

разнокачественной пылью. Во всех случаях процент фертильности как в норме, так и в варианте с ГК довольно высокий. Это, по всей вероятности, обусловлено физиологической устойчивостью пыльцы к последствиям нарушения баланса хромосом.

Полученные нами результаты свидетельствуют о наличии у растений томата ряда нарушений, частота и спектр которых неодинаковы на отдельных стадиях мейоза. Уровень фертильности пыльцы одинаково высокий как в контроле, так и у растений в M_2 .

Таким образом, мейотический эффект испытуемой концентрации ГК у растений томата в M_2 не существует, а при образовании пыльцы он не проявляется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Цитология и генетика, 5, 3, 1971.
2. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Биолог. ж. Армении, 33, 7, 1980.
3. Виленский Е. Р. Физиологические и генетические механизмы гомеостаза у растений. IV съезд ВОГиС им. Вавилова, 2, 85, Кишинев, 1982.
4. Регуляторы роста и развития растений. Геогр. докл. I Всесоюзн. конф., М., 1981.
5. Саркисова М. М., Оганесян Р. С., Агамян А. Б. Биолог. ж. Армении, 33, 9, 1980.
6. Цитология и генетика мейоза. Под ред. Хвостовой В. В. и Богданова Ю. Ф., М., 1975.
7. Eux Therman and Sirkka Kyppila. Arch. Soc. Zool. bot. Fennicae "Vanamo", 18, 2, 127—30, 1963.
8. Grower J. S., Tyagi P. S. Science and culture, June, 46, 6, 217—229, 1980.
9. Soheir M. Amer. and Ebnam M. Ann. Cytologia, 45, 715—719, 1960.

Поступила 25.X 1984 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 4, 1986, 373—377, 1985

УДК 577.15.591.8

ВЛИЯНИЕ ТИОЛОВЫХ РЕАГЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ ОКСИДАЗЫ Д-АМИНОКИСЛОТ У *ASPERGILLUS NIGER* R-1

С. П. ОГАНЕСЯН, А. Г. БАБАЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Аннотация — Меркаптоэтанол и ПХМБ в концентрации 5 мкМ ингибируют, а глутатион и п-бензохинон не оказывают влияния на активность оксидазы Д-аминокислот *Asp. niger* R-1. Ионы Fe^{2+} , Fe^{3+} существенно не влияют на него, а ионы кадмия в концентрации 20 мкМ являются сильными ингибиторами. Восстановленный глутатион (10 мкМ) предохраняет фермент от ингибирующего влияния ПХМБ на 20%. Ингибирующее влияние ПХМБ и кадмия указывает на наличие тиоловых групп в активном центре фермента. K_m для Д-метионина равен 0,3 мкМ.

Անոտացիա — Սերկապտոէթանոլը և ՍԽՄԵ-ն 5 մկՄ կոնցենտրացիայի զեպրումը ընկճում են, իսկ գլուտաթիոնը և ք-բենզոքինոնը չեն ազդում *Asp. niger* R-1-ի ընկճմանը: Դ-ամինաթթվային օքսիդազների ակտիվության վրա երկնիքի Fe^{2+} , Fe^{3+} -ը նկատելի ազդեցություն չեն ցուցաբերում, իսկ Cd^{2+} -ի

իոնները 20 մկՄ կոնցենտրացիայի դեպքում խիստ ընկճում են ֆերմենտի ակտիվությունը: Վերականգնված գլուտաթիոնը (10 մկՄ) վերացնում է ՄՄՄ-ի ընկճող ազդեցությունը 20%-ով: ՄՄՄ-ի և Cd^{++} -ի ընկճող ազդեցությունը վերացնում է ակտիվ կենտրոնում գործող թթուային խմբերի առկայության ծախսի K_m -ը մեթիոնին: Ծախսը նախատար է 0,3 մկՄ-ի:

Abstract — Mercaptoethanol and PIMB inhibit, whereas glutation and n-benzochinone have no influence on oxidases of *Asp. niger* R-1. Ions of Fe^{++} , Fe^{3+} have no great influence on it, but Cd^{++} ions are great inhibitors with 20 mkM concentration. The recovered glutation (10 mkM) prevents inhibitory influence of PIMB on the enzyme by 20 per cent. Inhibitory influence of PIMB and Cd^{++} show the presence of thiol groups in the active centre of enzyme. K_m of the enzyme is equal to 0,3 mkM.

Ключевые слова: гриб плесневый *Aspergillus niger*, тиоловые реагенты, оксидазы

Использование производственных отходов в качестве сырья для получения кормового белка и ферментов микробного происхождения очень актуально. В нашей стране и других промышленно развитых странах ведутся интенсивные исследования, направленные на получение препаратов различных ферментов из плесневых грибов и бактерий.

Ранее нами была установлена активность и частично очищен Д-аминокислотная оксидаза плесневого гриба *Aspergillus niger* R-1, применяемого в качестве продуцента лимонной кислоты [1, 2]. По ряду физико-химических свойств она оказалась близкой Д-аминокислотной оксидазе животных [3, 7—9] и микроорганизмов [4—6].

Целью наших исследований являлось выявление в активном центре фермента химических группировок, играющих существенную роль в каталитической активности.

Материал и методика. Объектом исследований служил *Asp. niger* R-1, полученный в Спитякского лимоннокислого завода. Выращивание плесней, определение ферментативной активности и способ очистки фермента проводили по ранее описанным методам [1, 2]. Активность фермента выражали в микромолях NH_3 , выделяющегося при часовой инкубации, на 1 г свежего мицелия. Удельную активность выражали в мкМ NH_3 на 1 мг белка.

Тиоловые группы — парахлормеркурибензоат (ПХМБ), парабензохинон, меркаптоэтанол (МЭ), глутатион восстановленный (G-SH) — добавляли в концентрациях, указанных в соответствующих таблицах, непосредственно в инкубационную среду и вместе с ферментом выдерживали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли соответствующий субстрат.

Результаты и обсуждение. Прежде чем исследовать влияние ре- агентов на тиоловые группы, мы получили частичку очищенный ферментный препарат по ранее разработанному способу. Степень очистки фермента была равна 10, а выход составлял — 70%.

В первой серии экспериментов исследовали влияние различных концентраций ПХМБ, меркаптоэтанола, восстановленного глутатиона, а также ингибитора п-бензохинона на активность фермента.

Согласно данным табл. 1, эффективными ингибиторами плесневой Д-аминокислотной оксидазы оказались ПХМБ и, несколько неожиданно, меркаптоэтанол, начиная с концентрации 5 мкМ. При concentra-

Таблица 1. Влияние ПХМБ, меркаптоэтанола, п-бензохинона и глутаминна на активность Д-аминокислотных оксидаз у *Asp. niger* R-1

Концентрация, мкМ	Активность фермента, мкМ NH ₃ на 1 г мицелия	Активность фермента, %	Концентрация, мкМ	Активность фермента, мкМ NH ₃ на 1 г мицелия	Активность фермента, %
ПХМБ	экстракт-22	100	G-SH		
5	6.1	28	5	21.5	98
10	2.2	10	10	20.4	93
20	0	0.1	20	20.2	92
МЭ			п-бензохинон		
5	6.6	30	5	19.8	90
10	3.5	16	10	19.1	87
20	1.1	5	20	17.6	80

или 10 и 20 мкМ активность фермента полностью ингибируется (95—100%). Ингибирующее влияние ПХМБ указывает на наличие SH-групп в активном центре фермента. Трудно объяснить ингибирующее влияние меркаптоэтанола, тем более что глутатион в тех же концентрациях не оказывает влияния на активность изучаемой оксидазы. Любопытно, что классический ингибитор аминокислотной оксидазы п-бензохинон не ингибирует активность этого фермента.

Исследовалось также восстановление активности оксидазы Д-аминокислот восстановленным глутатионом после десятиминутной прединкубации ее с ПХМБ. Использованный в эквимольных с ингибитором концентрациях восстанавливающий агент глутатион (восстановленный), оказывающий защитное действие на тиоловые группы (рис. 1), несколько

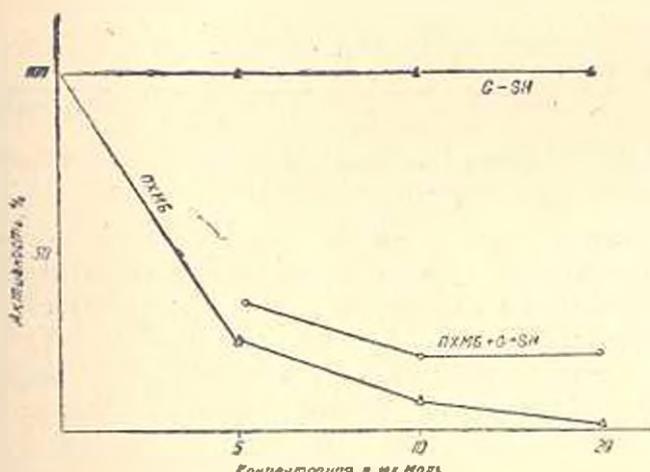


Рис. 1. Восстанавливающее действие глутатиона на активность оксидазы Д-аминокислот у *Asp. niger* R-1.

ко восстанавливает активность фермента и предохраняет его от действия ПХМБ начиная с концентрации 5 мкМ. При этой концентрации глутатион предохраняет от ингибирования всего на 10%, а при концентрации 20 мкМ — на 21%.

По литературным данным, из тиоловых реагентов ПХМБ является ингибитором для оксидазы индуцированного к фенилаланину штамма *Asp. niger*.

Интересно было выяснить также влияние ионов двухвалентных металлов на активность плесневой D-аминокислотной оксидазы.

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что в концентрации 10 мкМ Fe^{+2} , Fe^{+3} не оказывают существенного влияния на активность фермента. Однако Cd^{+2} в той же концентрации резко ингибирует ее.

Таблица 2. Влияние двух- и трехвалентных ионов металлов на активность оксидазы D-аминокислот, мкМ на 1 г мицелия

Показатели	Концентрация ионов, мкМ						
	Fe^{+2}		Fe^{+3}		Cd^{+2}		
	5	10	5	10	5	10	20
Исходная активность — 24	—	—	—	—	—	—	—
В присутствии ионов металлов	23	23	23	23,8	20	0	3
Процент ингибирования	4,2	4,2	4,2	1,0	16,6	75	87,5

Полученные результаты согласуются с данными литературы об ингибированном к фенилаланину штамме *Asp. niger* [4].

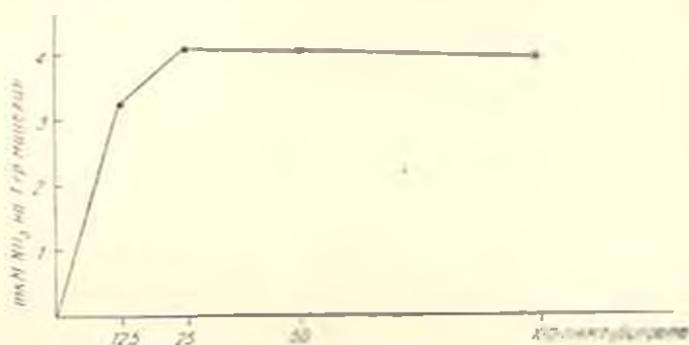


Рис. 2. Активность оксидазы D-аминокислот в зависимости от концентрации D-метионина.

