацетилмонооксима. Пробирки встряхивали, кипятили в темноте в течение 45 мин. Пробы охлаждали в течение 10 мин и колориметрировали на СФ-4 при длине волны 478 мкм против контроля на реактивы.

В качестве дополнительного метода определения биосинтеза цитруллина проводили арсенолиз цитруллина, который катализируется орнитинтранскарбамоилазой [17]. В пробирку наливали 0.5 мл гомогената, приготовленного на воде, и 1.5 мл раствора, содержащего 100 мкМ L-цитруллина и 500 мкМ мышьяковокислого натрия, нейтрализованного до pH 6.8-7.1. Инкубацию проводили при 37°C в течение одного часа. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 15 % ТХУ. Аммиак определяли микродиффузионным методом.

Аргининосукцинатсинтетазную и аргининосукциназную активность определяли методом Ратнер и Паппас [16]. Гомогенат готовили в 0.05 М калий-фосфатном буфере, pH 7.2.

В опытную пробу вносили: 0.05 мл 5% гомогената АТФ – 10мМ, MgSO_4 – 10 мкМ, L-цитруллина – 20 мкМ, янтарной кислоты – 20 мкМ, L-аспартата – 20 мкМ, 20 ед. аргиназы. Общий объем смеси составлял 3.9 мл. Инкубацию проводили при 37°C в течение одного часа. Определение образовавшейся при этом мочевины проводили методом Арчибалда [2].

Аргиназную активность определяли методом Ратнер с небольшими изменениями [15]. К 1 мл исследуемого экстракта плесневых грибов добавляли 5 мкМ MnCl_2 (в 0.2 мл воды), 1.4 мл 0.04 М глицинового буфера (рН-9.5) и 50 мкМ L-аргина (в 0.4 мл глицинового буфера). После 1-часовой инкубации реакцию приостанавливали добавлением 1 мл 15% ТХУ, спустя 20 мин центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли мочевины. Активность фермента выражали в микромолях образовавшейся мочевины на 1 г мицелия.

Результаты и обсуждение. В первой серии исследований мы изучали биосинтез цитруллина в экстрактах плесневых грибов, выращенных на среде, содержащей 0.016 М H_2O_2 . Соответствующие данные приведены в табл. 1. Как видно из данных табл. 1, при инкубировании экстракта грибов в присутствии указанных в методической части субстратов проявляется активность карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы, а именно при часовой инкубации экстракта синтезируется 1,1 мкмоль цитруллина на 1 г мицелия, в то время как при инкубации экстрактов грибов, выращенных в присутствии H_2O_2 , резко стимулируются вышеуказанные ферменты (в 4.3 раза), и образовавшийся цитруллин составляет 4,8 мкмоль на 1 г мицелия. В качестве дополнительного метода определения орнитинтранскарбамоилазной активности проводили арсенолиз цитруллина. Как показывают полученные данные, при высоких концентрациях мышьяковокислого натрия (500 мкМ) из цитруллина образуется аммиак, количество которого составляет 9,1 мкмоль на 1 г мицелия, а под влиянием H_2O_2 арсенолиз активируется в 3,6 раза.

Табл. 1. Влияние перекиси водорода на активность ферментов карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 (n=5, p<0.05)

Питательная среда Ролена	Карбамоилфосфатсинтетаза и орнитинтранскарбамоилаза (мкМ цитруллин на 1 г мицелия)	Арсенолиз цитруллина (мкМ NH_3 на 1 г мицелия)
Без H_2O_2	1,1±0.001	9,1 ±0.001
0.016 М H_2O_2	4,8±0.001	32,9 ± 0.015

Таким образом, помимо L-аминокислотной оксидазы, резко стимулируется активность карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы. Данные табл. 2 показывают, что H_2O_2 стимулирует также аргининосукцинатсинтетазную и аргининосукциназную активность экстрактов в 3.7 раза.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние H_2O_2 на активность аргиназы плесневых грибов. Данные табл. 3 показывают, что аргиназная активность резко стимулируется в присутствии H_2O_2 в питательной среде роста дрожжей. Так, без H_2O_2 аргиназная активность составляет 193.2 мкМ мочевины на 1 г мицелия, а в присутствии H_2O_2 – 907.5 мкМ мочевины на 1 г мицелия.

Обобщая приведенные данные, можем заключить, что H_2O_2 стимулирует все ферменты орнитинового цикла у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3. Причем степень стимуляции в отношении различных ферментов различна. Очевидный интерес представляет тот факт, что стимулируются перекисью водорода не только H_2O_2 , вырабатывающие ферменты (оксидаза L-аминокислот), но и ферменты, не вырабатывающие H_2O_2 .

