

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԴԱՎԹՅԱՆ ՀՈՒՓՄԻՄԵ ՄԻՍԱԿԻ

Aspergillus niger R-3 ԲՈՐԲՈՍԱՍՆ ԿԵՐՈՒՄ L-ԱՄԻՆԱԹՎԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱԶԻ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԴՐՄԵՎՈՐՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.04 – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
զիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2014

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ДАВТЯН РИПСИМЕ МИСАКОВНА

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ L-АМИНОКИСЛОТНОЙ
ОКСИДАЗЫ У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ *Aspergillus niger R-3*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04- Биохимия

Е Р Е В А Н 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

Կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Ս.Պ. Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կենս.գիտ.դոկտոր,պրոֆեսոր
Ռ.Գ. Քամայյան

Կենս. գիտ. դոկտոր,պրոֆեսոր
Հ.Ռ. Վարդապետյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Հ.Բունիաթյանի անվան
Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. մայիսի 2-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2014թ. մարտի 31-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
Կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ

Ս.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор биол. наук, профессор
С.П. Оганесян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук, профессор
Р.Г. Камалян

доктор биол. наук, профессор
Г.Р. Вардапетян

Ведущая организация:

Институт биохимии НАН РА

Защита диссертации состоится 2-го мая 2014г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета ВАК РА Биофизики 051 при Ереванском государственном университете (0025,Ереван, ул. АлекаМанукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 31-го марта 2014г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,

кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

Актуальность и обоснование темы. Общеизвестно, что клетки всех организмов вырабатывают аммиак в качестве конечного продукта азотистого катаболизма, главным образом аминокислот. Существует ряд механизмов дезаминирования аминокислот, главным среди которых является окислительное дезаминирование. Открыты почти все ферменты, дезаминирующие аминокислоты, что является большим достижением в современной науке, тем не менее многие вопросы, связанные с механизмами дезаминирования аминокислот, остаются открытыми. Наиболее важными являются следующие ферменты:

1. Оксидаза L-аминокислот, которая обладает широкой субстратной специфичностью и является ФМН и ФАД зависимой [Krebs 1932].
2. Глютаматдегидрогеназа, обнаруженная у всех организмов и клеток, является НАД и НАДФ зависимой [Krebs 1935].
3. Аланиндегидрогеназа, которая катализирует дезаминирование аланина окислительным механизмом, коферментом является НАД, обнаружена в печени, почках и сердечной мышце [Березовская 1958; 1960; 1962; Пятницкая 1960; 1960а; Давтян 1962; 1962а].

В настоящее время интерес к L-аминокислотной оксидазе резко возрос в связи с открытием фактов участия фермента в биосинтезе ряда ценных лекарств. В частности, оксидаза L-аминокислот бактерий *Lechevalieria aerocolonigenes* дезаминирует триптофан с образованием α -кето- β -индолилпропионовой кислоты, затем образованный 7-хлор триптофан включается в биосинтез ребекамицина (антибиотик) [Nishizawa et al., 2005]. Змеиный яд *Calloselasma rhodostoma*, который содержит L-аминокислотную оксидазу и множество различных ферментов, является источником для получения лекарства Арвин. [Daltry et al., 1996; Markland 1998]. В литературе имеется множество сообщений относительно открытия многих белков и различных других новых соединений в змеиных ядах, которые исследуются с целью их использования в качестве источников других лекарственных соединений. Кроме этого показано, что яды змей обладают антибактериальным, противоопухолевым, противовирусным, антикоагулянтным и другими свойствами, которые могут быть использованы для медицинских целей [Okubo et al., 2012; Naumann et al., 2011; Fujisawa et al., 2009; Tonismagi et al., 2006]. Следует подчеркнуть, что успех намеченных нами исследований во многом зависит от количества сырья, используемого для получения ферментов, лекарственных препаратов и других ценных соединений. Следовательно, целесообразно усовершенствовать способы индукции этих соединений. Для стимулирования индукции ферментов разные исследователи использовали биотин, урканиновую кислоту [Schwartzkopff et al., 1963], гидролизат дрожжей [Давтян, Багдасарян, 1985], разные L- и D- аминокислоты [Singh et al., 2009] и прочее. В ранних исследованиях нашей лаборатории в первую очередь исследовались возможности индукции L-аминокислотной оксидазы перекисью водорода, учитывая, что дезаминирование аминокислот под влиянием L-аминокислотной оксидазы сопровождается производством перекиси водорода, которая является обязательным компонентом живых клеток, молниеносно двусторонне преодолевает биологические

мембраны и играет важную роль в защитных и окислительных биологических реакциях. Кроме этого, появляются новые аргументы относительно того, что при низких концентрациях перекись водорода (H_2O_2) функционирует в качестве сигнального агента у высших организмов [Stone, Yang, 2006]. Возникает вопрос о механизмах действия H_2O_2 на клеточные функции. Большой интерес представляет вопрос о характере акцептора перекиси водорода, который так интенсивно активирует многие биохимические процессы, и в том числе, ферменты.

Данные литературы свидетельствуют в пользу того, что в клетках имеются рецепторы, которые обеспечивают сигнализацию о необходимости передачи соответствующей информации вышестоящим эффекторным структурам.

Цель и задачи исследования. В ранних работах нашей кафедры было показано, что перекись водорода, добавленная в питательную среду, дозозависимо стимулирует L-аминокислотную оксидазу *Aspergillus niger R-3*, причем высокая активность фермента проявляется при низких концентрациях перекиси водорода [Оганесян и др., 2010]. Перед нами была поставлена цель сделать более продуктивной индукцию L-аминокислотной оксидазы с помощью H_2O_2 при добавлении ее к инкубируемым пробам. Следует подчеркнуть, что L-аминокислотная оксидаза, будучи ФАД зависимым ферментом, наряду с катализируемой реакцией дезаминирования, параллельно вырабатывает перекись водорода. Перед нами возник вопрос: имеют ли возможность активироваться перекисью водорода другие ферменты, которые в течение каталитического акта не продуцируют перекись водорода.

Следующий важный вопрос, который подлежит изучению, является выяснение механизма активирования L-аминокислотной оксидазы перекисью водорода. При этом следует подчеркнуть, что очевидно, существуют специальные рецепторы в отношении перекиси водорода. В научной литературе имеются некоторые намеки об обладании рецепторной функции сульфгидрильных групп. Перед нами была поставлена также задача исследовать участие сульфгидрильных групп в процессах активации перекисью водорода.