Исследовалась также зависимость активности оксидазы D-аминокислот от концентрации субстрата. Данные рис. 2 наглядно показывают, что максимальная активность фермента проявляется при концентрации субстрата 25 мкМ и выше. K_m определялся по графическому методу Лайнуивера-Берка, значение его оказалось равным 0,3 мкМ (рис. 3), что указывает на большое сродство фермента к D-ме-

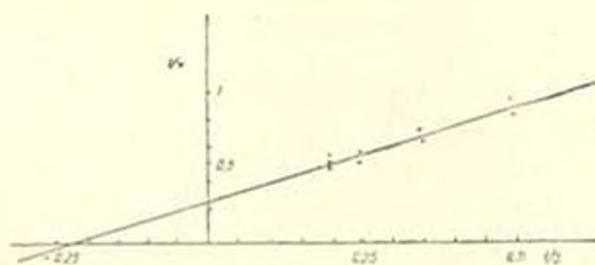


Рис. 3. Определение величины K_m для D-метионина.

тионину и *Asp. niger* R-1. Оно не сходно с K_m для фермента, выделенного из индуцированного штамма *Asp. niger*,—0,9 мМ [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Даутян М. А., Оганесян С. П. Биолог. ж. Армении, 26, 11, 1019, 1983.
2. Оганесян С. П., Даутян М. А. Биолог. ж. Армении, 36, 5, 367, 1983.
3. Frickeisen D. H., Brown G. W. J. Fish. Biol., 10, 457, 1977.
4. Kishore G., Valdyanathan G. S. India J. Biochem. Biophys., 13, 216, 1967.
5. Kawamoto S., Kobayashi M., Tanaka A., Fukui S. J. Ferment. Technol., 55, 13, 1977.
6. Nasu Satoshi, Wiks Frank D., Choison Robert K. Biochim et Biophys. Acta, 704, 2, 242, 1982.
7. Posenteld M., Letter G., Edward H. Can. J. Biochem., 55, 1, 66, 1977.
8. Porter David J. T., Bright Harold J. J. Biol. chem., 251, 19, 6150, 1976.
9. Raunio R. P., D'ARi, Straus L., Jenkins W. T. J. Bact., 115, 2, 1973.

Поступило 11 XII 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 5, стр. 377—381, 1986

УДК 576.312.32/38

ВЛИЯНИЕ АКТИНОМИЦИНА-Д НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНУЮ ОКРАШИВАЕМОСТЬ ХРОСОМОМ ЧЕЛОВЕКА

С. А. МИДЯН

НИИ акушерства и гинекологии им. Н. К. Крупской МЗ Армянской ССР

Аннотация — Получены препараты высокодифференцированных по длине хромосом на разных стадиях митоза при обработке культур лимфоцитов актиномицином-Д на стадии G_2 клеточного цикла. Количество G-положительных и G-отрицательных дисков на гаплоидный набор в прометафазе составило 720, на стадии зрелой метафазы — 310.

Անոտացիոն — Խոստացված են շարքեր զիֆերենցում պարունակող քրոմոսոմային պրե-պարատներ Տրիթոֆի տարրեր ստացվածներում լիմֆոցիտների կուլտուրաները Գ-ստա-տիոնմիջինում մշակելիս բջջային ջրիկի G_2 ստադիայում: G-դրական և G-բացա-սական զիսկների թիվը պրոմեթաֆազում հասնում է 720-ի, իսկ նույնը մեթաֆա-զում՝ 310-ի:

Abstract — Well-differentiated chromosome preparations have been obtained in different stages of mitosis during the treatment of lymphocytes cultures with actinomycin-D in G_2 stage of cellular cycle. The number of G-positive and G-negative bands observed per haploid set in prometaphase is 720, mid-metaphase-310.

Ключевые слова: актиномицин-Д, хромосомы человека, стадии клеточного цикла.

В цитогенетике человека в последнее время благодаря новым методическим приемам наметился подход, открывающий большие перспекти-вы в области изучения хромосом человека. Это касается прежде все-го исследования хромосом в прометафазе и профазе митоза. Из-за