

ЛІТЕРАТУРА

1. Брухманска Яна, Ільмарінен В.П., Брухманска Я.а. Нейрофармакологія 7, 128, 129, 1979.
2. Стороженко Т.В. Синапсизм і ритмічність нейронів соматическої кори, 270, Київ, 1974.
3. Poffenberger P., Felle M., Conti F., Manzoni T. J. Comp. Neurol., 263, 153-178, 1981.
4. Chazotte R., Impey G.M., Manzoni T. Exp. Brain Res., 35, 295-314, 1979.
5. Cotman C.W., Nemer Sanpedio M. Annu. Rev. Psychol., 33, 9, 331-431, 1982.
6. Duncan Smith I., Isister J., Mok H., Yokota T. J. Physiol. (Lond), 187, 551-582, 1966.
7. Hassler R., Muts-Clement K. J. Hinforsch., 66, 377-420, 1964.
8. Jasper H.H., Aumond-Marsac C.A. A stereotaxic atlas of the domestic rabbit, Columbia Nat. Res. Council Can., 90, 1954.
9. Jones E.G., LeVay S. J. Comp. Neurol., 156, 4, 349-377, 1974.
10. Jones E.G., Powell T.P.S. Br. Res., 9, 1, 71-94, 1968.
11. Jones E.G., Powell T.P.S. Philos. Trans R. Soc. Lond., 257, 45-62, 1970.
12. Manzoni T., Canini R., Spulieri G., Marelli E. Exp. Brain Res., 34, 153-171, 1979.
13. Manzoni T. Histochem. and Cytochem., 26, 2, 157-117, 1978.
14. Ranson-Smyth P. Topographischer Hirnatlas der Katze, J. J. Mosby, 160, 1961.
15. Huxley C.N. Biological and biochemical basis of behaviour, Madison, Univ. Wisconsin Press, 63-81, 1958.

Поступило 10.08.1995 г.

Учен. журн. Армения, 2 (42), 1995

УДК 576.851.46

ИЗЫСКИВАНЕ, ОЧИСТКА И СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТИПОВИ НАМИНИТЕ АМИНАК-ПРАЗЕ И 2-ПЕКТУЛОЗАМИНА ПРОИЗХОДИ *Rhodospirula gracilis* Ry 335 И ЕГО МУТАНТА ГИ-73

А.С.САМСЯН, Х.О.БЕЗВРЪЖАН, П.В.ТОЗЯНЯКЯН

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Синтези метод, очистка L-фенилаланин аминк-празе, акционирани синапсизмизация с аминния, подобожениую хроматографию на DEAE-сепхарил 6Б-ATF-TP, тети факторизация на сепхарекс G-200. Изучения, формалити сразнителногo исследовани ризи: физико-химический, каталитический, салис L-фенилаланин аминк-празе, видетелни ти роитетический нитамма-празеж *Rhodospirula gracilis* Ry 335 и его мутант ГИ-73.

Изучения, синтез L-фенилаланин аминк-празе; физико-химический, каталитический, салис L-фенилаланин аминк-празе, видетелни ти роитетический нитамма-празеж *Rhodospirula gracilis* Ry 335 и его мутант ГИ-73.

The method for L-Phenylalanine ammonia-lyase purification is described, which has been used for fractionation with ammonium sulfate, ion-exchange chromatography on DEAE-TP and gel filtration on Sephadex G-200. As a result electrophoretically homogenous preparations of L-PAL are obtained. Some physico-chemical and catalytic properties of L-

с DEAE-TP (2,5 x 30) Колонку промывали буфером А, затем белки элюировали в линейном градиенте NaCl от 0 до 0,3 М в буфере А (0,8). Скорость элюции 33 мл в час. Объединенные активные фракции (50 мл) концентрировали с помощью сульфата аммония 80%-ного насыщения. Осадок, полученный после центрифугирования, растворяли в 3 мл буфера А и хроматографировали на колонке с сефадексом G-200 (1,5 x 68 см). Гель-фильтрация проводилась буфером А со скоростью 8 мл/час. Активные фракции были объединены (10 мл), сконцентрированы с помощью сульфата аммония 80%-ного насыщения. Полученный препарат фермента хроматографировали на колонке с сефадексом G-200 в тех же условиях. Активные фракция объединили (5,4 мл) и хранили в 40%-ном глицерине при -12° (табл.1).

