

## ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян Г.А., йабуров В.Р., Бруликович Г.Л. // Известия АН АрмССР. № 128, 129, 1979.
2. Григорян Г.А. // Ученые записки армянского института физиологии нейронов соматического аппарата. № 270, Кн. 1, 1974.
3. Pritchard P., Zelcer M., Conn F., Manzoni T. J. Comp. Neurol. , 263, 159-178, 1990.
4. Cervos-Navarro J.J., Mekhora G.M., Mekhora T. Exp. Brain Res. , 35, 295-314, 1979.
5. Cotman C.W., Necto-Santos M. Annu. Rev. Psychol. , 33, 9, 271-451, 1982.
6. Duran-Smith L., Körster J., Molin H., Yokota T. J. Physiol. (Lond.) , 187, 551-669, 1966.
7. Hassler R., Mutt-Clement K. J. Hirnforsch. , 66, 377-420, 1964.
8. Jansen H.D., Arvidsson-Asturias C.A. A stereotaxic atlas of the dorsal nucleus of the vagus nerve. Natl. Res. Council Can. , 90, 1954.
9. Jones E.G., Lovett E. J. Comp. Neurol. , 152, 4, 349-377, 1974.
10. Jucker G., Pernoll L. S. Br. Res. , 9, 1, 71-94, 1966.
11. Jones E.G., Lovett E.P.S. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. , 252, 43-62, 1970.
12. Manzoni T., Caminiti R., Spadolieri G., Mazzelli E. Exp. Brain Res. , 24, 153-171, 1972.
13. Matsuhashi-Miwa H. Histochem. and Cytochem. , 26, 2, 165-117, 1978.
14. Reutter Sander F. Topographischer Hirnatlas der Katze. Unna-Stadt, 1. Aufl., 160, 1961.
15. Rodkey C.N. Biological and biochemical basis of behavior. Madison et al. University Press, 63-81, 1958.

Научный рецензент: Г.Г. Григорян

Издано в журн. Армен. 2 (42), 1995

УДК 576.851.45

## ВЫШЕНИЕ ОЧИСТКА И СРАВИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА 1-ФЕНИЛДИАМНОЛЮМИНОК-ЛЮЦЕН-112 ПРЕПАРАТА ПРИЖИГА *Rhodotorula gracilis* Ry 335 И ЕГО МУТАНТА РУ-73

А.С. САРСЯН, Х.О. ВЕЗИРЯН, П.В. ГОВАЛАКИ

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Способ очистки 1-фенилдиминогидразина из аммиак-воды, использующий циклический диамоний аммония, ионообменную хроматографию на DEAE-аминогидрате (DEAE-АГ) и фильтрацию на септексе 6-200. Применение очищенного и стерильного риса: физико-химические, катионитические, спиртовые, ферментативные свойства, выделение из родиолеского гиббера *Rhodotorula gracilis* Ry 335 и его мутанта Ру-73.

Использование 1-1-фенилдиминогидразина (фадиф) (Ру-73) для получения плюсовых природных 1-фенилдиминогидразидов из фадифа и фадифа-гидразидов (фадифа-гидразидов) в 10-15% выходе. Идея Нагорнякова С.И. [1991] и фильтрация на септексе 6-200. Применение очищенных и стерильных риса: физико-химические, катионитовые, спиртовые, ферментативные свойства 1-ФД-Лю и его мутанта 1-ФД-Лю-73. Родиолеский гиббер *Rhodotorula gracilis* Ry 335 и его мутант Ру-73.

The method for 1-phenylalanine hydrazide purification is described, which has been modified. Purification with ammonium sulfate, ion-exchange chromatography on DEAE-AG and 200 filtration on Sephadex 6-200. As a result, electrophoretic, ionogenic properties of 1-PAD are obtained. Some physico-chemical and catalytic properties of 1-

PAE from wild-type yeast *Rhodotorula gracilis* Ry 335 and its mutant I (Ge-7) have been investigated and compared.