Для выяснения нами поставленных вопросов у плесневых грибов *Aspergillus niger R-3* исследования проводились по следующим направлениям:

- Исследовали активирование оксидазы L-аминокислот у плесневых грибов *Aspergillus niger R-3* путем периодического добавления перекиси водорода к инкубируемым пробам.
- По методу, разработанному Браунштейном и его сотрудниками, частично очищали ферменты орнитинового цикла и далее исследовали влияние H_2O_2 на их активность путем его добавления в питательную среду.
- Исследовали влияние соединений, содержащих сульфгидрильные группы каким является глутатион, на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов *Aspergillus niger R-3*, активированной перекисью водорода.
- Исследовали активность L-аминокислотной оксидазы, активированной перекисью водорода, в присутствии и отсутствии ПХМБ, как реагента связывающего сульфгидрильные группы.

Научная новизна и практическая ценность работы – Впервые нам удалось показать, что индуцируется оксидаза L-аминокислот у исследуемых плесневых грибов *Aspergillus niger R-3* путем добавления H₂O₂ не только в питательную среду, но и в инкубируемые пробы. Показано также, что интенсивность индукции во многом зависит от внесенной в инкубационную среду аминокислоты. Так, если инкубация проводится в присутствии L-аланина или L-метионина степени активирования L-аминокислотной оксидазы различны. Индукция L-аминокислотных оксидаз имеет большое практическое значение, в частности они используются для получения кетокислот соответствующих аминокислот, активных противоопухолевых, антибактериальных, противовирусных лекарств (ребекамицин, арвин) [Nishizawa et al., 2005; Markland 1998] и делают поиск новых лекарств более эффективным [Okubo et al., 2012; Naumann et al., 2011; Fujisawa et al., 2009; Tonismagi et al., 2006].

Нами было установлено влияние перекиси водорода на активность ферментов орнитинового цикла у плесневых грибов. Полученные данные четко показывают, что перекись водорода при сравнительно низких концентрациях стимулирует все ферменты орнитинового цикла почти в равной степени. Таким образом, ценным является вывод относительно того, что на подобие с ферментом L-аминокислотной оксидазы, генерирующей в ходе биохимической активности перекись водорода, под влиянием перекиси водорода также стимулируются ферменты, не генерирующие перекись водорода. Это свойство значительно расширяет сферу биологического влияния перекиси водорода.

Показано, что ПХМБ в концентрации 1-10 мкМ линейно ингибирует L-аминокислотную оксидазу у плесневых грибов *Aspergillus niger R-3*. Вероятно, блокировка SH групп ПХМБ-ом лишает фермента возможности индуцироваться перекисью водорода. Значит, L-аминокислотная оксидаза является тиоловым ферментом. Нам удалось показать, что глутатион стимулирует L-аминокислотную оксидазу. Подобное поведение глутатиона, очевидно, можем расценить как защитный акт от первоначально высоких концентраций ПХМБ. Выявленные нами эти сложные взаимоотношения между ПХМБ, глутатионом, перекисью водорода и оксидазой L-аминокислот, очевидно, будут учтены как клиницистами, так и физиологами.

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждались на семинарах кафедры биохимии ЕГУ, а также докладывались на объединенном конгрессе: 22nd IUBMB and 37th FEBS Congress, Seville, Spain, Sept. 4-9, 2012.

Публикации: По теме диссертации опубликованы 4 научные работы.

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, литературного обзора, объекта и методов исследований, экспериментальной части заключения, выводов и списка литературы насчитывающего 263 наименований. Диссертация содержит 104 страницы, 8 рисунков, 11 таблиц.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследований служил плесневой гриб *Aspergillus niger* R-3, который используется в производстве лимонной кислоты [Журавский 1953] и приведен из института Микробиологии Санкт-Петербурга.

Состав питательной среды роста грибов– Гриб выращивали в синтетической среде Ролена, 100 мл которого (рН-7.0) содержат следующие компоненты, которые растворяли в 100 мл водопроводной воды: глюкоза (Sigma) – 2 г., K_2HPO_4 (Sigma) – 0,05 г., $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)– 0,005 г, MgSO_4 (Sigma) -0,05 г , L-аланин -0.4 г (Renal, Hungary) в качестве источника азота.

Посев производился в 100 мл среды (рН-7.2, 42°C) при стерильных условиях, **выращивание**– при 32°C в ультратермостате (УТ-15) 4 дня.

Приготовление дрожжевого экстракта -4-х дневную выращенную культуру *Asp. niger* R-3 обезвоживали на фильтровальной бумаге, взвешивали и подвергали гомогенизации в дистиллированной воде в гомогенизаторе типа Поттера-Эльведгема (6 минут) 10% гомогенат центрифугировали (центрифуга СЛ-1) со скоростью (3000 об/мин) 600-700г при температуре 0-4°C 10 минут для удаления ядерной фракции.

Определение L-аминокислотной оксидазы– к полученному плесневому экстракту объемом 1,0 мл добавляли 0,1 М К/Na-фосфатного буфера (рН 8,3) и инкубировали пробы при 37°C в течение 90 минут в присутствии 10 мкмоль L-аланина (Renal, Hungary) или L-метионина (Renal, Hungary) при постоянном помешивании. Реакцию останавливали добавлением 0,2% 2,4-динитрофенилгидразина, затем 0,1 N NaOH и определяли количество кетокислоты.

Определение кетокислоты–При дезаминировании использованных L-аланина и L-метионина соответственно образуются пируват и α -кето- γ -метилбутират, которые в щелочной среде с динитрофенилгидразином образуют гидразоны красно-фиолетового оттенка. Интенсивность окраски измеряли после 5 минутной остановки реакции при длине волны 440 нм (ФЭК-56) [Baudhuin, De Duve, 1964]. Активность фермента выражали в мкмольх образовавшейся кетокислоты на 1 г. мицелия.

Определение активности карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранс-карбамоилазы - Активности ферментов определяли по методу Браунштейна и сотр. [Браунштейн и др. 1956]. Клетки разрушали в изотоническом растворе KCl. В опытную пробу вносили: 0.5 мл 5% гомогената, АТФ-10мкМ, MgSO_4 -35мкМ, L-орнитин 20 мкМ, L-глу -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, рН 7.2. Общий объем смеси составлял 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.