Чистоту L-ФАЛ определяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) на приборе модели "Isco" (США) [11], выявляя тем одну белковую полосу, обладающую L-ФАЛ-активностью. Белки в гелевых стебках красили 0,2%-ным водным раствором кумасси R-250, содержащим также 10 %-ную уксусную кислоту и 25 %-ный этанол.

Значение M_r субъединиц определяли электрофорезом в 10%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (DS-Na) [11]. Были использованы следующие маркеры: фосфорилата В (94 000), альбумин (67 000), свальбумин (45000), карбогидратоксидаза (30 000), ингибитор трипсина (20 000), тифа-лактальбумин (14 000).

Для определения оптимальных значений pH для фермента были использованы трибутилатные буферные смеси с различными значениями pH (диапазон pH 5,0-9,0), содержащие 10 мМ L-Phe. Перед измерением активности проводили инкубацию фермента в буферной смеси с соответствующим значением pH при 30° в течение 5 минут.

При определении субстратной специфичности вместо 10 мМ L-Phe использовали субстраты, концентрации которых приведены в табл.2.

Во всех экспериментах использовали ферментный препарат с удельной активностью 2 Е/мл белка, предварительно dialизованный против 25 мМ трис-HCl (pH 8,5).

Реактивы: L-фенилаланин, трис кумасси R-250, акриламид, N,N-метилеробисакриламид ("Serva", Германия), DEAE-TP 650 М "Foyo Soda MOF Co. U.S.A.", Япония), додецилсульфат-натрия ("Sigma", США). Остальные реактивы - "Рехим" квалификация не ниже х.ч.

Результаты и обсуждение. Разработанная схема очистки L-ФАЛ из культуры дрожжей *R.gracilis* Ry 335 и LGI-73, включающая несколько стадий: фракционирование сульфатом аммония, ионообменная хроматография на DEAE-TP, гель-фильтрация на сефадексе G-200 и повторяя гель-фильтрация в тех же условиях. Схема очистки приведена в табл. 1. В результате очистки были получены электрофоретически чистые ферментные препараты L-ФАЛ.

Таблица 1. Схема очистки L-ФАЛ из *R.gracilis* LGI-73

Этапы	Общий белок, мг	Общая актив-ность, Е	Удельная актив-ность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Экстракт	6500	66,9	0,0103	1,0	100
Сульфат аммония	1875	60,0	0,032	3,4	85
DEAE-TP	507	36,0	0,11	11,4	80
Сефадекс G-200	20	20,0	1,00	97,0	29
Сефадекс G-200	1,5	10,0	6,66	666,0	14

Ферменты, выделенные нами, мигрировали в геле при электрофорезе в присутствии DS-Na одной полосой с M_r , равными 60000 и 71000 для L-ФАЛ из *R.gracilis* Ry 335 и *R.gracilis* LGI-73 соответственно.

При изучении оптимальных для активности фермента pH среды фермент из *обнаружен* некоторые отличия. Так, оптимальный pH для L-ФАЛ из *R. gracilis* Ry 335 лежит в области от 8,5 до 9, в то время как для L-ФАЛ из *R. gracilis* LGI-73 этот диапазон несколько шире (pH 7,9-9,0).

Результаты изучения субстратной специфичности L-ФАЛ из двух вышеуказанных штаммов дрожжей приведены в табл.2. В обоих случаях фермент более специфичен по отношению к L-Phe и L-Trp по сравнению с L-Trp, D-Phe, α-Me-L-Phe не являясь субстратами для фермента.

Таблица 2. Сравнение субстратной специфичности L-ФАЛ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LGI-73

Субстрат	Концентрация субстрата, mM	Относительная активность, % L-ФАЛ (Ry 335)	Относительная активность, % L-ФАЛ (LGI-73)
L-Phe	2,5	100	100
L-Trp	2,5	90	75
L-Trp	2,5	102	100
D-Phe	2,5	0	0
α-Me-L-Phe	2,5	0	0
α-Me-L-Phe	10	0	0

Из литературных данных известно, что для L-ФАЛ из *R. gracilis* имеет место типичная зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнвивера-Пейкерт (рис.1). Минимум для L-ФАЛ из этого штамма равен $2,5 \times 10^{-3}$ моль/л. Аналогичный вид имеет график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата и в данном случае. Тем самым фермент действительно графически, равны для L-ФАЛ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LGI-73, $K_m = 2,5 \times 10^{-3}$ моль/л, $V_{max} = 426$ мкмоль/сек/мг белка.