**Продукты *Rhodotorula gracilis*-феноксигуары - их спецификация - сдвиги в спектре сопоставляемости.**

L-Фенилаланин амидаза (L-ФАД)-ЕС 4.3.1.5., которая приводит к образованию транс-коричной кислоты из L-фенилаланина неспецифически гемами и гомоцистином. Фермент выделен из грибов [2], бактерий [1-7] и высших растений [3,6,9,10]. Описаны некоторые физико-химические и катализатические свойства его. Согласно последним сообщениям, белок имеет пыльцевидную форму L-ФАД в фторесцеине-протеина, при этом в результате стабилизации ферментативной активности и наращивания кетогруппы транс-коричной кислоты фермент в гермине феноксигуара [3] и, что не менее важно, биологическое присоединение к нему биотиния. Для определения тиол-полупротонного состояния L-ФАД используется метод блокирования транс-коричной кислоты [4].

Целью настоящей работы явилось выявление различий в спектре сопоставляемости изучение рекомбинантных физико-химических и катализатических свойств L-ФАД из двух различных видов: гриба-феноксигуара *Rhodotorula gracilis* Ry 335 и его мутанта I (Ge-7).

**Материалы и методы.** Биоматериалы получены из грибов-феноксигуар путем [5] и некоторыми модификациями по методу Альбрука [6] из грибов-феноксигуар. Микроорганизмы содержали 10-12% сухого вещества, 8,5 г фенилаланина на 1 л питательной среды, 10-50 мкг витамина В<sub>1</sub>, 20 мкг витамина С, 10 мкг витамина Е, 10 мкг витамина Н. Кетогруппы кислоты содержали выше. О ходе засева судят по уменьшению вспенивания при 200 нм с первых же суток. Активность фермента определяется образование L-уксусной феноксигуарной кислоты в единицах МКТУ.

Содержание белка определяли по методу Лоурса [7] с использованием биочистой субстратной индикаторной Альбрука [6]. L-ФАД выделен из грибов *Rhodotorula gracilis* Ry 335 (искусственная культура МГБ, МГУ) и его мутанта I (Гриб феноксигуарного Ге-73 (ГКНИ СССР), полученный в Институте биотехнологии). Прежде кератинизацию среды проводят с помощью смеси желатина - 1%, грибожелатина - 1%, №С-1-0,5% L-Phe, 0,05% рН-6,0. Продукт с избытком дают в течение 24 часов при температуре 30°. Клетки отсеивают, фагофагированием и хранят при -12°.

Все операции проводят при комнатной температуре от 15 до 20° с использованием ароматографической системы "Иса-6" в условиях Грифа "Монитор". Для этих целей остатки кератинизированной продукции при 15-18° в течение 30 мин в петрифите К-21 (гермине). Все колбы были предварительно пропущены через струйками буферами. Для получения белка коптильного изготавливают суспензию в 40 мл 50 мМ три-Н-Гц (рН 7,2). Суспензия подвергается ультрафильтрации (60 с x 15) в ламинатрической фильтре "Гавас-6" (Нермания) в КП-1.

Фракционные кистки удаляют из петрифите-бактерии. Для обработки пыльцы добавляют к размолотной жидкости при перемешивании по часовой стрелке сокращенные растворы с 10% спирто-водными сыворотками и 10% водным концентратом 2%. Используются различные концентрации сыворотки в зависимости от ферментативной активности. Установлено, что оптимальная концентрация сыворотки для ферментации составляет 10% (рис. 1). При этом же концентрации сыворотки ферментативная активность достигает 100% от максимальной. Добавление сыворотки в количестве 20% снижает ферментативную активность в 2 раза. Добавление сыворотки в количестве 30% снижает ферментативную активность в 3 раза. Добавление сыворотки в количестве 40% снижает ферментативную активность в 4 раза. Добавление сыворотки в количестве 50% снижает ферментативную активность в 5 раз. Добавление сыворотки в количестве 60% снижает ферментативную активность в 6 раз. Добавление сыворотки в количестве 70% снижает ферментативную активность в 7 раз. Добавление сыворотки в количестве 80% снижает ферментативную активность в 8 раз. Добавление сыворотки в количестве 90% снижает ферментативную активность в 9 раз. Добавление сыворотки в количестве 100% снижает ферментативную активность в 10 раз.