Табл. 2. Влияние перекиси водорода на активность ферментов аргининосукцинатсинтетазы и аргининосукциназы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 (n=5, p<0.05)

Питательная среда Ролена	Аргининосукцинатсинтетаза и аргининосукциназа, мкМ мочевины на 1 г мицелия
Без H ₂ O ₂	8.67±0.001
0.016 М H ₂ O ₂	32.1±0.0015

Табл. 3. Влияние перекиси водорода на активность аргиназы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 (n=5, p<0.05)

Питательная среда	Аргиназная активность, мкМ мочевины на 1 г мицелия
Без H ₂ O ₂	193.2±0.06
0.016 М H ₂ O ₂	907.5±0.08

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А.Е., Северина И.С., Барская Ю.Е. О торможении орнитинового цикла мочевинообразования-метил-DL-аспарагиновой кислотой. Биохимия, 21, с.738-745, 1956.
2. Archibald R.M. Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. J. Biol. Chem., 156, p 121-142, 1944.
3. Bagdasaryan N.S., Ayrapetyan S. N.. The effect of SMF, EHPP and Hydrogen peroxide on the development of yeasts. In: Bioelectromagnetics: Current Concepts, S. Ayrapetyan and M. Markov, eds., NATO Science Series, Springer Press, the Netherlands., pp. 391-396, 2006
4. Deme D., Doussiere J., De Sandro., V., Dupuy C., Pommier J., Virion A., The Ca²⁺/NADPH-dependent H₂O₂ generator in thyroid plasma membrane: inhibition by diphenyleneonium. Biochem J., 301, p 74-81, 1994
5. Dupuy C., Virion A., Ohayon R., Kaniewski J., Deme D., Pommier J. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. J. Biol. Chem., 266, p. 3739-3743, 1991.
6. Goldman R., Ferber E., Zort U. Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. FEBS Lett., 309, p. 190-192, 1992.
7. Harian J.M., Levine J.D., Callahan K.S., Schwartz B. R., Harker L.A., Glutathion redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellular generated hydrogen peroxide. J. Clin. Invest., 73, p. 706-713, 1984.
8. Heffetz D., Rutter W.J., Zick Y. The insulinomimetic agents H₂O₂, and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. Biochem J., 288, p. 631-635, 1992.
9. Krippeit Drews P., Haberland C., Fingerle J., Drews G., Lang F. Effects of H₂O₂ on membrane potential and [Ca²⁺]: of cultured rat arterial smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, p. 139-145, 1995.
10. Krippeit Drews P., Lang F., Haussinger D., Drews H₂O₂, induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. Pflungers Arch., 426, p. 552- 554, 1994.
11. Kuo S. S., Saad A. H., Koong A. C., Hahn G. M., Giaccia A. J., Potassium-channel activation in response to low doses of Y-irradiation involves reactive oxygen intermediates in nonexcitatory cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 90, p. 908-912, 1993.
12. O'Donnell-Tormey J., De Boer C. J., Nathan C.F. Resistance of human tumor cells in vitro to oxidative cytolysis. J. Clin Invest., 76, p. 80-86, 1985.
13. Pratico D., Juliano L., Puicicelle F.M., Bonavita M.S., Gazzaniga P.P., Violi F., Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. Haemostasis, 21, p. 169-174, 1991.

14. Rao G.N., Runge M.S., Alexander R.W. Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A₂ in vascular smooth muscle cells. *Biochem. biophys. acta.*, 1265, p. 67-72, 1995.
15. Rathner S., Morell H., Carvalho E., Enzymes of arginine metabolism in brain. *Arch Biochem. Biophys.*, 91, p. 280-286, 1949.
16. Ratner S., Pappas A. *Biosynthesis of urea. I.* Enzymic mechanism of arginine synthesis from citrulline. *J. Biol. Chem.*, 179, 9, p. 1183-1198, 1949.
17. Reichard P. Ornithine carbamyl transferase from rat liver. *Acta Chem. Scand.* II 523, 1957.
18. Schraufstatter I.U., Hinshaw D.B., Hystop P.A., Spragg R.G., Cochrane C.G. Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosin diphosphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.*, 77, p. 1312-1320, 1986a.
19. Schraufstatter I.U., Hinshaw D.B., Hystop P.A., Spragg R.G., Sklar L.A., Cochrane C.G., Hydrogen peroxide induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 83, p. 4908-4912, 1986b.
20. Schraufstatter I.U., Hystop P. A., Jacson J., Cochrane C.C. Mechanisms of oxidant injury of cells. Leukocyte emigration and its sequelae. Basel: Karger, p. 150-160, 1987.
21. Shasby D. M., Yorek M., Shasby S.S., Exogenous oxidants initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. *Blood.*, 72, p. 491-499, 1988.
22. Spragg R.J., Hinshaw D.B.; Hyslop P.A., Schraufstatter I. U., Cochrane C.G. Alteration in ATP and energy degree in cultured endothelial and P388D1 cells following oxidant injury. *J. Clin. Invest.*, 76, p. 1471-1476, 1985.

Поступила 09.04.2013