

М. А. ДАВТЯН, Г. А. ГАБРИЕЛЯН, Б. А. АКОПЯН

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ РОДА CANDIDA

Исследовано влияние холода, различных способов голодания, а также природы источников азота на аргиназную активность дрожжей, в частности *Candida guilliermondii* 71.

Обнаружена выраженная аргиназная активность у изучаемого штамма; доказано наличие явления субстратной индукции аргиназы к L-аргинину. Предполагается, что аргиназа дрожжей является регулируемым ферментом, обладающим определенными возможностями индуцирования и репрессирования.

Вопросам регуляции активности аргиназы в настоящее время уделяется большое внимание. Подробно изучены многие стороны репрессии и индукции этого фермента у *E. coli* [11, 13] и дрожжей рода *Saccharomyces* [10, 18, 21]. Удалось доказать, что в них аргиназа является регулируемым ферментом и подвергается субстратной индукции.

Выявлены важнейшие стороны взаимосвязи ферментных систем биосинтеза и катаболизма аргинина у пекарских дрожжей. Из многочисленных исследований можно прийти к принципиальному заключению об ингибирующем влиянии аргиназы на активность орнитинтранскарбамиллазы в присутствии аргинина по принципу взаимодействия белка с белком [9, 14—17]. Обнаружены мутанты этих дрожжей, в которых указанные ферменты являются конститутивными.

Вопросы регуляции активности ферментов, в частности, аргиназы недостаточно изучены у дрожжей рода *Candida*, не исследовано наличие ферментов орнитинового цикла, в том числе и аргиназы.

Мы задались целью исследовать наличие аргиназной активности у дрожжей рода *Candida* на примере *C. guilliermondii* 71 и выявить ее некоторые регуляторные свойства. Нами изучалось влияние холода, разных способов голодания, а также природы источников азота на активность аргиназы дрожжей.

Материал и методика. Выращивание дрожжей проводилось по ранее описанным методикам [6]. При использовании различных источников азота количество сульфата аммония и аргинина, внесенное в основную среду, было рассчитано и равно по азоту.

Для получения гомогената дрожжевые клетки разрушались в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Элведжема в присутствии окиси алюминия. В дальнейшем гомогенат подвергался центрифугированию при 7000 об/мин в течение 15 мин. Аргиназная активность определялась в целых клетках и в супернатанте путем инкубирования в глициновом буфере (0,04 М, рН 9,5) в присутствии L-аргинина (50 мМ) и $MnCl_2$ (5 мМ) при 37° в течение 1 час. Общий объем пробы составлял 3,1 мл. Количество

образовавшейся мочевины определялось уреазным способом с последующим определением отщепившегося аммиака микродиффузионным методом [5].

Активность фермента выражалась в мкмоль образовавшейся мочевины на 100 мг сухих дрожжей. Для вычисления удельной активности фермента проводилось определение белка в гомогенатах по методу Лоури [12].

Изучалась аргиназная активность также в дрожжах, гололавших в присутствии 2% глюкозы и на воде в течение 22 час.

Результаты и обсуждение. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что суспензия целых клеток изучаемых дрожжей обладает выраженной аргиназной активностью, составляющей 4,94 мкмоль мочевины на 100 мг сухих дрожжей.

Таблица 1

Аргиназная активность у дрожжей *S. guilliermondii* 71, мкмоль

Целые клетки		Замороженные клетки		Экстракты клеток	
активность на 100 мг	удельная активность	активность на 100 мг	удельная активность	активность на 100 мг	удельная активность
5,6	0,18	50,5	1,68	14,4	4,4
5,6	0,18	31,0	1,03	13,7	5,09
5,8	0,19	30,6	1,02	9,3	4,2
5,2	0,17	28,0	0,93	9,0	3,4
4,1	0,14	29,0	0,96	11,3	2,6
3,95	0,13	33,5	1,11	10,16	2,14
5,1	0,17	27,3	0,91	16,5	3,3
4,18	0,14	48,5	1,61	11,3	1,23
$M \pm m$ 4,94 \pm 0,29	0,16 \pm 0,007	34,8 \pm 3,2	1,15 \pm 0,1	11,9 \pm 0,9	3,29 \pm 0,4

При замораживании (-15°) и оттаивании суспензии дрожжей происходит резкое увеличение активности фермента, а именно активность его достигает 34,8 мкмоль на 100 мг сухих дрожжей, т. е. активируется почти в семь раз. Можно было предположить, что наблюдаемое активирование является результатом разрушения клеток с выходом фермента в инкубационную среду. Однако при центрифугировании (5000 об/мин) подвергнутой замораживанию и оттаиванию суспензии в супернатанте белок не был найден и соответственно активность аргиназы не обнаруживалась. Следовательно, замораживание и оттаивание суспензии не приводили к разрушению клеток, и тем не менее, подобным образом обработанная суспензия клеток обладала повышенной активностью фермента. Можно предположить, что при замораживании и оттаивании повышается проницаемость клеточной мембраны в отношении аргинина.