Определение цитруллина - цитруллин определяли колориметрическим методом Арчибалда [Archibald, 1944]. 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 , MnSO_4) и 0.25 мл 3% раствора диацетилмонооксида. Пробирки встряхивали,

кипятили в темноте в течение 45 минут. Пробы охлаждали в течение 10 минут и колориметрировали на СФ (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA) при длине волны 478 мкм против контроля на реактивы.

Арсенолиз цитруллина 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.

Определение аммиака определяли микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силаковой и сотрудников [Силакова и др. 1962]. Принцип метода заключается в вытеснении аммиака с помощью насыщенного раствора КОН из исследуемой жидкости, находящейся в герметически закупоренных специальных сосудиках, вращающихся на ротаторе со скоростью 60-70 об/мин и адсорбции аммиака на стеклянных палочках, предварительно смоченных в 1 N серной кислоте. Через 40 мин палочки промывали дистиллированной водой и в элюате определяли аммиак колориметрическим методом, с помощью реактива Винклера. Интенсивность окраски определяли на ФЭК-56 У-42 при длине волны 400 мкм. При составлении калибровочной кривой использовали стандартные растворы $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Определение аргининосукцинатсинтетазной и аргининосукцииназной активности- определяли методом Ратнер и Паппас [Ratner, Pappas, 1949]. 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-20мкМ, 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 [Archibald, 1944].

Определение мочевины В пробирку со шлифованной пробкой наливали 1 мл надосадочной жидкости, 2,5 мл кислотной смеси и 0,25 мл 3% раствора ДАМО. Пробирки встряхивали, пробы кипятили в течение 45 минут. Далее охлажденные пробы колориметрировали на СФ (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA) при длине волны 478 мкм против контроля на реактивы.

Определение аргиназной активности –аргиназную активность определяли методом Ратнер с небольшими изменениями [Rathner et al., 1949]. К 1мл исследуемого экстракта плесневых грибов добавляли 5 мкМ MnCl_2 /в 0.2 мл воды/, 1.4 мл 0.04 М глицинового буфера /pH-9.5/ и 50 мкМ L-аргинина /в 0.4 мл глицинового буфера/. После часовой инкубации реакцию останавливали добавлением 1 мл 15% ТХУ, спустя 20 минут центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли мочевины. Активность фермента выражалась в микромолях образовавшейся мочевины на 1 г мицелия.

Статистическая обработка результатов исследований- осуществляли применяя метод разниц и достоверности Стьюдент-Фишера [Гиурман 1997]. В экспериментах по оптимизации среды повторность определения параметров была 5-7 кратная. Достоверность различий средних (p) величин определяли с помощью t-критерия Стьюдента на 5% уровне значимости [Рокицкий, 1973].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 АКТИВИРОВАНИЕ L-АМИНОКИСЛОТНОЙ ОКСИДАЗЫ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ *Aspergillus niger R-3*

Жизнедеятельность клеток сопровождается непрерывным выделением аммиака. Выяснено, что основным источником аммиака являются аминокислоты, которые в основном образуются при катаболизме белков. Что касается вопроса о механизмах аммиакообразования из аминокислот, то должны подчеркнуть, что большим научным достижением является открытие в настоящее время всех ферментов дезаминирующих аминокислоты. Показано, что важнейшими ферментами дезаминирования аминокислот являются глутаматдегидрогеназа и оксидаза L-аминокислот, которые встречаются во всех живых организмах. L-аминокислотная оксидаза является ФАД или ФМН зависимой, с рН оптимумом 10 и низким числом оборотов. Известно, что в гомогенатах печени и других органов не происходит дезаминирование аминокислот, хотя в них присутствуют все ферменты дезаминирования аминокислот. Прекращение дезаминирования аминокислот при гомогенизации органов является результатом разрушения клеточных структур, приводящих к нарушению механизмов удаления образовавшегося при дезаминировании аминокислот аммиака и его накоплению в инкубационной среде.

Известно, что ГДГ имеет низкую константу равновесия, не позволяющая функционировать ферменту в условиях повышенного уровня свободного аммиака в среде. Можно было предположить, что при создании определенных условий связывания вновь образованного аммиака из аминокислот, удастся снизить количество свободного аммиака в среде и, таким образом, создать благоприятные условия дезаминирования аминокислот в гомогенатах. Для связывания свободного аммиака использовали ферменты орнитинового цикла, которые катализируют вовлечение свободного аммиака в биосинтез мочевины. Для этого в инкубационную среду добавляли очищенную митохондриальную фракцию печени крыс богатую ферментами орнитинового цикла. Таким образом, указанным путем поддерживается низкий уровень свободного аммиака, что в свою очередь снимает ингибирование процессов дезаминирования аминокислот [Давтян, 2005; Давтян, Айрапетян, 1998]. Таким образом, было показано, что прекращение дезаминирования аминокислот при гомогенизации органов является результатом разрушения клеточных структур, приводящее 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.

Было показано, что экстракты плесневого гриба *Aspergillus niger R-3* не обладают активностью L-аминокислотной оксидазы, тогда как из 4-х выделенных пероксисомальных фракций три обладали активностью данного фермента [Папоян, Оганесян, Давтян, 2001].

Перед нами была поставлена цель сделать более продуктивной индукцию фермента с помощью H_2O_2 . Для этого мы исследовали активирование оксидазы L-аминокислот плесневых грибов *Aspergillus niger R-3* путем добавления H_2O_2 к питательной среде роста грибов, а также после периодического добавления перекиси водорода к инкубируемым пробам (H_2O_2 добавляли к инкубационной среде 3 раза с 20 минутными интервалами в концентрации 0.01 М), когда плесневые грибы были выращены в среде не содержащей перекись водорода.

Результаты экспериментов обобщены на рисунке 1. Как видно из данных рисунка 1 при отсутствии в питательной среде H_2O_2 не проявляется активность оксидазы L-аминокислот, а при добавлении к питательной среде H_2O_2 в концентрации 0.01 М проявляется активность оксидазы L-аминокислот и составляет 6,04 мкмоль кетокислоты на 1 г. мицелия, при повышении концентрации H_2O_2 в питательной среде роста грибов до 0,02 М активность оксидазы L-аминокислот повышается по сравнению с 0.01М H_2O_2 в питательной среде в 1,55 раза и составляет 9,5 мкмоль кетокислоты на 1 г. мицелия. Дальнейшее повышение концентрации перекиси водорода в питательной среде до 0,045 М почти на 40% снижает активность фермента. Таким образом, H_2O_2 , добавленная к питательной среде в концентрации ниже или выше 0.02 М приводит к значительному ингибированию индукции фермента. Таким образом, в первой серии наших экспериментов были воспроизведены предыдущие эксперименты нашей лаборатории относительно стимулирующего влияния H_2O_2 на фермент.