с ДЕАЕ-ТР (2.5 x 36) Колонку промывали буфером А затем белки засыпали в липопоти градиенте NaCl 1:от 0 до 0.3 М в буфере А (0.8). Скорость вспени 33 мл/час. Объединенные активные фракции (50 мг) ковалентировали с помощью сульфата аммония 80%-ного концентрации. Осадок, полученный после центрифугирования, растворяли в 3 мл буфера А и хроматографировали на колонке с сепадексом G-200 (1.5 x 68 см). Гель-фильтрация проводили буфером А со скоростью 8 мл/час. Активные фракции были объединены (10 мл), сконцентрированы с помощью сульфата аммония 80%-ного концентрации. Полученный препарат фермента рекомбинантного из колонки с сепадексом G-200 в тех же условиях. Активные фракции объединены (5.4 мл) и хранятся в 40%-ном глицерите при -12° (табл.1).

Частоту L-ФАЛ определяли спектрофотометром в 10%-ном ПЛАГ с добавлением гелевого агента (ПЛАГ) на приборе модели "Iso" (США) [11], выявляющем одну белковую полосу, обладающую L-ФАЛ-активностью. Белки в гелевых струйках красят 0.2% -ным водным раствором кумасси R-250, содержатым также 10% -ную уксусную кислоту и 25%-ный этиловый спирт.

Значение  $M_r$  субъединицы определяли электрофорезом в 10%-ном ПЛАГ с добавлением додецилсульфата натрия (DS-Na) [11]. Были использованы следующие маркеры: фосфорилаза В (94 000), альбумин (67 000), свальбумин (43 000), карбонилпептидаза (31 000), ингибитор тритиэлена (20 600), гифа-лактальбумин (14 400).

Цар определения оптимальных значений pH для фермента были использованы трех-интегральные буферные смеси с различными значениями pH (диапазон pH 5.0-9.0), содержание 10 мМ L-Рне. Перед измерением активности проводили притекущим ферментом в буферной смеси с соотношением звательным pH при 30° в течение 5 минут.

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

Во всех экспериментах японизолаты фермента: препарат с удельной активностью 2 Е/мг белка, предварительно дигидрованный против 2.5 мМ тире-ИСТ (pH 8.5).

Реактивы: L-фенилаланин, трипто кумасси R-250, акриамид, N,N-метиленбисакриламида ("Serva", Германия), ДЕАЕ-ТР 650 М "Boyc Soda MGF" (оф. 11, Япония), додецилсульфат-натрия ("Sigma", США). Остальные реактивы - "Раджом" квалификации чистотой 99%.

**Результаты и обсуждение.** Разработана схема очистки L-ФАЛ из культуры дрожжей *R. gracilis* Ry 335 и LGL-73, включающая несколько стадий: фракционирование сульфатом аммония, низкообъемная хроматография на ДЕАЕ-ТР, гель-фильтрация на сепадексе G-200 и повторная гель-фильтрация в тех же условиях. Схема очистки приведена в табл. 1. В результате очистки были получены электрофоретически гомогенные ферментативные препараты L-ФАЛ.

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

Этапы	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Степень выхода, %
Экстракт	6500	66.9	0.0103	1.0
Сульфат аммония	1875	60.0	0.032	3.4
ДЕАЕ-ТР	507	56.0	0.11	11.4
Сепадекс G-200	20	20.0	1.00	97.0
Сепадекс G-200	1.5	10.0	6.66	666.0

Ферменты, выделенные нами, мигрировали в геле при электрофорезе в присутствии DS-Na одной полосой с  $M_r$ , равными 60600 и 71000 шт. L-ФАЛ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LGL-73 соответственно.

При изучении оптимальных доз агентов: цинкной РН и цианурум фермента обнаружены некоторые различия. Так, оптимальная РН для ЦФАИ из *R. gracilis* Ry 335 лежит в области от 8,5 до 9,5 го агента, для ЦФАИ из *R. gracilis* LCh-73 в это диапазоне несколько шире (РН 7,5-9,5).

Результаты изучения субстратной специфичности ЦФАИ из двух выискусственных пигментов приведены в табл. 2. В обоих случаях фермент более специфичен по отношению к L-Рибо и L-Гут по сравнению с L-Глн, D-Рибо, а-Ме-L-Рибо не являются субстратами для фермента.

