

О дезаминировании аминокислот оксидазой L-аминокислот гриба *Aspergillus niger* R-3

Оганесян София Петровна,
Григорян Арен Рафаелович,
Габриелян Гоар Аршалуйсовна
Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии, Республика Армения
biology@ysu.am
03.00.04

Аннотация: Пероксисомы гриба *Aspergillus niger* R-3 выполняют дезаминирование аминокислот путем оксидаза L-аминокислот. Механизм трансдезаминирования в пероксисомах по глутаматдегидрогеназу и трансаминазу отсутствует.

Ключевые слова: оксидаза L-аминокислот, глутаматдегидрогеназа, пероксисома, трансдезаминирование

Deamination of Aminoacids by L-Aminoacids' Oxidase of Fungus *Aspergillus Niger* R-3

Hovhannisyan Sofia Petrobna,
Grigoryan Aren Rafaelovich,
Gabrielyan Goar Arshaluisovna
Yerevan State University, Department of Biochemistry,
The Republic of Armenia

Abstract. Peroxisomes of Fungus *Aspergillus niger* R-3 perform deamination of aminoacids by oxidase of L-aminoacids. Mechanism of transdeamination in peroxisomes by glutamate dehydrogenase and transaminase is absent.

Key words: oxidase of L-aminoacids, glutamate dehydrogenase, peroxisome, transdeamination

Механизмы нейтрализации и удаления аммиака в интактных клетках обеспечивают ферменты, катализирующие дезаминирование аминокислот, в частности, L-аминокислотные оксидазы.

Однако многие вопросы, касающиеся проявления активности L-аминокислотной оксидазы, остаются еще полностью не выясненными. Неоднозначны мнения относительно механизмов образования и удаления аммиака, как конечного продукта дезаминирования аминокислот [4].

Известно, что в гомогенатах печени и других органов не происходит дезаминирование аминокислот, хотя в них присутствуют все ферменты дезаминирования аминокислот (глутамат-дегидрогеназа-ГДГ, аланин-дегид-

рогеназа АДГ, оксидазы L-аминокислот), а также трансаминазы, позволяющие вместе с глутаматдегидрогеназой дезаминировать аминокислоты механизмом трансдезаминирования [2,3].

Предыдущими исследованиями нашей лаборатории экспериментально было доказано, что причиной указанного явления является накопление свободного аммиака в гомогенате вследствие разрушения плазматической мембраны клеток. Известно, что ГДГ имеет низкое значение константы равновесия, не позволяющее функционировать ферменту в условиях повышенного уровня свободного аммиака в среде. В соответствии с этими соображениями, при создании определенных условий связывания вновь образованного ам-

миака из аминокислот, становится возможным дезаминирование аминокислот и в гомогенатах. В частности, при связывании аммиака путем его вовлечения в биосинтез карбамоилфосфата и цитруллина добавлением в инкубационную среду митохондриальных препаратов карбамоилфосфат-синтетазы и орнитинтранскарбамоилазы печени млекопитающих, происходит дезаминирование аминокислот в гомогенатах [4, 5]. Таким образом, было показано, что прекращение дезаминирования аминокислот при гомогенизации органов является результатом разрушения клеточных структур, приводящего к нарушению механизмов удаления образовавшегося при дезаминировании аминокислот аммиака и его накоплению в инкубационной среде. Это мнение подкрепляется еще и тем, что в срезах печени, в которых сохранены клеточные структуры, происходит дезаминирование аминокислот. Предыдущие наши исследования показали, что сохранение целостности мембран субклеточных структур обеспечивает дезаминирование аминокислот [8].

В частности показано, что пероксисомы осуществляют дезаминирование аминокислот под действием оксидаз L-аминокислот [1, 10, 11]. Очевидно пероксисомы создают благоприятное для проявления активности окружение фермента (высокая концентрация фермента и кофермента, а также непрерывное удаление аммиака), позволяющее функционирование механизмов дезаминирования аминокислот [7].

Было показано, что экстракты плесневого гриба *Aspergillus niger* не обладают активностью L-аминокислотной оксидазы, тогда как из 4-х выделенных фракций три обладали активностью данного фермента [8]. Естественно, возникает вопрос, существуют ли L-аминокислотные оксидазы, или же в указанных условиях эксперимента аммиакообразовательный процесс является результатом функционирования механизма трансдезаминирования аминокислот при участии глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и трансаминаз.