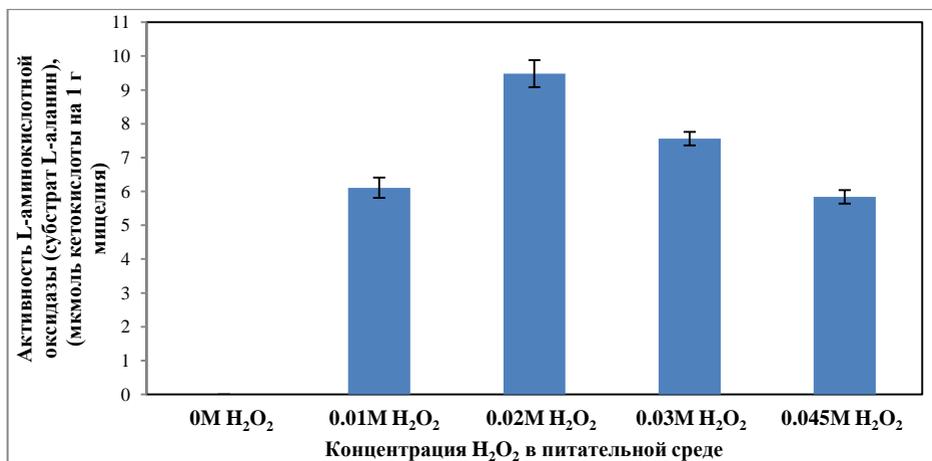


Рисунок 1. Влияние перекиси водорода на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов *Asp. niger R-3*

Активность фермента определена в присутствии и отсутствии перекиси водорода в питательной среде при разных концентрациях. Образцы сравнены с контролем, (n=5, p<0,05)

Таблица 1.

Влияние разных концентраций перекиси водорода в инкубируемых пробах на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов *Aspergillus niger R-3* (субстрат L -аланин) (n=5, M±m, p<0,05)

Субстрат	Концентрация H ₂ O ₂ в инкубационной среде (мМ)	Время инкубации (минут)	Активность фермента (мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия)
L -аланин	без H ₂ O ₂	60´	0
	0.001	20´	4.45 ±0.046
	0.002	40´	1.9 ± 0.02
	0.003	60´	0.6 ± 0.01

В следующих экспериментах нами была исследована активность оксидазы L-аминокислот при периодическом добавлении H₂O₂ (3 раза с 20 минутными интервалами) к инкубируемым пробам, когда плесневые грибы были выращены в питательной среде без наличия перекиси водорода. Полученные данные представлены в таблице 1-2. Данные таблицы 1 четко показывают, что при выращивании дрожжей в отсутствие H₂O₂ в экстрактах не проявляется активность оксидазы L-аминокислот. Однако, инкубирование экстракта дрожжей в присутствии H₂O₂ при концентрации 0.01 М, при использовании в качестве субстрата L-аланина, через 20 минут после начала инкубации активность L-аминокислотной оксидазы составляет 4,45 мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия. Дальнейшая инкубация в течение 20 минут в присутствии H₂O₂ с концентрацией 0.02 М приводит к снижению активности фермента (1,9 мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия). А когда инкубация продолжается еще 20 минут уже в присутствии H₂O₂ с концентрацией 0.03 М активность L-аминокислотной оксидазы снижается (с 1,9 мкмоль становится 0,6 мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия).

Таблица 2.

Влияние разных концентраций перекиси водорода в инкубируемых пробах на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов *Asp. nigerR-3* (субстрат L-метионин) (n=5, M±m, p<0,05)

Субстрат	Концентрация H ₂ O ₂ в инкубационной среде (мМ)	Время инкубации (минут)	Активность фермента (мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия)
L-метионин	без H ₂ O ₂	60´	0
	0.001	20´	0
	0.002	40´	0
	0.003	60´	2.8 ± 0.02

Таким же способом активность L-аминокислотной оксидазы определяли, используя в качестве дезаминирующегося субстрата L-метионин. Результаты исследований показали, что при наличии L-метионина, характер изменения активности L-аминокислотной оксидазы различается по сравнению с опытами, проведенными с субстратом L-аланин. Как видно из таблицы 2, высокая активность L-аминокислотной оксидазы при дезаминировании L-метионина не проявляется в течение первых 20–40 минут инкубационного периода. Однако, после третьего 20 минутного инкубационного интервала, когда инкубация проводится уже в среде содержащий 0.03 М перекиси водорода проявляется активность L-аминокислотной оксидазы и составляет 2,8 мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия.

Можем прийти к заключению, что исследуемые грибы обладают возможностями индуцирования оксидазы L-аминокислот как в течение их выращивания, так и при их дальнейшем инкубировании в среде, содержащей перекись водорода.

3.2 ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОРНИТИНОВОГО ЦИКЛА У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ *Aspergillus niger R-3*

Было бы интересно исследовать влияние H_2O_2 на активность ферментов, не вырабатывающих H_2O_2 в ходе их функционирования. Таковыми являются ферменты орнитинового цикла. 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. Цикл состоит из 5 ферментов, которые вовлекают аммиак в биосинтез мочевины.

В первую очередь мы определили влияние перекиси водорода на активность ферментов карбамоилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамоилазы, которые катализируют биосинтез цитруллина из аммиака, углекислого газа и орнитина в присутствии 2 молекул АТФ и в качестве активатора служит N-ацетилглутаминовая кислота. Биосинтез цитруллина изучали в экстрактах плесневых грибов, выращенных на среде содержащей 0.018 М H_2O_2 . Результаты наших экспериментов обобщены в таблице 3 и на рисунке 2. Как четко видно из таблицы 3, при инкубировании экстракта грибов в присутствии указанных в методической части субстратов проявляются активности 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 арсенолит цитруллина. Как показывают полученные данные, в присутствии высоких концентраций мышьяковокислого натрия (500 мкМ) из цитруллина образуется аммиак,

Таблица 3

Влияние перекиси водорода на активность карбамоилфосфатсинтазы и орнитинтранскарбамоилазы у плесневых грибов *Aspergillus niger R-3* (n=5, M±m p<0.05)