В опытах с гомогенизированием суспензии дрожжей определенная часть фермента переходит в растворимое состояние, что обнаруживается в супернатанте после центрифугирования гомогената при 7000 об/мин. Установлено, что удельная активность фермента в экстракте дрожжей (супернатанте) достигает 3,29. Следует отметить, что при гомогенизации разрушается небольшая часть клеток суспензии (не более 30%), поэтому выход фермента (в экстракте) бывает небольшим.

Таким образом, удалось доказать, что аргиназа имеется также и у изучаемых нами дрожжей, и это является дополнительным доказательством широкой биологической распространенности этого фермента [2]. Для выяснения его природы (уреотелической или неуреотелической) необходимы дополнительные исследования, в частности установление наличия других ферментов орнитинового цикла.

В следующей серии экспериментов изучалось влияние различных способов голодания на аргиназную активность изучаемых дрожжей.

Приведенные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что при выращивании изучаемых дрожжей в среде с 2% глюкозой в отсутствие источников азота активность фермента подавляется вдвое. А при выращивании дрожжей на воде, т. е. в условиях азотного и углеродного голодания, наоборот, активность фермента заметно повышается, достигая 12,43 мкмоль против 5,43 не голодавших клеток.

Таблица 2

Аргиназная активность у дрожжей *C. guilliermondii* 71 при различных условиях голодания (прирост мочевины в мкмольях на 100 мг сухих дрожжей)

Целые клетки			Экстракты клеток		
основная среда	2% глюкоза	вода	основная среда	2% глюкоза	вода
5,2	2,4	14,0	12,4	2,8	48,0
4,6	2,8	6,2	16,8	2,4	86,0
6,2	4,6	15,2	13,6	2,8	35,5
5,6	2,0	10,4	14,2	2,0	32,0
5,8	2,0	16,0	11,8	1,8	28,8
5,2	2,8	12,8	12,6	2,3	25,0
$M \pm m$ 5,4 \pm 0,2	2,7 \pm 0,3	12,4 \pm 1,4	13,5 \pm 0,7	2,8 \pm 0,1	42,5 \pm 9,3

Аналогичная картина наблюдается при исследовании активности фермента в экстрактах дрожжей, чем отрицается объяснение наблюдаемого увеличения активности фермента при голодании путем изменения проницаемости клеток. Очевидно, при голодании на 2% глюкозе подавление активности аргиназы является результатом катаболитной репрессии глюкозой, подобно описанным явлениям репрессии многих катаболических ферментов бактерий, дрожжей и животных [4].

Что же касается резкого активирования фермента при голодании на воде, по всей вероятности, оно связано с его индукцией. Так, индукция аргиназы при голодании доказана в отношении аргиназы животных тканей [1, 3]. Предполагается, что при голодании повышение концентрации продуктов белкового катаболизма приводит как к усилению биосинтеза фермента, так и к его стабилизации [7]. Подобное объяснение допустимо, по-видимому, и в отношении наблюдаемого активирования активности аргиназы при голодании на воде у изучаемых нами дрожжей. В связи с этим следует упомянуть, что, согласно литературным данным, у некоторых видов дрожжей при голодании (азотном и фосфатном) про-

исходит подавление явления катаболитной репрессии некоторых ферментов [8].

В последующем нами изучалось влияние различных источников азота синтетической среды на активность аргиназы упомянутых дрожжей.

Приведенные в табл. 3 данные свидетельствуют о том, что при выращивании дрожжей в среде, содержащей в качестве источника азота помимо сернокислого аммония и аргинин, наблюдается резкое активирование аргиназы (почти в девять раз). Это является доказательством существования субстратной индукции фермента у изучаемого штамма.

Таблица 3
Аргиназная активность дрожжей *S. guilliermondii* 71 при выращивании в условиях различных источников азота, мкмоль

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$		$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 + \text{аргинин}$		Аргинин	
активность на 100 мг	удельная активность	активность на 100 мг	удельная активность	активность на 100 мг	удельная активность
14,4	4,4	62,2	17,9	97,1	44,7
10,3	1,8	58,7	22,3	95,8	22,3
13,7	5,0	62,3	23,9	87,4	35,4
9,0	3,4	69,7	23,3	95,6	32,8
11,3	2,6	75,7	27,0	97,3	32,4
10,1	2,1	60,0	21,0	116,4	32,3
$M \pm m$ 11,4 \pm 0,8	3,2 \pm 0,5	64,7 \pm 2,6	22,5 \pm 1,2	98,2 \pm 3,9	33,3 \pm 2,9

При выращивании дрожжей на среде с аргинином в качестве единственного источника азота наблюдается наивысшая активность аргиназы (превышающая в 10 раз) по сравнению с культурой, выращенной на обычной синтетической среде. Таким образом, исключение из инкубационной среды сернокислого аммония приводит к дополнительному активированию фермента. Это позволяет заключить, что аммиак, вероятно, является катаболитным репрессором; подобное было доказано и в отношении дрожжей рода *Saccharomyces* [19, 20, 22]. Можно предположить, что в исходной культуре, выращенной на синтетической среде, содержащей сульфат аммония, аргиназа находится в репрессированном состоянии.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что обнаруженный фермент катаболизма аргинина—аргиназа изученных дрожжей, является регулируемым ферментом, обладающим определенными возможностями индуцирования и репрессирования.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 23.VII 1973 г.

Մ. Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ, Գ. Ա. ԳԱՐԻԲԵՂՅԱՆ, Բ. Ա. ՀԱԿՈԲՅԱՆ

ՄԻ ՇԱՐՔ ՀԱՐՑԵՐ *CANDIDA* ՑԵՂԻ ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻՆ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ԿԵՐԱՐԵՐՅԱԼ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է սառեցման, քաղցի տարբեր պայմանների և տարբեր ազոտային աղբյուրների ազդեցությունը խմորասնկերի արգինազային ակտիվության վրա, մասնավորապես *C. guilliermondii* 71 շտամի մոտ:

Հետազոտվող շտամի մոտ հայտնաբերվել է որոշակի արգինազային ակտիվություն: Ցույց է տրվել արգինազայի սուբստրատային ինդուկցիայի առկայությունը L-արգինինի նկատմամբ:

Ենթադրվում է, որ խմորասնկային արգինազան հանդիսանում է կարգավորվող ֆերմենտ, որը օժտված է ինդուկցիայի և ռեպրեսիայի որոշակի հնարավորություններով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бауэрова Я., Шісрм Ф. Биохимия, 21, 397, 1956.
2. Бунятян Г. Х., Давтян М. А. II Всесоюзный биохимический съезд, Ташкент, 1969.
3. Мордашев С. Р., Семин Л. А. Биохимия, 13, 236, 1948.
4. Роуз Э. Химическая микробиология, М., 1971.
5. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вопросы медицинской химии, 8, вып. 5, 1962.
6. Тер-Карапетян М. А., Инджикян С. М. ДАН АрмССР, 43, 2, 1966.
7. Шимке Р. Т. Сб. Регуляторные механизмы клетки, М., 1964.
8. Юркевич В. В., Дауда Хамани. Биологические науки, 11, 1972.
9. Bechet J., Wiame J. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 21, 226, 1965.
10. Bourgeois Claude M., Thouvenot Daniel R. Eur. J. Biochem., 15, 1, 1970.
11. Lavallo R. J. Mol. Biol., 51, 2, 1970.
12. Lowry et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
13. Mc Lellan William L., Vogel Henry J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 4, 1970.
14. Messenguy F. Thesis, University of Brussels, 1969.
15. Messenguy F., Bechet J., Wiame J. M. Arch. Int. Physiol. Biochem., 75, 889, 1967.
16. Messenguy F., Wiame J. M. Arch. Int. Physiol. Biochem. 77, 165, 1968.
17. Messenguy F., Wiame J. M. FEBS Lett, 3, 47, 1969.
18. Middelhoven W. J., Leeuwenhoek A. J. Microbiol. and Serol., 36, 1, 1970.
19. Ramos F., Thuriaux P., Wiame J. M., Bechet J. Eur. J. Biochem., 12, 40, 1970.
20. Thuriaux P. Thesis. University of Brussels, 1970.
21. Thuriaux P., Ramos F., Wiame J. M., Grenson M., Bechet J. Arch. internat. physiol. et biochim., 76, 5, 1968.
22. Wiame J. M. Rep. 10-th Congr. Microbiol., Mexico, 1970.