С целью выяснения этого вопроса нами исследовалась возможность дезаминирова-

ния аминокислот механизмом трансдезаминирования путем последовательного ингибирования ГДГ-зы и трансаминаз.

Материал и методика

Объектом исследования служил плесневой гриб *Aspergillus niger* R-3— продуцент лимонной кислоты. Культуру гриба выращивали на синтетической среде Ролена. В качестве источника азота использовали L-аланина. Посев проводили в среде объемом 100 мл рН 7.0. Культивирование— в термостате при 37 °С в течение 4-х сут.

Для получения пероксисомальной фракции 1 мл бесклеточного экстракта подвергался изопикническому разделению в градиенте 0.5 М сахарозы и 15% перколла (“Pharmacia Fine Chemical AB”, Братислава).

2 мл указанной смеси центрифугировали при 12 000—14 000g в течение 90 мин при 8—10 °С, в результате были разделены пероксисомальные три фракции, которые идентифицировали с помощью маркерных ферментов-каталазы, оксидазы D-аминокислот [6—8].

Для определения активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ), аланиндегидрогеназы (АДГ) 1 мл плесневого экстракта или пероксисомальную фракцию, содержащую 0,6—1 мг белка, инкубировали в течение 1 ч в присутствии 30 мкмоль α-кетоглутаровой кислоты, 27 мкмоль углекислого аммония, 2,5 мкмоль НАДН, общий объем инкубационной среды доводили до 3 мл 0,1 М фосфатным буфером при рН 7,4. Аланин дегидрогеназную активность определяли аналогичным образом, лишь вместо α-кетоглутарата была использована пировиноградная кислота (ПВ) в той же конечной концентрации. Ферментативную активность определяли по убыли НАДН оптической плотности при 340 нм. Контролями служили реакционные смеси, не содержащие кетокислот или аминокислот.

Для измерения активности оксидазы D- и L-аминокислот (КФ 1.4.3.2; КФ 1.4.3.3) во фракциях, содержащих пероксисомы, пробу инкубировали при 38 °С в течение 90 мин в 0,05 М K/Na-фосфатном буфере, рН 8,3,

Таблица 1

ГДГ-азная и АДГ-азная активности субклеточных фракций *Aspergillus niger* R-3

	Активность фермента					
	ГДГ			АДГ		
Кофермент/Фракции	NAD	NADH	%	NAD	NADH	%
Надосадок (700 г)	0	2,36 0 ± 0,1	100	0	2,2 ± 0,2	100
Фракции						
I. Митохондрии	0	0,7 ± 0,2	30	0	0,32 ± 0,03	15
II. Пероксисомы	0	0,9 ± 0,3	40	0	1,1 ± 0,1	50
III. Пероксисомы	0	1,2 ± 0,2	52	0	1,3 ± 0,1	59
IV. Пероксисомы Цитозоль	0	Следы		Следы		

в присутствии 10 мкМ L-аминокислот. Реакцию останавливали 20 %-ной ТХУ, центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли аммиак микродиффузионным методом Зеллингсона в модификации Силаковой [9]. Активность фермента выражали в мкмоль аммиака на 1 г сырого мицелия. Белок определяли по методу Лоури.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов были исследованы активности ГДГ-зы и (АДГ) в пероксисомальных фракциях *Aspergillus niger* R-3.

Приведенные в табл. 1 данные четко показывают, что в пероксисомах не функционирует трансдезаминирование аминокислот, так как ГДГ не проявляет активность. С другой стороны, в указанных условиях происходит аминирование кетоглутарата при использовании НАДН. Таким образом, как в гомогенате, так и в субклеточных фракциях существует ГДГ, которая проявляет лишь способность аминировать L-кетоглутарат, но не дезаминировать глутаминовую кислоту, вследствие ингибирования ГДГ в присутствии даже незначительных концентраций аммиака. Следовательно, наблюдаемое дезаминирование аминокислот в пероксисомальных фракциях гриба *Aspergillus niger* R-3 скорее всего осуществляется действием оксидаз L-амино-

кислот. Наши исследования также доказывают, что в пероксисомах содержится и ГДГ, которая функционирует в присутствии аммиака лишь в сторону аминирования кетоглутарата. Для окончательного решения вопроса о наличии L-аминокислотной оксидазы в пероксисомах в следующей серии экспериментов исследовали дезаминирование аминокислот в условиях ингибирования трансдезаминирования аминокислот. Для этого активность ГДГ-зы

