

выми молекулами. Результаты, полученные с тимидином, и значительные различия в тепловых эффектах свидетельствуют о специфичности действия белка. Это согласуется с результатами изучения плавления различных ДНК, продемонстрировавшими преимущественную стабилизацию белком областей ДНК, богатых АТ-парами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические исследования мембран (под ред. Э. Мэдди). 49—50, М., 1979.
2. Будкер В. Г., Соколов А. В., Вайнер Л. М., Крийнев А. Г. Биол. мембраны, 4, 1, 55—66, 1987.
3. Габриелян А. Г., Аракелян А. Г., Захарян Р. А. В сб.: Конформационные изменения биополимеров в растворах. Мат-лы VI Всесоюз. симп., 145. Тбилиси, 1985.
4. Габриелян А. Г., Карагезян К. С., Захарян Р. А. В сб.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. 10, Ереван, 1983.
5. Габриелян А. Г., Гукасян Н. А., Аракелян А. Г. Биолог. ж. Армении, 39, 4, 303—309, 1986.
6. Габриелян А. Г. Биофизика, 22, 5, 789—793, 1977.
7. Гринюс Л. Л. Транспорт макромолекул у бактерий. М., 1986.
8. Захарян Р. А., Карагезян К. С. Структура и функции белков и нуклеиновых кислот. Мат-лы VI симп. СССР—Франция, 132, Цхалтубо, 1982.
9. Сухоруков Б. И., Кувичкин В. В., Шабарчина Л. И. Биофизика, 25, 2, 270—275, 1980.
10. Шабарчина Л. И., Сухоруков Б. И., Шоинева Н. В., Коломийцева И. К. Биофизика, 20, 366, 1975.
11. Alberts B., Herrick G. Meth. Enzymol., 21D, 198—217, 1971.
12. Bhargava P. M., Shammugam G. In Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. (Davidson J. M., Cohn W. E. eds.), 11, 103—192, Acad. Press, N.—J.—London, 1971.
13. Brostus B., Riesner D., Hillen W. J. Biomol. Struct. Dynam., 1, 1535—1541, 1984.
14. Gabor G., Bennett R. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1034—1034, 1984.
15. Hippel P. H. von., Schleich Th. In Structure and stability of biological macromolecules (ed. by Tymasheli S. N., Fasman G. D.), Marcel Dekker, N.—J., 1969.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
17. Ohtbaum A., Csuzi S., Antoni F. Acta Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung., 14, 3, 165—176, 1969.
18. Robinson D. K., Grant M. J. J. Biol. Chem., 241, 4030, 1966.
19. 6-th European meeting on bacterial transformation and transfection (abstracts), Lisbon, 1982.

Поступило 26.VI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 10, № 10, 811—815, 1987

УДК 577.152.1

ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРА НА ФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *CORIOLUS VERSICOLOR*

З. Н. БАГДАСАРЯН, Г. С. ПЕНАЯН, А. М. МЕЖЛУМЯН, В. Г. ПАСОЯН

Армянский филиал ВНИИ ИРЕА «РЕАХРОМ», Ереван

Аннотация — Исследовано влияние ароматических аминов 2,5-ксилидина и сервокислого о-толуидина на выход индуцибельной формы медьсодержащей голубой оксидазы лакказы.

Максимальный выход фермента получается при добавлении в качестве индуктора 2,5-ксилидина с конечной концентрацией 2×10^{-4} М к 9—12-суточной культуре в стационарной фазе роста и индукции в течение трех суток при pH 5,0.



Անտաքիա — Հետազոտված է արոմատիկ ամինների 2,5-քսիլիդինի և ծծմբա-
 թթվական Օ-տոլուիդինի ազդեցությունը ինդուկցիվոր լակկազայի, պղինձ պա-
 րունակող կապույտ օքսիդազայի ներքի վրա: Յերմանի առավելագույն ելքը ստաց-
 վում է, երբ 9—12 օրեկան կուլտուրային աճման ստացրոնար ֆազայում որպես
 ինդուկտոր ավելացվում է 2,5 քսիլիդին՝ $2 \cdot 10^{-4}$ մոլ վերջնական կոնցենտրացիա-
 յով, երբ օր ինդուկցիայի տևողությունը pH 5,0 պայմաններում:

Abstract — The influence of aromatic amines such as 2,5—xylydine, as well as o—toluidine sulphate on the yield of Inducible form of copper-containing oxidase, laccase was observed. The highest activity was obtained, when 2,5—xylydine was added as an inductor after 9—12 days in stationary phase of growth culture with the final concentration of $2 \cdot 10^{-4}$ M and induction period for 3-days, at pH 5,0.