Питательная среда	Карбамоилфосфатсинтаза и орнитинтранскарбамоилазы (мкмоль цитруллина на 1 г мицелия)	Арсенолиз цитруллина (мкмоль NH ₃ на 1 г мицелия)
без H ₂ O ₂	1.1±0.001	9.1 ±0.001
0.018 М H ₂ O ₂	4.8±0.001	32.9 ± 0.015

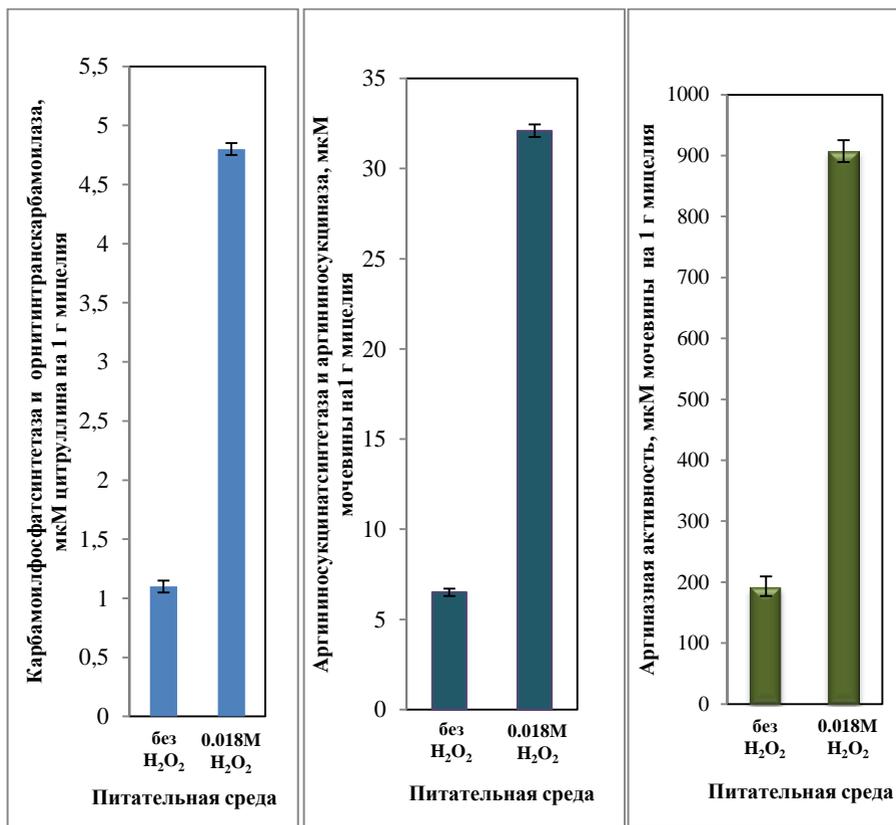
Примечание: Активности ферментов карбамоилфосфатсинтазы и орнитинтранскарбамоилазы определялись одновременно путем синтеза цитруллина.

количество которого составляет 9.1 мкмоль на 1 г. мицелия, а под влиянием H₂O₂ арсенолиз активируется в 3.6 раза.

Далее мы определяли активность ферментов, синтезирующих аргининосукцинат. Данные рисунка 2 показывают, что H₂O₂ добавленная в питательную среду роста плесневых грибов *Aspergillus niger R-3*, стимулирует также аргининосукцинатсинтазную и аргининосукциназную активности грибов в 4.9 раза, т. е. при отсутствии перекиси водорода в питательной среде роста активность указанных ферментов составляет всего 6,5 мкмоль мочевины на 1 г мицелия, а после добавления в питательную среду перекиси водорода активность указанных ферментов повышается до 32,1 мкмоль мочевины на 1 г мицелия.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние H₂O₂ на активность аргиназы плесневых грибов, выращенных на среде содержащей перекись водорода. Данные таблицы 3 показывают, что аргиназная активность резко стимулируется в присутствии H₂O₂ в питательной среде роста грибов. Так, без H₂O₂ аргиназная активность составляет 193.2 мкмоль мочевины на 1 г мицелия, а в присутствии H₂O₂ составляет 907.5 мкмоль мочевины на 1 г мицелия, т. е. перекись водорода стимулирует аргиназу в 4, 67 раза.

Следует обратить внимание на рисунок 2, где видно, что под влиянием перекиси водорода активируются все 5 ферментов орнитинового цикла, причем почти в равной степени, точнее в 4,5-5 раза. Во всяком случае, все цифры одного порядка, что позволяет нам подумать о существовании механизмов, обеспечивающих пропорциональность всех ферментов, участвующих в орнитиновом цикле. Разумеется, этот вывод нуждается в многосторонних биохимических исследованиях. Эти данные свидетельствуют также о том, что орнитиновый цикл не имеет ключевого фермента, решающего судьбу всего ферментативного цикла. Очевидно, важными в этом отношении являются все ферменты цикла. Чтобы подтвердить указанный вывод



а) карбамоилфосфатсинтаза и орнитинтранскарбамоилаза б) аргининосукцинатсинтаза и аргининосукциназа в) аргиназа

Рисунок 2. Активность ферментов орнитинового цикла под влиянием перекиси водорода у плесневых грибов *Asp. niger* R-3

Активности ферментов определены в присутствии и отсутствии перекиси водорода в питательной среде грибов. Образцы сравнены с контролем, (n=5, p<0,05)

относительно возможности индуцирования перекисью водорода активности ферментов, нами была определена активность аргиназы у плесневых грибов, выращенных в среде, не содержащей перекись водорода, а также при инкубировании экстрактов плесневых грибов с периодическим добавлением (20 минутными интервалами) перекиси водорода в инкубируемые пробы.

Из полученных нами данных, которые представлены в таблице 4 ясно видно, что при периодических добавлениях перекиси водорода, три раза с интервалами 20 минут, наблюдается увеличение аргиназной активности. Так, после первых 20 минут

Таблица 4.

Влияние перекиси водорода на активность аргиназы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 в инкубируемых пробах (n=5, M±m, p<0.05)

Субстрат	Концентрация H ₂ O ₂ в инкубационной среде (мМ)	Время инкубации (минут)	Активность аргиназы (мкмоль мочевины на 1 г мицелия)
L-аргинин	без H ₂ O ₂	60'	193.2±8
	0.001	20'	220 ±13
	0.002	40'	456 ±10
	0.003	60'	560 ± 15

инкубации наблюдается увеличение аргиназной активности по сравнению с пробой без перекиси в 1,13 раза, после 40 минутной инкубации – 2 в раза, а после 60 минутной – в 2,9 раза.