*Таблица 2. Сравнение субстратной специфичности ЦФАИ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LCh-73*

Субстрат	Концентрация субстрата, мкг	Оптимальная активность, % ЦФАИ (Ry 335)	Оптимальная активность, % ЦФАИ (LCh-73)
L-Рибо	2,5	100	100
D-Рибо	2,5	0	15
L-Глн	2,5	10,2	15
D-Глн	2,5	0	10
а-Ме-L-Рибо	2,5	0	0
а-Ме-L-Глн	4,0	0	0

На изотермических цепных измерениях, что для *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* имеет место, линейная зависимость между концентрацией субстрата и субстратной активностью фермента. Найденные нами для ЦФАИ при этих объектах равны 250 и 200 мкг/мл. Аналогичный же метод графиков показал, что для ЦФАИ из конъюгированного субстрата в нашем случае График имеет линейный графический вид ЦФАИ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LCh-73 имеет 426 мкмод. сплошностью.

ЦФАИ из пропионата кальция имеет определенную активность, что может быть объяснено постоянством ЦФАИ, определенной активности фермента. Такие подобные данные в литературе по изучению других бактерий в конечной концентрации 2 мкг/мл получены для фермента *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LCh-73 (1960,5). Используя  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  для окончания засоренного кипения на активность ЦФАИ, когда  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  выбирают активность обоих ферментов. Но если заменить  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ , то здесь обнаруживается некоторое различие. Так, если  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  сильно избирательно активность фермента в одинаковой степени, то на фермент из чистой муки она оказывает лишь в 1,5 раза большее действие.

*Таблица 3. Сравнение активности  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  для ЦФАИ из *R. gracilis* Ry 335 и *R. gracilis* LCh-73*

Металл	Оптимальная активность % ЦФАИ (Ry 335)	Оптимальная активность % ЦФАИ (LCh-73)
$\text{Mg}^{2+}$	100	100

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

Таким образом, I-ФАЛ-ы, выделенные из дрожжей *R. gracilis* Ry 335 и его производного LGE-73, будучи в целом близки по своим свойствам, обнаруживают некоторые различия в оптимальных концентрациях ионов Михаэля и М<sub>1</sub> субстратов. Наибольшее различие отмечается в воздействии на активность этих формиков ионов двухвалентных металлов  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Ni}^{+2}$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Hil C.H. and et al. Methods Enzymol., 142, 242-248, 1987.
2. Andrade C. and et al. Agric. Biol. Chem., 54, 2839-2845, 1990.
3. Oberholzer A. and et al. Int. J. Biochem., 20, 217-222, 1988.
4. Olsnes S., Lysby H. and et al. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 35, 356-364, 1990.
5. Olsnes S. and Lysby M. Biophys. Biophys. Res. Commun., 131, 557-562, 1985.
6. Olsnes S. and Lysby M. Methods Enzymol., 142, 248-253, 1987.
7. Olsnes S. and Lysby M. J. Biol. Chem., 246, 2977-2985, 1971.
8. Olsnes S. and Lysby M. Biophys. Biophys. Res. Commun., 142, 165-170, 1989.
9. Olsnes S. and Lysby M. Biochem. Int., 24, 1-11, 1991.
10. Lopez-Villalba R. and et al. Plant Physiol. Biochem., 29, 151-161, 1991.
11. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412, 1969.

Получена 19.07.1994

Журн. журн. Армен.нн. 2 (48), 1995

УДК 576.851.48.1

## I-ФЕНИЛДИАМИН АММИАК-ЛИАЗА ИЗ *Rhodotorula gracilis* Ry 335 И *Rhodotorula gracilis* LGE-73. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. СТАБИЛИЗАЦИЯ СУБСТРАТОВ

А.С. САРИСЯН, Х.О. БЕЗИРДЖЯН, Н.В. ГОГАЛАКЯН

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Приведены результаты сравнительного изучения термостабильности и pH-чувствительности I-фенилдигидроамиак-лиазы из родотилльского штамма *Rhodotorula gracilis* Ry 335 и его мутанта LGE-73. Изучено влияние подсолнечного реагента (пироксеркурбензата) и 5,5'-дигидро-2-нитробензойной кислоты на активность