L-ФАЛ для проведения кинетических исследований должен находиться в состоянии не связанности с L-Али, поэтому изучение на активности фермента. Ранее показано влияние ионов металлов на ферменты дрожжей в конечной концентрации от 2 мМ и выше [2, 3]. L-ФАЛ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LGI-73 (табл.3). Ионы Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} оказывают замедляющее влияние на активность L-ФАЛ, тогда как Ca^{+2} , Zn^{+2} ингибируют активность обоих ферментов. Соединения Co^{+2} и Ni^{+2} , то здесь обнаруживается некоторое разное действие. Так, ионы Co^{+2} и Ni^{+2} сильно ингибируют активность фермента из штамма мутанта, тогда как фермент из штамма мутанта они оказывают лишь слабое воздействие.

Таблица 3. Сравнение действия ионов Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} и Ni^{+2} на L-ФАЛ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LGI-73

Mg^{+2}	Относительная активность, % L-ФАЛ (Ry 335)	Относительная активность, % L-ФАЛ (LGI-73)
Контроль	100	100

Cu ⁺²	14	80
Cd ⁺²	13	6
Zn ⁺²	17	0
Ba ⁺²	92	90
Mn ⁺²	94	81
Ni ⁺²	7	63
Mg ⁺²	95	93
Ca ⁺²	98	90

Таким образом, I-ФАЛ-ы, выделенные из дрожжей *R. gracilis* Ry 335 и его производного LGF-73, будучи в целом близкими по своим свойствам, обнаруживают некоторые различия в оптимальных для активности значениях pH, константах Михаэлиса и M_i субстратами. Наибольшее различие отмечается в воздействии и активности этих ферментов конов двухвалентных металлов Cu⁺² и Ni⁺².

ЛИТЕРАТУРА

1. Abell C.W. and et al. Methods Enzymol., 142, 242-248, 1987.
2. Adachi O. and et al. Agric. Biol. Chem., 54, 2839-2843, 1990.
3. Osborn M.A. and et al. Int. J. Biochem., 20, 217-222, 1988.
4. Evans J. L. and et al. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 28, 366-414, 1987.
5. Gilbert H. J. and Luffy M. Biochem. Biophys. Res Commun., 131, 957-960, 1985.
6. Davie, I. A. Methods Enzymol., 142, 248-253, 1987.
7. Gargus J. S., J. Biol. Chem., 246, 2977-2985, 1971.
8. Jones S. and et al. Biochem. Biophys. Res Commun., 141, 165-170, 1987.
9. Martin J. and et al. Biochem. Int., 24, 1-11, 1991.
10. Lopez-Villaverde R. and et al. Plant Physiol. Biochem., 29, 153-161, 1991.
11. Weber K., Osborn M., J. Biol. Chem., 244, 4406-4412, 1969.

Получено 19.07.1994

Ученый журн. Армения, 2 (48), 1995

УДК 576.851.48.1

1-ФЕНИЛАЛАНИН АМИНАК-ЛИАЗА ИЗ *Rhodotorula gracilis* Ry 335 И *Rhodotorula gracilis* LGF-73. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, СТАБИЛИЗАЦИЯ СУБСТРАТАМИ

А.С.САРСЯН, Х.О.БЕЗИРДЖЯН, Н.В.ТОРАЛЯН

Научно-исследовательский институт "Биохимия", Ереван

Приведены результаты сравнительного изучения термостабильности и pH-зависимости 1-фенилаланин аминк-лиазы из родофильского штамма *Rhodotorula gracilis* Ry 335 и его мутанта LGF-73. Изучено влияние продуктов реакции паразитоксикурбиеназа и 5,5'-динитробис (2-нитробензойной кислоты) на активность