Обобщая полученные нами данные, можем заключить, что очевидный интерес представляет тот факт, что стимулируются перекисью водорода не только H₂O₂ вырабатывающие ферменты (оксидаза L-аминокислот), но и H₂O₂ не вырабатывающие ферменты. Очевидно, перекись водорода производится во всех клетках различных видов, но по эффективности активации тех или иных жизненных процессов они значительно различаются.

3.3 ВЛИЯНИЕ SH-ГРУПП СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА АКТИВНОСТЬ L-АМИНОКИСЛОТНОЙ ОКСИДАЗЫ, АКТИВИРОВАННОЙ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА

Как уже было сказано, перекись водорода является обязательным компонентом живых клеток и играет важную роль в защитных и окислительных биологических реакциях. Кроме этого, появляются новые аргументы относительно того, что при низких концентрациях H₂O₂ функционирует в качестве сигнального агента у высших организмов. Возникает вопрос о механизмах действия H₂O₂ на клеточные функции. Очевидно, должны существовать особые структуры (рецепторы) как на поверхности клетки, так и внутри нее, как, например, рецепторы, содержащие SH группы, которые под влиянием H₂O₂ могут окисляться. Большой интерес представляет вопрос о характере акцептора перекиси водорода, который так интенсивно активирует многие биохимические процессы и, в том числе, ферменты. Было показано, что при транспорте глюкозы в жировых клетках было обнаружено окисление SH групп инсулинового рецептора, что и вызывает эффект инсулина (Heffetz et al., 1992). По мнению ряда авторов, разрывы в молекуле ДНК в клетках мишенях и в гранулоцитах под влиянием окислительного взрыва также являются

следствием окисления SH групп белков плазматической мембраны [Birnbom,1988, 1989].

Особенно чувствительными к изменениям сульфгидрильных и дисульфидных групп являются постсинаптические нейроны, что отражается на нейронной трансмиссии [Zazuga, et al., 1984].

Установлено, что H₂O₂ и NO активируют G белки [Lander et. al., 1993]. Полагают, что при этом образуется S-нитрозилированный глутатион, который может реагировать с SH группами G белков [Stamler et al., 1992; Crapo, Stamler, 1994]. Следует отметить, что существует мнение о том, что S-метилмеркаптоэтанолламин является субстратом для глутаминтрансминазы и L-аминокислотной оксидазы [Cooper, et al., 2005].

Приведенные данные, таким образом, свидетельствуют в пользу того, что в клетках имеются рецепторы, которые обеспечивают передачу информации. Возможно, таковыми структурами являются соединения, содержащие тиоловые группы, которые являются мессенджерами и многие авторы защищают это мнение [Crapo, Stamler, 1994; Quesada, et al., 1996; Truong, Carroll, 2012].

Перед нами была поставлена задача исследовать влияние SH группы содержащих соединений на активность L-аминокислотной оксидазы. Для этого исследовали влияние соединений, содержащих тиоловые группы, каким является глутатион.

Плесневые грибы были выращены в питательной среде Ролена, содержащей перекись водорода, с целью индукции L-аминокислотной оксидазы в экстрактах грибов. После чего определяли активность L-аминокислотной оксидазы, взяв в качестве субстрата L-аланин и L-метионин в концентрациях 10 мкмоль. Определяли активность фермента в присутствии специфически связывающей сульфгидрильные группы ПХМБ (парахлормеркурийбензоат) в разных концентрациях. Активность фермента выражали в мкмоль образованной кетоислоты на 1 г. мицелия. Полученные данные обобщены в таблице 5 и 6. Как видно из данных таблицы 5, под влиянием ПХМБ в концентрации 1 мкмоль активность L-аминокислотной оксидазы (субстрат L-аланин) ингибируется на 6.8%, а при концентрации ПХМБ 2.5 мкмоль ингибируется на 32 %, при концентрации 5 мкмоль- на 37.2 %, а при 10 мкмоль на 83.36%. При использовании в качестве субстрата L-метионин (табл. 6) дезаминирование L-метионина ингибируется ПХМБ-ом при концентрации 1 мкмоль на 10%, а при концентрации ПХМБ 2.5 мкмоль дезаминирование L-метионина ингибируется на 28.6%, при концентрации ПХМБ 5 мкмоль дезаминирование метионина ингибируется на 37.3%, а при концентрации 10 мкмоль-на 47.3%. Таким образом, ПХМБ ингибирует активность индуцированной перекисью водорода L-аминокислотной оксидазы. По мере увеличения концентрации ПХМБ пропорционально усиливается ингибирование активности L-аминокислотной оксидазы. Эти данные четко показывают, что блокировка SH групп ПХМБ-ом лишает фермента возможности индуцироваться перекисью водорода. Таким образом, можем утверждать, что L-аминокислотная оксидаза является тиоловым ферментом.

Таблица 5

Влияние ПХМБ на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов
Aspergillus niger R-3, активированной H₂O₂ (субстрат L-аланин)
(n=5, M±m, p<0.05)

Концентрация ПХМБ (мкмоль)	Активность фермента (мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия)	Активация (%)	Ингибирование(%)
без ПХМБ	2.96±0.07	100	-
1	2.74±0.04	93.2	6.8
2.5	1.5±0.05	68	32
5	1.91±0.074	62.8	37.2
10	0.81±0.035	16.64	83.36

Таблица 6

Влияние ПХМБ на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов
Aspergillus niger R-3, активированной H₂O₂ (субстрат L-метионин)
(n=5, M±m, p<0.05)

Концентрация ПХМБ (мкмоль)	Активность фермента (мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия)	Активация (%)	Ингибирование(%)
без ПХМБ	5.4±0.07	100	-
1	4.85±0.05	90	10
2.5	3.7±0.04	71.3	28.6
5	3.30±0.03	63	37.3
10	1.7±0.02	52.6	47.3

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияние глутатиона на активность L-аминокислотной оксидазы, предварительно индуцированной перекисью водорода. Известно, что глутатион в восстановленной форме содержит две SH группы, благодаря чему рассматривается как сильно восстанавливающее соединение. Данные таблицы 7 четко показывают, что восстановленный глутатион в концентрации 1 мкмоль ингибирует активность оксидазы (субстрат L-аланин) на 23%, при концентрации 2.5 мкмоль – на 26%, однако при концентрации 5 мкмоль глутатион активирует фермент на 41%, а при повышении концентрации восстановленного глутатиона до 10 мкмоль активность фермента повышается на 126%.