Таблица 2

Влияние гуанозинтрифосфата (ГТФ) на активность оксидазы D- и L-аминокислот *Aspergillus niger* R-3

	Активность фермента (мкмоль NH ₃ на 1 г мицелия)	
	+ГТФ	-ГТФ
Надосадок (700 г)		
L-аланин	0	0
L-метионин	0	0
Пероксисомальная II фракция		
L-аланин	16,3 ± 0,5	16 ± 0,5
L-метионин	13 ± 0,3	13 ± 0,4
Пероксисомальная III фракция		
L-аланин	14 ± 0,1	14 ± 0,2
L-метионин	12 ± 0,3	12 ± 0,1

Таблица 3

Влияние гидроксиламина (NH₂OH) на активность оксидазы L-аминокислот *Aspergillus niger* R-3

	Активность фермента мкмоль NH ₃ на 1 г мицеллия	
	+NH ₂ OH	-NH ₂ OH
Надосадок (700 г)		
L-аланин	0	0
L-метионин	0	0
Пероксисомальная II фракция		
L-аланин	14,8 ± 0,2	14,8 ± 0,1
L-метионин	12,1 ± 0,1	12,2 ± 0,1
Пероксисомальная III фракция		
L-аланин	12 ± 0,1	12 ± 0,2
L-метионин	10,3 ± 0,1	9,3 ± 0,5

ингибировали гуанозинтрифосфатом (ГТФ), а трансаминазную активность — гидроксиламином (NH₂OH).

В табл. 2 приведены результаты эксперимента по изучению оксидазы аминокислот в присутствии ингибитора ГДГ-зы, то есть в условиях ингибирования трансдезаминирования.

Данные таблицы ясно показывают, что ингибирование трансдезаминирования аминокислот ГТФ-ом не отражается на процесс деаминации аминокислот (L-аланина, L-метионина).

Данные табл. 3 показывают, что и при ингибировании трансаминаз добавлением гидроксиламина также не отражается на интенсивности деаминации аминокислот. Та-

ким образом, ингибирование процесса трансдезаминирования аминокислот специфическими ингибиторами глутаматдегидрогеназы и трансаминаз не отражается на процессе деаминации аминокислот в пероксисомальных фракциях, что может быть следствием функционирования в пероксисомах лишь оксидазы L-аминокислот.

Список литературы

1. Антоненков В.Д., Герасимов А.П. Энзимологическое исследование структурной организации матрикса пероксисом печени крыс // Цитология. 1978. т-xx,х Т. 6. С. 676—680.
2. Браунштейн А.Е., Бычков С.П. Бесклеточная ферментная модель дегидразы L-аминокислот (K-дезаминазы) // ??????. 1944. № 5. С. 337—359.
3. Браунштейн А.Е., Крицман П.Г. Образование и распад аминокислот путем интермолекулярного переноса аминогруппы // Биохимия. 1937. № 2. С. 242—259.
4. Давтян М.А. Эволюционные аспекты образования и нейтрализации аммиака // III Сисакяновские чтения. Ереван, Армения. 2005. С. 106—142.
5. Давтян М.А., Айрапетян Н.Н. Взаимосвязь деаминации аминокислот и биосинтеза цитрулина в органах крыс // Биол. журнал Армении. 1998. Т. 49 хт. С. 84—89.
6. Оганесян С.П., Давтян М.А., Хандога Я. Энзимологическое исследование Asp. niger R-3 // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2221—2225.
7. Оганесян С.П. Аминокислотные оксидазы и их взаимосвязи с пероксисомами: Автореф. дис. Ереван, Армения, 2001.
8. Папоян А.Р., Оганесян С.П., Давтян М.А. Активность оксидазы L-аминокислот у гриба *Aspergillus niger* R-3 в зависимости от источника азота в среде // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 3. С. 297—300.
9. Силакова А.И., Трум Г.П., Являкова А. Вopr. мед. // Химия 1962. № 8. С. 538—545.
10. Blanchard M., Creen D. E. L-aminoacid oxidase in animal tissue I // Biol. Chem. 1944. V. 155. P. 421—440.
11. De Duve C, Baudhuin P. // Physiol. Rev. 1966. V. 46. P. 323—357.