Ключевые слова: лакказы, индукция, культивирование.

Лакказы (п-дифенол: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.14.18.1) катализируют реакцию окисления ароматических спиртов, аминов и неорганических ионов молекулярным кислородом, который восстанавливается до воды. Фермент получен из самых разных объектов. Богатым источником п-дифенолоксидазы является млечный сок тропических лакковых деревьев [1]. В качестве других источников можно назвать высшие растения (картофель, корнеплоды, яблоки, капуста, баклажан) [2—4] и грибы, особенно виды, вызывающие белую гниль древесины и разлагающие лигнин [5]. Наиболее изученной является лакказа из грибов *Coriolus versicolor* [6, 7] и латекса лакковых деревьев *Rhus vernicifera* и *Rhus succedanea* [8, 9]. Показано, что в базидиальных грибах лакказа может быть как в конститутивной, так и в индуцибельной формах. Появление внеклеточных ферментов в среде в значительной степени зависит от состава питательной среды. В литературе имеются данные о том, что использование в качестве добавок таких веществ, как лигнин [10] и его фенольные мономеры [11, 12], ведет к продуцированию внеклеточной лакказы. Так, активность внеклеточных лакказ *Neurospora crassa* обнаруживается только при выращивании культуры в среде с индуктором, в частности с циклогексамидом или актиномицином Д [13]. Подобный эффект наблюдается в среде с внеклеточными лакказами из грибов *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* и *Pholiota mutabilis*. Продуцирование внеклеточного фермента увеличивается при обработке культур фолиевой кислотой [14]. При культивировании гриба *Agaricus bisporus* индукция фермента циклогексамидом или другими потенциальными индукторами не обнаружена [15].

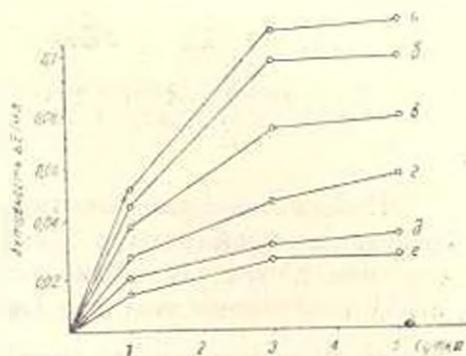
Целью настоящей работы являлось исследование влияния природы индуктора, его концентрации и сроков внесения на биосинтез и секрецию лакказы из гриба *Coriolus versicolor*.

Материал и методика. В качестве продуцента лакказы служила культура *Coriolus versicolor* sp. Шагам поддерживали на агаризованном сусле. В качестве посевного материала использовали трехсуточный инокулюм (6—8% по объему), выращенный на ферментационной среде при 28°. Культивирование гриба проводили стационарным глубинным способом на качалках (180 об/мин) при 28—30° в 500-миллилитровых колбах Эрленмейера, содержащих 110 мл синтетической питательной среды следующего состава (г/л): глюкоза—20, L-аспарагин—2,5, аденин—0,0275, D, L-фенил-

аланин—0,15, KH_2PO_4 —1, NaH_2PO_4 —0,1, $MgSO_4$ —0,5, $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,01, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4$ —0,001, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ —0,002 и тиамингидрихлорид—50 мкг [5]. pH среды после стерилизации $\approx 5,0$. Ситеса и секрецию фермента индуцировали добавлением 2,5-ксилидина и сернистого о-толуидина в 60%-ном растворе этилового спирта в определенные сроки роста культуры. При использовании в качестве индуктора сернистого о-толуидина pH среды доводили до 2,8—3,0. Ежедневно отбирали пробы, миделий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через бумажный фильтр и в фильтратах определяли pH, количество белка и ферментативную активность. Белок определяли спектрофотометрически при 280 мμ. Об относительной активности лакказы судили по изменению поглощения при 410 мμ в минуту в реакционной смеси, состоящей из 1 мл 0,1 М раствора пирокатехина, 1 мл 0,2 М кали-фосфатного буфера (pH 5,0) и 0,1 мл раствора фермента [16]. Все спектральные измерения проводили на спектроде «UV-VIS» (ГДР). Значения pH измеряли на pH-метр-милливольтметре РН-673. Пирокатехин очищали выгонкой в вакууме. Остальные реагенты были марки «Х.Ч.» и «ос. ч.».

Результаты и обсуждение. Анализируя имеющиеся в литературе данные о влиянии природы индуктора и его концентрации на выход внеклеточной лакказы, в частности, из представителей рода *Coriolic* [4, 16], мы остановили свой выбор на 2,5-ксилидине и сернистым о-толуидине. Представленные на рис. 1 кривые показывают, что выход

Рис. 1. Влияние природы и концентрации индуктора на выход лакказы в среду: а, б, в—2,5-ксилидин, 2 · 10⁻⁴, 2 · 10⁻³, 2 · 10⁻² М соответственно; г, д, е—сернистый о-толуидин с конечной концентрацией 2 · 10⁻⁴, 2 · 10⁻³, 2 · 10⁻² М.



фермента как в случае с о-толуидином, так и 2,5-ксилидином достигает максимальных значений уже на 3-и сутки индукции. Оптимальной из исследуемых концентраций является 2 · 10⁻² М (а, с). Наиболее эффективен 2,5-ксилидин. При внесении 2,5-ксилидина выход фермента увеличивается вдвое по сравнению с таковым при внесении сернистого о-толуидина.

Действие индуктора на накопление фермента в культуральной среде сильно зависит от сроков его внесения. Активность внеклеточных лакказ из *Neurospora crassa* выявлялась после внесения индуктора в первые сутки роста [14]. В случае с базидиальными грибами индуктор добавляют в фазе стационарного роста культуры [11]. В наших исследованиях индуктор вносился в разные сроки роста культуры, от 2 до 16 суток. В контрольных вариантах (выращивание культуры без добавок) секреция фермента не имела места.

До и после добавления индуктора через каждые 24 ч определяли ферментативную активность, кислотность среды и количество белка. Результаты исследований (рис. 2) показали, что максимальный выход лакказы достигается при внесении индуктора на 12—14 сутки роста,

при этом одновременно увеличивается и концентрация внеклеточного белка. Наибольшая удельная активность фермента наблюдается при внесении 2,5-ксилидина на 9-е сутки роста и 3-суточной инкубации.

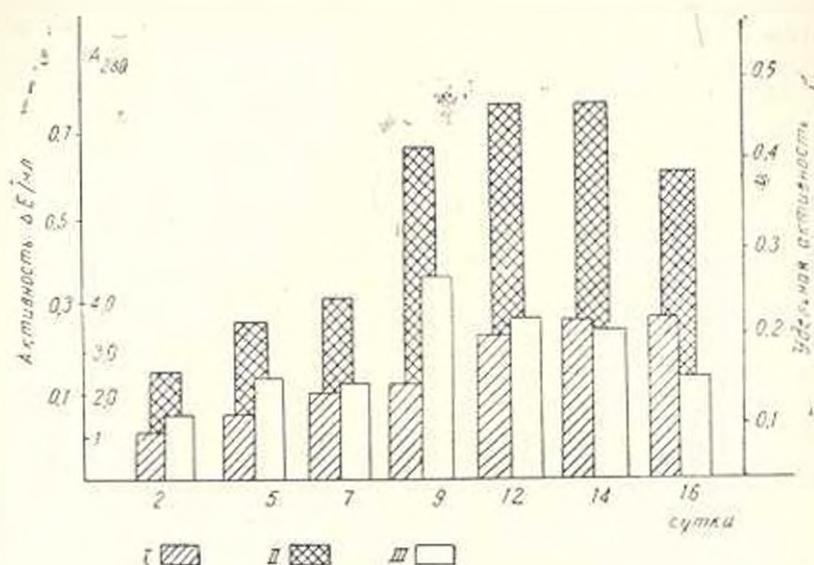


Рис. 2. Влияние сроков внесения индуктора (2,5 ксилитин, $2 \cdot 10^{-4}$ М) на выход лакказы в среду. I— A_{280} , II—активность, III—удельная активность ($\Delta E/A_{280}$).

Исследование зависимости выхода внеклеточной лакказы от pH ферментационной среды от 3 до 5 в период индукции показало, что при внесении 2,5-ксилидина наибольший выход фермента имеет место при pH 5,0 и 3-суточной индукции (табл.).

Влияние pH среды на индукцию лакказы 2,5-ксилидином

Время инк. бацин ч	pH											
	3				4				5			
	pH	A_{280}	ΔE (1 мл)	$\Delta E/A_{280}$	pH	A_{280}	ΔE (1 мл)	$\Delta E/A_{280}$	pH	A_{280}	ΔE (1 мл)	$\Delta E/A_{280}$
Культуральная жидкость	4.2	2.1	--	--	4.2	2.1	--	--	4.2	2.1	--	--
24	4.2	3.4	0.45	0.14	4.5	3.5	0.4	0.1	4.7	3.1	0.5	0.15
48	4.0	3.5	0.46	0.14	4.6	3.6	0.12	0.12	4.8	3.7	0.6	0.16
72	4.6	3.4	0.5	0.15	5.1	3.2	0.61	0.19	5.3	3.5	0.8	0.23
96	5.2	3.45	0.6	0.17	5.85	3.5	0.7	0.2	6.6	4.2	0.9	0.21

Таким образом, активность внеклеточной лакказы обнаруживается после внесения индуктора. Эффективным индуктором является 2,5-ксилидин. Добавление ксилитина в концентрации 2×10^{-4} М к 9—12-суточной культуре, находящейся в конце логарифмической и начале стационарной фазы роста, и 3-суточной индукции при pH 5,0 позволяет получать культуральную жидкость с наибольшим выходом фермента.

1. Bertrand G. Ann. Agronomiques, 22, 116, 1896.
2. Lehman E., Marel E., Marel M. Phytochem., 13, 1713, 1974.
3. Mayer A., Harel E. Phytochemistry, 18, 193—215, 1979.
4. Roudsary G., Signoret A. Food Chem., 7, 227—235, 1981.
5. Fahraeus G., Reinhammar B. Acta Chem. Scand., 21, 2376—2378, 1967.
6. Mosbach R. Biochem. Biophys. Acta, 73, 204—212, 1963.
7. Fahraeus G., Ljunggren H. Biochem. Biophys. Acta, 46, 22—32, 1961.
8. Leonowicz A., Trojanowski J. Acta Biochim. Pol., 25, 369—377, 1978.
9. Reinhammar B. Inorganic Biochem., 15, 27—39, 1981.
10. Sandhu D. K., Arora D. S. Acta Biotechnol., 1, 49—54, 1984.
11. Fahraeus G., Tullander G. Phys. Plant., 11, 631—643, 1958.
12. Froenher S. C., Eriksson K. E. J. Bacteriol., 120, 458—465, 1974.
13. Froenher S. C., Eriksson K. E. J. Bacteriol., 120, 450—457, 1974.
14. Leonowicz A., Trojanowski J. Acta Biochim. Pol., 22, 291—299, 1975.
15. Wood D. A. J. of General Microbiology, 117, 327—338, 1980.
16. Lindeberg G., Fahraeus G. Physiol. Plant., 5, 227—283, 1952.

Поступило 15.XII 1986 г.

Бюлог. ж. Армении, т. 40, № 10, 815—819, 1987

УДК 577.124

ВЛИЯНИЕ АМИНОСПИРТОВ НА СИСТЕМЫ ОКИСЛЕНИЯ ЛАКТАТА И ЭТАНОЛА

Э. А. АВАГИМЯН, С. А. ДУРУХЯН, Т. А. ГЮЛЬБАЗЯН, Р. Г. КАМАЛЯН

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт, лаборатория обмена веществ

Аннотация—Изучено влияние этаноламина и N-ацетилетамоламина на активность алкогольдегидрогеназных систем. В опытах *in vivo* (острых и хронических) введение этанола и аминспиртов не вызывает изменений в активности алкогольдегидрогеназ. Вместе с тем этаноламин резко подавляет окисление этанола кристаллической АДГ из печени лошади. Введение его за 15 мин до алкоголизации повышает толерантность животных к алкоголю. Как естественный метаболит, ингибирующий АДГ, этаноламин может найти применение в терапии алкоголизма.

Անոտացիա — Ուսումնասիրվել է էթանոլամինի և N-ացետիլէթանոլամինի ազդեցությունը ալկոհոլդեհիդրոգենազային ակտիվմենների ակտիվության վրա:

In vivo փորձերում (սուր և խրոնիկ) էթանոլի և նրա ամինաածանցյալների ներարկումը չի ազդում ԱԴՀ-ի և ԼԴՀ-ի ակտիվության վրա: էթանոլամինը ճնշում է ձիու լյարդից անջատված բյուրեղային ԱԴՀ-ի ակտիվությունը: էթանոլամինի ներարկումը սպիտակ առնետներին բարձրացնում է երանց հանդուրժողականությունը դեպի ալկոհոլը: էթանոլամինի ԱԴՀ-ի ակտիվությունը ճնշելու հատկությունը կարելի է օգտագործել ալկոհոլիզմի բուժման կապտակով:

Abstract—The influence of the ethanolamine and N-acetyletanolamine on the activity of the alcoholdehydrogenase systems (ADH and LDH) *in vivo* and *in vitro* experiments has been studied. *In vivo* experiments (acute and chronic) ethanol and aminoalcohols administration does not cause changes in the activity of alcoholdehydrogenases. Ethanolamine causes inhibition of ethanol oxidation by the crystalline ADH from the horse liver.