Таблица 7

Влияние глутатиона на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3, предварительно активированной H₂O₂ (субстрат L-аланин)
(n=5, M±m p<0.05)

Концентрация глутатиона (мкмоль)	Активность фермента (мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия)	Активация (%)	Ингибирование (%)	Стимуляция (%)
Без глутатиона	3.37±0.01	100	-	-
1	2.6±0.01	77	23	-
2.5	2.5±0.05	74	26	-
5	4.78±0.02	141	-	41
10	7.63±0.03	226	-	126

Таблица 8

Влияние глутатиона на активность L-аминокислотной оксидазы у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3, предварительно активированной H₂O₂ (субстрат L-метионин)
(n=5, M±m p<0.05)

Концентрация глутатиона (мкмоль)	Активность фермента (мкмоль кетокислоты на 1 г мицелия)	Активация (%)	Стимуляция (%)
Без глутатиона	2.55±0.02	100	-
1	2.86±0.02	112	12
2.5	3.19±0.02	125	25
5	5.1±0.03	200	100
10	14.95±0.02	586	486

При использовании в качестве субстрата L-метионина (таблица 8), восстановленный глутатион в концентрации 1 мкмоль активирует оксидазу на 12%, в концентрации 2.5 мкмоль – на 25%, в концентрации 5 мкмоль – в 100%, а при концентрации 10 мкмоль – на 486%. Полученные данные говорят в пользу того, что сульфгидрильные группы связаны с процессом реализации индукции L-аминокислотной оксидазы под влиянием перекиси водорода.

Однако, пока трудно что-либо предположить относительно блокируемых ПХМБ-ом сульфгидрильных групп. Они могут входить в состав белков, непосредственно акцептирующих SH группы или же белков, SH группы которых окисляются перекисью водорода. В частности показано, что SH группы инсулинового рецептора окисляются перекисью водорода, что и вызывает эффект инсулина [Heffetz et al., 1992]. Разумеется для окончательного решения вопроса необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. L-аминокислотная оксидаза у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 активируется путем периодического добавления H_2O_2 в инкубируемые пробы.
2. Под влиянием перекиси водорода активируются ферменты как продуцирующие при каталитической реакции перекись водорода, так и не продуцирующие.
3. Все ферменты орнитинового цикла у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 стимулируются под влиянием перекиси водорода, при этом все ферменты активируются почти в равной степени.
4. L-аминокислотная оксидаза у плесневых грибов *Aspergillus niger* R-3 является тиоловым ферментом, потому и она пропорционально ингибируется под воздействием ПХМБ.
5. Глютацион стимулирует активность L-аминокислотной оксидазы, очевидно, путем защиты сульфгидрильных групп.
6. Для активации L-аминокислотной оксидазы имеют значение концентрация перекиси водорода, длительность инкубации и характер субстрата.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ

1. Н.М. Davtyan, The relationship of glutathion's SH groups with hydrogen peroxide during L-amino acid activation in *Asp.niger* R-3 yeasts //National Academy of Sciences of RA, Electronic Journal of Natural Sciences, 2 (21), 2013, pp.10-13
2. Р.М.Давтян, С.П.Оганесян, А.М. Карапетян, М.А. Давтян, Влияние перекиси водорода на активность ферментов орнитинового цикла у плесневых грибов *Asp. niger* R-3. //Биол. журн. Армении, LXV, #3, 2013, стр.46-50
3. Н.М.Давтян, С.П.Новхannisyan, Н.М.Карапetyan, Optimal conditions of induction of L-amino acid oxidase of *Aspergillus niger* R-3 fungus by Hydrogen peroxide. //Proceedings of the Yerevan State University Chemical and Biological Sciences, 2013, #2, p.40-43
4. A. Grigoryan, R.M. Davtyan, G.A. Gabrielyan, S.P. Hovhannisyan, M.A. Davtyan, Introduction of L-aminoacid oxidase of *Asp. niger* (R-3) by hydrogen peroxide. //FEBS Journal, Special issue: 22nd IUBMB and 37th FEBS Congress, Seville, Spain, sept. 4-9, 2012, V. 279, Issue supplement s1, p. 285, P12-68

Aspergillus niger R-3 ԲՈՐԲՈՍԱՍՆԿԵՐՈՒՄ *L*-ԱՄԻՆԱԹՔՎԱՅԻՆ
ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԴՐՍԵՎՈՐՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Հանգուցային բառեր՝ ինդուկցիա, *L*-ամինաթթվային օքսիդազ, ջրածնի պերօքսիդ, օրնիտինային ցիկլ

Բոլոր կենդանի օրգանիզմների համար խիստ բնորոշ է ամոնիակի գոյացումը և նրա արտազատումը որպես ազոտային փոխանակության արգասիք: Թեև վաղուց հայտնի է ամոնիակագոյացման փաստը և հայտնի են բոլոր այն ֆերմենտները, որոնք դեզամինացնում են ամինաթթուներին, բայց կան դեռևս չպարզաբանված հարցեր, մասնավորապես ամոնիակի գոյացման մեխանիզմի վերաբերյալ: Մասնավորապես հայտնի է, որ հյուսվածքների հոմոգենատներում թեև հայտնաբերվում են դեզամինացնող ֆերմենտները, բայց ամինաթթուների դեզամինացում տեղի չի ունենում: Բրաունշտեյնը այս երևույթի պատճառը համարում է հոմոգենիզացման ընթացքում տեղի ունեցող ֆերմենտների և կոֆերմենտների խիստ նստացումը, իսկ Դավթյանը նշված երևույթի բուն պատճառը համարում է հոմոգենատներում ամոնիակի կուտակումը, որը լինելով ցիտոպլազմատիկ թույն ձևում է ամոնիակագոյացումը: Դավթյանը և աշխատակիցները ցույց տվեցին, որ եթե փորձի ընթացքում ստեղծում են պայմաններ ամոնիակը կապելու համար՝ մասնավորապես այն օրնիտինային ցիկլի մեջ ընդգրկելու ճանապարհով, հնարավոր է դառնում ամինաթթուների դեզամինացումը նաև հոմոգենատներում: Ներկայումս *L*-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվացումը կարևոր է նոր դեղամիջոցների, նոր սպիտակուցների, կոֆերմենտների ստացման համար [Okubo et al., 2012; Naumann et al., 2011; Fujisawa et al., 2009; Tonismagi et al., 2006; Nishizawa et al., 2005]: Մեր լաբորատորիայի նախորդ աշխատանքերում ցույց էր տրվել, որ *L*-ամինաթթվային օքսիդազան *Aspergillus niger R-3* բորբոսասնկերում զգալի ակտիվանում է, երբ սննդամիջավայրին ավելացվում է ջրածնի պերօքսիդ: Մեր հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ *L*-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվացումը զգալի բարձրանում է, երբ ջրածնի պերօքսիդը ավելացվում է ինկուբացիոն անոթներում: Ուշադրության արժանի է այն փաստը, որ *L*-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը կախված է սուբստրատից և ինկուբացման տևողությունից, այնպես, որ ամեն մի *L*-ամինաթթվային օքսիդազ ունի իրեն յուրահատուկ սուբստրատների (ամինաթթուների) կազմ:

Պետք է ընդգծել, որ *L*-ամինաթթվային օքսիդազի սուբստրատը *L*-մեթիոնինն է կամ *L*-ալանինը մեր փորձերում, որոնց դեզամինացման ժամանակ արտադրվում է ջրածնի պերօքսիդ: Հարց է առաջանում, արդյոք ինդուկցիան տեղի կունենա, եթե սուբստրատը ֆերմենտատիվ գործունեության ժամանակ չի արտադրում ջրածնի պերօքսիդ: Այդպիսին են օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտները, ուստի խնդիր դրվեց ուսումնասիրել ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը

օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտների ակտիվության վրա: Մասնակի մաքրման ենթարկված օրնիտինային ցիկլի 5 ֆերմենտները հետազոտվել են և պարզվել է, որ բոլոր 5 ֆերմենտների մոտ էլ ակտիվությունը խթանվում է ջրածնի պերօքսիդով:

Ինդուկցիայի մեխանիզմները ներկայացնում են մեծ գիտական հետքերություն: Առանձնապես կարևոր են և դժվար ինդուկցիայի արդյունավետության բարձրացման հարցերը: Ինդուկցիան պահանջում է ջրածնի պերօքսիդի, սուբստրատի (ալանին, մեթիոնին և ուրիշ ամինաթթուներ) և L-ամինաթթվային օքսիդազի համաձայնեցված գործունեություն: Այսպես սկզբում արտադրվում է ջրածնի պերօքսիդ, այնուհետև առաջացած ջրածնի պերօքսիդը ակտիվացնում է ֆերմենտին: Ցույց է տրվել, որ ՊՔՄԲ-ն, լինելով թիոլային թույն, կապում է բոլոր սուլֆիդրիլային խմբերը և այդպիսով ընկճում ֆերմենտների ակտիվությունը, և հետևապես նաև ինդուկցիայի մեխանիզմը: Մեր տվյալներից միանշանակ բխում է, որ L-ամինաթթվային օքսիդազը հետազոտված բորբոսասնկերի մոտ թիոլային է: Անհրաժեշտ է նշել, որ ներկայումս հայտնաբերվում կամ սինթեզվում են բազմաթիվ նոր թիոլային միացություններ (S-(1-կարբօքսիլեթիլ)-L-ցիստեին), S-(1-կարբօքսիպրոպիլ)-L-ցիստեին և այլն), որոնք ցուցաբերում են բարձր ակտիվություն, այդ թվում արդյունավետ ակտիվանալու ընդունակություն:

DAVTYAN HRIPSIME
POSSIBILITIES OF L-AMINOACID OXIDASE ACTIVITY EXPRESSION IN
Aspergillus niger R-3 MOLDS
SUMMARY

Key words: induction, L-amino acid oxidase, hydrogen peroxide, urea cycle

For all living organisms it is highly characteristic the formation of ammonia basically from amino acids. Although the ammonia formation and the enzymes which deaminate all amino acids are known there are still unclarified questions especially regarding the mechanism of ammonia formation. Particularly, it is known that amino acid deamination does not take place in tissue homogenate, even in the presence of deaminating enzymes. Braunshtein believes that the cause of this phenomenon is a strict dilution of enzymes and coenzymes during homogenization process, but according to Davtyan the main cause is the accumulation of ammonia, which as a cytoplasmic toxin, inhibits the ammonia formation in homogenates. Davtyan and colleagues have shown that amino acid deamination becomes also possible in homogenates of rat's liver when during experiments ammonia binding by involvement into the urea cycle is activated. The activation of L-aminoacid oxidase is important for the production of new medications, new proteins and coenzymes [Okubo et al., 2012; Naumann et al., 2011; Fujisawa et al., 2009; Tonismagi et al., 2006; Nishizawa et al., 2005]. Previously, it has been shown in our laboratory that L-amino acid oxidase is considerably activated by adding of hydrogen peroxide to nutrient medium. Our study has shown that the activity of L-amino acid oxidase is increased also when hydrogen peroxide is added to the incubated samples. It is notable, that the activity of L-amino acid oxidase depends on the substrate and the duration of incubation, thus every L-amino acid oxidase has its own unique substrate (amino acid) composition.

It must be emphasized, that in our experiments substrate for L-amino acid oxidase is L-methionine or L-alanine and during their deamination the hydrogen peroxide is formed. The question is whether induction will take place if during the enzymatic activity the substrate does not produce hydrogen peroxide as in case of the enzymes of the urea cycle. So we attempt to study the effect of hydrogen peroxide on the activity of enzymes of urea cycle. The investigation of partially purified enzymes of urea cycle has shown that the activity of all five enzymes is stimulated.

The induction mechanisms are of special scientific interest. Particularly, the questions of increasing the efficiency of induction are important. Induction requires the coordinated activity of hydrogen peroxide, substrate (alanine, methionine, etc.) and L-amino acid oxidase. At first, the hydrogen peroxide is formed and then it activates the L-amino acid oxidase. It has been shown that PCMB being as a thiol toxin binds all sulfhydryl groups and thus inhibits the enzyme activity and subsequently, the induction mechanism. Our results obviously show that in studied molds the L-amino acid oxidase is thiol-based. It is important to mention that nowadays new thiol-based compounds are discovered and synthesized (S-(1-carboxyethyl)-L-cystein), S-(1-carboxypropil)-L-cystein and others) which show high activity, including the property of effective activation.