ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆԻ ԳԻՏԱԿԱՆ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЕРЕВАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Քիմիա և կենսաբանություն 2, 2012 Химия и биология

Կենսաբանություն

УДК 577.125:577.151

CANDIDA GUILLIERMONDII ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ D-ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱԶԻ ՄԱՔՐՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ ԲԱՐԵԼԱՎՈՒՄԸ

Գ. Կ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ*, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԵՊՀ կենսաքիմիայի ամբիոն, Հայաստան

Բանալի բառերը. *Candida guilliermondii*, D-ամինաթթվային օքսիդազ, DAAO, ֆերմենտի ինդուկցիա, քրոմատաֆոկուսացում, հել-էլեկտրաֆորեզ:

Ներածություն: D-ամինաթթվային օքսիդազը (EC 1.4.3.3, D-ամինաթթու:թթվածին օքսիդառեդուկտազ (դեզամինացնող)) ֆլավինային դեհիդրոգենազների ընտանիքի ֆերմենտ է, որը կատալիզում է D-ամինաթթուների օքսիդատիվ դեզամինացումը, ինչի արդյունքում առաջանում են համապատասխան α-կետոթթուներ և ամոնիակ: Այդ պրոցեսն ուղեկցվում է ջրածնի պերօքսիդի անջատմամբ՝ մոլեկուլյար թթվածնի վերականգնման արդյունքում: Ֆերմենտը լայն տարածում ունի և՛ մի շարք գիտահետազոտական աշխատանքներում, և՛ տարբեր կենսատեխնոլոգիական պրոցեսներում: D-ամինաթթվային օքսիդազը կիրառվում է ամինաթթուների ռացեմիկ խառնուրդների բաժանման, α-կետոթթուների ստացման, ցեֆալոսպորին C-ի փոխարկման համար, ինչպես նաև տարբեր կենսաբանական նմուշներում D-ամինաթթուների հայտնաբերման ու քանակական որոշման համար (կենսասենսորների կազմում) [1–3]: D-ամինաթթվային օքսիդազը հայտնաբերվել է մի շարք օրգանիզմներում, բայց մեծ քանակությամբ և հոմոգեն վիճակում ֆերմնտը հնարավոր է եղել ստանալ խոզի երիկամներից [4]:

Վերջին տասնամյակներում արդիական են դարձել տարբեր միկրոօրգանիզմներից ֆերմենտի անջատմանն ու մաքրմանն ուղղված հետազոտությունները: Սակայն այս աղբյուրից, մասնավորապես, խմորասնկերից D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրման դժվարությունը կայանում է նրանում, որ այդ ֆերմենտն առկա է վերջիններիս բջիջներում շատ ցածր կոնցենտրացիայով և բավականին անկայուն է, չնայած որ նրա սինթեզը կարելի է խթանել սննդամիջավայրում D-ամինաթթուների կիրառմամբ [5]:

Նախկինում նկարագրվել էր *Candida guilliermondii* խմորասնկերից D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրման գործընթացը քրոմատաֆոկուսացման մեթոդի կիրառմամբ [6]: Այս հետազոտության նպատակն է եղել բարելավել նկարագրված մաքրման պրոցեսը և ստեղծել առավել նպաստավոր պայման-

* E-mail: grigor87@mail.ru

ներ՝ համեմատաբար բարձր ելքով D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքուր պատրաստուկ ստանալու համար:

