

6. Патент Великобритании. № 2077262 А, 1981.
7. