Կենսաբանություն

УДК 577.1.05

Մ.Ա.ԴԱՎԹՅԱՆ, Մ.Հ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Հ.Հ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ, Գ.Հ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

CANDIDA GUILLIERMONDII ՀՊ–4 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐՈՒՄ ԱԴԵՆԻՆԻ ԴԵԶԱՄԻՆԱՑՈՒՄԸ

Բազմաթիվ հետազոտողների կողմից պարզվել է, որ խմորասնկերը յուրացնում են ազոտի ինչպես օրգանական, այնպես էլ անօրգանական միացությունները [1–3]: Անօրգանականներից լավ յուրացվում են ամոնիումի աղերը [4], նիտրատները և մոլեկուլային ազոտը, իսկ օրգանականներից՝ ամինաթթուները, ամիդները, պեպտիդները:

Ամինաթթուների յուրացումը, անկասկած, սկսվում է նրանց ամինախմբի անջատմամբ՝ այս կամ այն մեխանիզմով: Դա իրականացվում է ինչպես տրանսամինացմամբ, այնպես էլ ամոնիակի անջատումով, որը ներգրավվելով մի շարք կարևոր միացությունների (պուրինային և պիրիմիդինային նուկլեոտիդներ, տրիպտոֆան, հիստիդին, գլյուկոզամին և այլն) կենսասինթեզի մեջ, ապահովում է բջջի նորմալ աճը:

Մեր կողմից հետազոտությունները կատարվել են *Candida guilliermondii ՀՊ–4* կուլտուրայի սուսպենզիայի և հոմոգենատի վրա: Ինկուբացիան իրականացվել է 37^0C-ի պայմաններում, ֆոսֆատային բուֆերում՝ pH 7.4: Որպես ակտիվատոր օգտագործվել է $MgCl_2$-ի լուծույթը (*29մգ 0.2մլ*-ում), որպես սուբստրատ՝ ադենինը:

Հետազոտման մեթոդները: Ամոնիակը որոշվել է միկրոդիֆուզիոն մեթոդով [5]: Այն հիմնված է ամոնիակի և Վինկլերի ռեակտիվի միջև ռեակցիայի գունավորման վրա: Դիֆուզիայի հետևանքով անջատված ցնդող նյութը՝ NH_3-ը, միանում է ձողիկի մակերեսին գտնվող ադսորբող հեղուկ H_2SO_4-ի 0.1 N լուծույթի հետ՝ առաջացնելով ամոնիումի սուլֆատ: Գունավորման ուժգնությունը չափում են ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով (ՖԷԿ–56): NH_3-ի քանակը որոշում են $(NH_4)_2SO_4$-ի հայտնի խտությունով ստացված ստանդարտ կորով, ֆերմենտի ֆրակցիոնացումը իրականացվել է գելֆիլտրացիայի մեթոդով՝ սեֆադեքս G–100-ով [6]: Սպիտակուցը որոշվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով (ՍՖ–4):

Արդյունքներ և քննարկում: Գրականության մեջ քիչ են տվյալները խմորասնկերում ամինաթթուների, ազոտային հիմքերի, նուկլեոտիդների դեզամինացման պրոցեսների առանձին ֆերմենտատիվ համակարգերի վերաբերյալ:

Որոշ օրգանիզմներում [7] ադենինը հիդրոլիտիկ ճանապարհով ադենինդեզամինազ ֆերմենտի ազդեցությամբ ճեղքվում է հիպոքսանթինի և ամոնիակի: Ֆերմենտն ունի սահմանափակ տարածում: Ամոնիակի առաջացման և չեզոքացման մեխանիզմներում դեռևս չպարզաբանված հարցեր կան:

Ուսումնասիրվել է *Candida guilliermondii ՀՊ–4* խմորասնկերում ադենինի տարբեր կոնցենտրացիաների պայմաններում ֆերմենտի առավելագույն դեզամինացման կինետիկան: Այս կուլտուրայի բջջային հոմոգենատում սուբստրատի կոնցենտրացիայի մեծացման հետ փոխվում է անջատվող NH_3-ի քանակությունը և 30*մկմոլ*-ի դեպքում ֆերմենտը ցուցաբերում է իր առավելագույն ակտիվությունը:

Այնուհետև հետաքրքիր էր պարզել ադենինը դեզամինացնող ֆերմենտի ներբջջային լոկալիզացիան: Այդ նպատակով հոմոգենատը ենթարկվել է ցենտրիֆուգման 6000*g* և 9000*g* արագացումներով: Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշվել է ինչպես ամբողջական բջիջներում, այնպես էլ հոմոգենատում, նստվածքում և վերնստվածքում:

Անջատված NH_3-ի քանակությունից (աղյուսակ 1) կարելի է ենթադրել, որ ադենինը ամբողջական բջիջների մեջ չի ներթափանցում, այդ պատճառով էլ այնտեղ ադենինդեզամինազ ֆերմենտի ակտիվություն չի հայտնաբերված:

Աղյուսակ 1

Ամոնիակի անջատումը Candida guilliermondii ՀՊ–4 կուլտուրայի ամբողջական բջիջներում և հոմոգենատում (γ 100մգ կենսազանգվածում)

Ամբողջական բջիջ	Հոմոգենատ	6000*g*		9000*g*	
		վերնստ.	նստվածք	վերնստ.	նստվածք
0	4.98	4.50	0	4.72	0

Ադենինը դեզամինացնող ֆերմենտի բարձր ակտիվություն է հայտնաբերվել վերնստվածքում հոմոգենատը ինչպես 6000*g*, այնպես էլ 9000*g*-ով ցենտրիֆուգելուց հետո՝ 4.5γ և 4.72γ 100*մգ* կենսազանգվածում համապատասխանաբար:

Ուսումնասիրությունների հաջորդ էտապը նվիրված է Mn^{+2} և Zn^{+2} երկվալենտ իոնների տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությանը ադենինդեզամինազ ֆերմենտի ակտիվության վրա: Համաձայն ստացված տվյալների (աղյուսակ 2)՝ նշված իոնները արգելակում են ֆերմենտի ակտիվությունը տարբեր չափով՝ կախված նրանց կոնցենտրացիաներից:

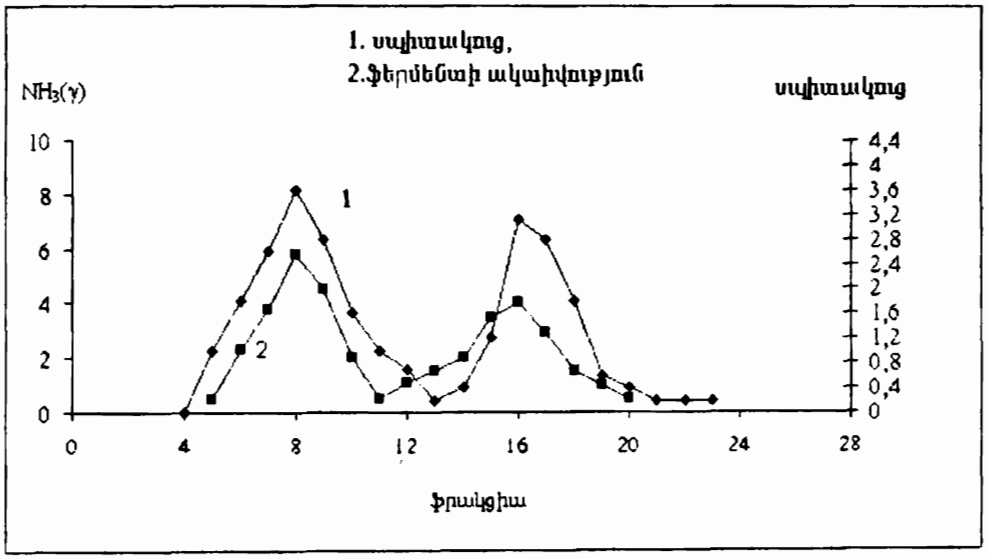
Mn^{+2} իոնի ցածր կոնցենտրացիաները թույլ ընկճող ազդեցություն են ունենում ֆերմենտի ակտիվության վրա: Կոնցենտրացիայի բարձրացման հետ մեծանում է նրա ընկճող ազդեցությունը, $6.25 \cdot 10^{-4}M$-ի դեպքում հասնելով առավելագույնի, երբ ամբողջական հոմոգենատում ֆերմենտի ակտիվությունը կազմում է 7.8γ 100*մգ* կենսազանգվածում: Սակայն նույնը չի կարելի ասել $ZnCl_2$-ի վերաբերյալ: Եթե $MnCl_2$-ի $0.62 \cdot 10^{-5}M$ կոնցենտրացիայի

դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը 7.32γ է, ապա $ZnCl_2$-ի նույն կոնցենտրացիայի դեպքում այն 6.0γ է, այսինքն, այստեղ դիտվում է ֆերմենտի ակտիվության որոշակի ընկճում, որը $6.25 \cdot 10^{-4} M$ կոնցենտրացիայի դեպքում արդեն հասնում է 0.9γ-ի:

Աղյուսակ 2

Տարբեր իոնների ազդեցությունը Candida Guilliermondii ՀՊ–4 խմորասնկերում ադենինդեզամինազ ֆերմենտի ակտիվության վրա (γ 100մգ կենսազանգվածում)

Երկվալենտ մետաղների կոնցենտրացիան, *M*	Mn^{+2}		Zn^{+2}	
	γ	%	γ	%
$0.62 \cdot 10^{-5}$	7.32	93.84	6.00	76.92
$1.25 \cdot 10^{-5}$	6.00	76.92	4.60	58.97
$1.25 \cdot 10^{-4}$	4.46	57.18	3.30	42.31
$2.50 \cdot 10^{-4}$	3.00	38.46	1.20	15.38
$6.25 \cdot 10^{-4}$	1.88	24.10	0.90	11.54



C guilliermondii ՀՊ–4 խմորասնկերի ադենինդեզամինազի իզոէնզիմային սպեկտրը:

Candida guilliermondii ՀՊ–4 խմորասնկերում ադենինդեզամինազ ֆերմենտի մասնակի մաքրման նպատակով իրականացվել է չափազատում գելֆիլտրացիայի մեթոդով: Արդյունքում ստացվել է (տես նկարը) երկու մաքսիմում սպիտակուցների համար, որոնք օժտված են ադենինը դեզամինացնող ֆերմենտային ակտիվությամբ:

Կենսաքիմիայի ամբիոն *Ստացվել է 11.03.2002*

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. **Инджикян С.М.** Усвоение аланина, валина, лейцина и некоторых их гомологов дрожжами рода *Candida*: Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол.наук. Ер., 1969.
2. **Коновалов С.А.** – Микробиология, 1949, т. 18, вып. 4.

3. **Макарова Е.И.** Влияние источников азота и витаминов на синтез биомассы и состав аминокислот у дрожжей рода *Candida*: Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Ер., 1963.
4. **Тер-Карапетян М.А., Инджикян С.М** – ДАН Арм. ССР, 1966, т. 43, № 2.
5. **Zelingson D., Zelingson H.** – J. lab. clin. Med., 1951, v. 38, p. 324.
6. **Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В.** Руководство к практическим занятиям по биологической химии. М., 1988.
7. **Киритейне Б.Е., Львов Н.П., Любимов В.И., Кретович В.Л.** – Докл. АН СССР, 1968, т. 181, № 3.

М.А. ДАВТЯН, М.А. ХАЧАТРЯН, Г.А. СЕМЕРДЖЯН, Г.Г. СЕМЕРДЖЯН

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АДЕНИНА У ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII НП–4*

Резюме

Исследованы процессы дезаминирования аденина в гомогенатах дрожжей *Candida guilliermondii НП–4*, локализация фермента, а также влияние двухвалентных ионов Mn^{+2} и Zn^{+2} на активность действующей в клетках вышеуказанной культуры аденазы.

Относительно высокая активность фермента проявляется при концентрации 30*мкмоль*. Методом гель-фильтрации осуществлена частичная очистка фермента. Обнаружены два пика белков, которые обладают аденин-дезаминирующей ферментативной активностью.

M.A. DAVTYAN, M.A.KHACHATRYAN, G.A.SEMERGYAN, G.G.SEMERGYAN

ADENIN DESAMINATION IN YEASTS *CANDIDA GUILLIERMONDII NP–4*

Summary

The process of adenin desamination in homogenates of yeasts *C. guilliermondii NP–4,* the localisation of enzyme, as well as by influence of bivalent ions Mn^{+2} and Zn^{+2} on the activity of adenaze of the above menthioned culture have been studied.

Comparatively high activity of the enzyme is shown at 30 mcmol concentration. By method of hel-filtration the partial purification of enzyme was realized . Two protein peaks to possess the adenine desamination enzymatic activity have been found.