Նյութեր և մեթոդներ: DEAE-Tp 650 M անիոնափոխանակիչն ու հելֆիլ-տրացիայի Tp HW-50F ադսորբենտը ձեռք են բերվել Toyo Soda MFG-ից (Ճապոնիա); քրոմատաֆոկուսացման ադսորբենտ՝ PBE-94 (polybuffer exchanger) Pharmacia Fine Chemicals (Շվեդիա); պոլիէթիլենգլիկոլ 35000՝ Loba-Chemie, Wien-Fischamend (Ավստրիա); 4-ամինաանտիպիրին՝ Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Գերմանիա); ֆենիլ-մեթիլ-սուլֆաֆտորիդը (PMSF), EDTA, ակրիլամիդն ու բիսակրիլամիդը՝ SERVA Electrophoresis GmbH (Գերմանիա); ՈւՉ հոմոգենիզատոր 115 VAC ջերմաստիճանային կարգավորմամբ՝ Cole-Palmer (ԱՄՆ); Genesys 10S UV-Vis սպեկտրալուսաչափ՝ Thermo Fisher Scientific Inc (ԱՄՆ):

Հետազոտության առարկա են հանդիսացել ԵՊՀ միկրոօրգանիզմների հավաքածուի *Candida guilliermondii ՀՊ-4* խմորասնկային բջիջները, որոնց աճեցման համար օգտագործվել է արհեստական սննդամիջավայր՝ աղային կազմի օպտիմալ պարունակությամբ [7]: Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշվել է սպեկտրալուսաչափական եղանակով (550 *նմ*)՝ ըստ առաջացած ջրածնի պերօքսիդի: Ռեակցիոն խառնուրդը (1 *մլ*) պարունակում էր. 5 *մՄ* ֆենոլ, 0,3 *մՄ* 4-ամինաանտիպիրին, 30 *մՄ* D-պրոլին և 2 միավոր պերօքսիդազ 50 *մՄ* Tris-HCl բուֆերում (pH 8,3): Ֆերմենտի ակտիվությունը հաշվարկվել է հետևյալ բանաձևով,

$$E = \frac{(A_t - A_0)V_m}{\varepsilon t V_{pr} C_{pr} L},$$

որտեղ E – ֆերմենտի ակտիվությունն է, *Ս/մգ*; A_0 և A_t – կլանումը 550 *նմ* մինչև ինկուբացիան և ինկուբացիայից հետո; V_m և V_{pr} – ռեակցիոն խառնուրդի և ֆերմենտ-սպիտակուցի լուծույթի ծավալը, *մլ*; ε – էքստինկցիայի գործակիցը, որը հավասար է 5 $(Ս նմ)^{-1}$; t – ինկուբացիայի ժամանակը, *րոպե*; C_{pr} – սպիտակուցի կոնցենտրացիան, *մգ/մլ*; L – օպտիկական ուղին (կյուվետի հաստություն), *սմ*:

Ինկուբացիայի ժամանակ առաջացած ջրածնի պերօքսիդը ճեղքվում է ռեակցիոն խառնուրդի կազմում առկա պերօքսիդազի ազդեցությամբ, իսկ դրան զուգահեռ ընթացող էլեկտրոնների փոխադրման շնորհիվ առաջանում է 4-ամինաանտիպիրինի օքսիդացված ձևը: Վերջինս ֆենոլի առկայությամբ առաջացնում է գունավորում, որի ինտենսիվությունը չափվում է սպեկտրալուսաչափական եղանակով (λ=550 *նմ*): Ֆերմենտատիվ ակտիվության միավորը (*Ս*) համապատասխանում է 30^0C-ում 1 րոպեում 1 *մկմոլ* ջրածնի պերօքսիդի առաջացմանը: Սպիտակուցի քանակությունը որոշվել է Լոուրիի, Բրեդֆորդի կամ Գրովսի-Դեյվիսի մեթոդներով՝ կախված նմուշում սպիտակուցի կոնցենտրացիայից [8–10]: D-ամինաթթվային օքսիդազը մաքրվել է [6]-ում նկարագրված մեթոդիկայով, կիրառելով մի շարք բարեփոխումներ: Հելէլեկտրաֆորեզն իրականացվել է Լաեմլիի կողմից առաջարկված մեթոդիկայով [11]. հելի կոնցենտրացիան 7,5%, Tris-գլիցինային բուֆեր, pH 8,9; 100–120 *V*; 3–3,5 *ժ*; 25^0C ջերմաստիճանում: Ստացված հելը ներկվել է Coomassie Brilliant Blue R-250 ներկով (12 *ժ*), որից հետո այն գունազրկվել է 7% քացախաթթու և 25% մեթանոլ պարունակող ջրային լուծույթով:

Արդյունքներ և քննարկում: Նոր մեթոդով անջատված D-ամինաթթվային օքսիդազն ունի 13,1 *Ս/մգ* տեսակարար ակտիվություն: Ֆերմենտի մաքրման պրոցեսն ըստ փուլերի ներկայացված է աղյուսակում:

Հարկ է նշել, որ նախկինում [6] բացառվել էր խմորասնկերի աճեցման սննդամիջավայրում D-ամինաթթուների առկայությունը՝ լայն դասակարգման ֆերմենտային պատրաստուկ ստանալու նպատակով:

Բարձր ելքով ֆերմենտ ստանալու համար կատարվել է ֆերմենտ-սպիտակուցի նախնական ինդուկցիա՝ սննդամիջավայրի կազմում 30 *մՄ* DL-ալանինի ավելացմամբ: Վերջին հանգամանքի շնորհիվ ստացված խմորասնկային էքստրակտի սկզբնական ակտիվությունը (0,017 *Մ/մգ*) գրեթե 2,6 անգամ ավելի բարձր է եղել, քան առանց ինդուկցիայի ստացման դեպքում, որի ժամանակ այն կազմել էր 0,0065 *Մ/մգ* (տես աղյուսակ):

D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքրման պրոցեսն՝ ըստ փուլերի

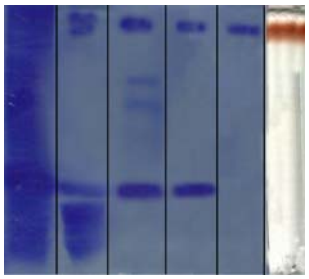
Մաքրման փուլ	Ընդհանուր ակտիվություն, *Մ*	Սպիտակուց, *մգ*	Տեսակարար ակտիվություն, *Մ/մգ*	Մաքրման գործակից	Ելք, %
խմորասնկային էքստրակտ	106,3	6250	0,017	1	100,0
DEAE-Tp 650 M անիոնափոխանակիչ	84,1	557	0,151	9	79,2
քրոմատաֆոկուսացում I	39,1	26,6	1,47	86	36,8
քրոմատաֆոկուսացում II	31,2	7,9	3,95	232	29,4
Tp-50F հել-ֆիլտրացիա	15,7	1,2	13,1	771	14,8

Մաքրման պրոցեսի բարելավման հաջորդ առանձնահատկությունն այն էր, որ տվյալ դեպքում բացառվել է նաև հիդրոֆոբ քրոմատագրաֆիայի փուլը՝ վերջինիս ժամանակ նկատվող տեսակարար ակտիվության մեծ կորուստի պատճառով: Հայտնի է, որ խմորասնկերի D-ամինաթթվային օքսիդազն ունի մեծ խնամակցություն հիդրոֆոբ փոխանակիչների նկատմամբ, ինչի շնորհիվ այս ֆերմենտը շատ հաճախ մաքրվել է հիդրոֆոբ քրոմատագրաֆիայի մեթոդով [12], ինչը սակայն մաքրմանը զուգընթաց բերում էր ֆերմենտի տեսակարար ակտիվության զգալի անկման՝ որպես էլյուենտ կիրառվող աղերի կամ դուրս մղող այլ ռեագենտների ազդեցությամբ: Աշխատանքում՝ այս երևույթից խուսափելու նպատակով հրաժարվել ենք հիդրոֆոբ քրոմատագրաֆիայի փուլից և անիոնափոխանակիչից (DEAE-Tp 650 M, աշտարակի չափերը՝ 46×2,7 *սմ*, ֆերմենտը դուրս է մղվել 0–0,15 *M* NaCl գրադիենտով՝ Tris-HCl բուֆերում, pH 8,3) անմիջապես հետո ֆերմենտային պատրաստուկը մաքրել քրոմատաֆոկուսացման աշտարակում:

Քրոմատաֆոկուսացման մեթոդի բարձր արդյունավետությունը մաքրման ողջ պրոցեսի ընթացքում նկարագրված է [6]-ում: Այդ բաժանման մեթոդի հիմքում ընկած է pH-ի տարբեր արժեքներում սպիտակուցների նստեցման առանձնահատկությունը. յուրաքանչյուր սպիտակուց դուրս է մղվում աշտարակից իր իզոէլեկտրիկ կետին համապատասխան pH-ի արժեքի դեպքում:

Առաջարկվող մյուս բարեփոխումն այն է, որ քրոմատաֆոկուսացման առաջին փուլից (PBE 94, աշտարակի չափերը՝ 15×1,5 *սմ*, որպես էլյուենտ կիրառվել է պոլիբուֆեր՝ 8,8–5,0 pH միջակայքով) հետո գումարվել են ֆերմենտապես ակտիվ բոլոր ֆրակցիաները, ենթարկվել դիալիզի (Tris-HCl բուֆեր, pH 8,3), ապա կրկին մաքրվել քրոմատաֆոկուսացման միջոցով

(PBE 94; 6×1,5 *սմ*)՝ pH-ի ավելի նեղ տիրույթում (7,6–6,5): pH-ի գծային գրադիենտի ապահովումն իրականացվել է հատուկ պոլիբուֆերային էլյուենտների (Polybuffer 96 և Polybuffer 74)՝ համապատասխան համամասնությամբ և նոսրացումներով կիրառման շնորհիվ (համաձայն արտադրողի ցուցմունքների): Քրոմատոֆոկուսացման երկրորդ փուլից հետո ֆերմենտի ակտիվ ֆրակցիաները գումարվել են, խտացվել՝ պոլիէթիլենգլիկոլով, pH-ը հասցվել է 8,3 և կատարվել է հելֆիլտրացիա (Tp HW-50F; 70×1,0 *սմ*; որպես էլյուենտ կիրառվել է 20 *մՄ* Tris-HCl բուֆեր, pH 8,3, որը պարունակում է 2 *մՄ* EDTA և 0,1 *մՄ* PMSF): Յուրաքանչյուր փուլից հետո ստացված ֆերմենտային պատրաստուկների մաքրության աստիճանը ստուգելու համար կատարվել է պոլիակրիլամիդային հել-էլեկտրաֆորեզ, որի արդյունքները ներկայացված են նկարում:



Մաքրման տարբեր փուլերում DAAO հոմոգենության որոշումը հել-էլեկտրոֆորեզի մեթոդով (1–5 շերտերը ներկված են Coomassie Brilliant Blue R-250 ներկով).
1 – բջջային էքստրակտ,
2 – DEAE-Tp 650 M,
3 – քրոմատաֆոկուսացում I,
4 – քրոմատաֆոկուսացում II,
5 – հելֆիլտրացիա,
6 – հելֆիլտրացիայի արդյունքում ստացված մաքուր պատրաստուկի (միևնույն է 5 շերտի հետ) էլեկտրաֆորեզի հելի ֆերմենտային ներկումը, որպես հիմնանյութ կիրառվել է D-ալանին:

Նկարից երևում է, որ քրոմատաֆոկուսացման երկու փուլերից հետո էլ նկատվում է հոծ շերտ միևնույն բարձրության վրա (3, 4), որը վերանում է հելֆիլտրացիայից հետո (5): Արդյունքում ստացվում է ֆերմենտի հոմոգեն պատրաստուկ (5), որի էլեկտրաֆորեզից ստացված հելի ֆերմենտային ներկման ժամանակ նկատվում է ֆերմենտային ակտիվություն ունեցող միայն մեկ սպիտակուցային շերտ (6): 1 և 2 սյուներում ներկայացված են խմորասնկային էքստրակտի և իոնափոխանակիչից հետո ստացված ֆերմենտային պատրաստուկի հել-էլեկտրաֆորեզի արդյունքները, որտեղ նկատվում է բազմաթիվ սպիտակուցային շերտերի հաջորդականություն (տես նկարը):

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ շրջանցելով հիդրոֆոբ քրոմատագրաֆիայի փուլը հնարավոր է ստանալ D-ամինաթթվային օքսիդազի մաքուր պատրաստուկ՝ կրկնակի քրոմատաֆոկուսացման միջոցով:

Եզրակացություն: Բարձր ելքով D-ամինաթթվային օքսիդազ ստանալու համար *Candida guilliermondii* խմորասնկերի բջիջները կարելի է կուլտիվացնել ամինաթթուների DL-ռացեմատային խառնուրդով սննդամիջավայրում՝ ֆերմենտի նախնական ինդուկցիայի նպատակով: Հիդրոֆոբ քրոմատագրաֆիայի փուլը կարելի է շրջանցել, փոխարենը կիրառելով կրկնակի քրոմատաֆոկուսացում, և ստանալ ֆերմենտի հոմոգեն պատրաստուկ՝ համեմատաբար բարձր ելքով:

Ստացվել է 27.02.2012

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. **Massey V., Hemmerich P.** // Biochem. Soc. Trans., 1980, v. 8, p. 246–256.
2. **Dominguez R., Serra B., Reviejo A.J.** // Anal. Biochem., 2001, v. 298, p. 275–282.

3. **Ihaba Y., Mizukami K., Hamada-Sato N., Kobayashi T., Imada C., Watanabe E.** // Biosens. Bioelectron., 2003, v. 19, p. 423.
4. **Davtyan M.A., Papoyan A.R., Oganesyan S.P.** // Appl. Biochem. and Microbiol., 2001, v. 37 (3), p. 257–259.
5. **Simonetta M.P., Vanoni M.A., Casalin P.** // Biochim. Biophys. Acta, 1987, v. 914, p. 136–142.
6. **Gevorgyan G.K., Davtyan M.A., Hambardzumyan A.A.** // Reports of NAS RA, 2012, v. 112, № 2, p. 198–205.
7. **Геворгян Г.** // Биол. журнал Армении, 2011, v. 4 (63), p. 115–121.
8. **Lowry O.M., Roseburg N.J., Farr A.L., Randall R.J.** // J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265–275.
9. **Bradford M.H.** // Anal. Biochem., 1976, v. 72, p. 248–254.
10. **Groves W.E., Davis F.C., Sells B.H.** // Anal. Biochem., 1968, v. 22, issue 2, p. 195–210.
11. **Laemmli U.K.** // Nature, 1970, v. 227, p. 680–685.
12. **Deshpande A., Sankaran K., D'Souza S.F., Nadkarni G.B.** // Biotechnology Technique, 1987, v. 1, № 1, p. 55–58.

Г. К. ГЕВОРГЯН, М. А. ДАВТЯН

УЛУЧШЕНИЕ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII*

Резюме

Была усовершенствована процедура очистки оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Candida guilliermondii*. Синтез фермента был индуцирован присутствием DL-аланина в составе питательной среды. Без этапа гидрофобной хроматографии с помощью двойного хроматофокусирования удалось получить чистый ферментативный препарат со сравнительно высоким выходом.

G. K. GEVORGYAN, M. A. DAVTYAN

IMPROVEMENT OF PURIFICATION PROCEDURE OF D-AMINO ACID OXIDASE FROM *CANDIDA GUILLIERMONDII*

Summary

The purification procedure of D-amino acid oxidase from *Candida guilliermondii* was improved. An initial induction of the enzyme was performed by adding DL-alanine to cultivation medium composition. By means of twice chromatofocusing and without the step of hydrophobic chromatography it was available to obtain purified preparation of D-amino acid oxidase with higher yield.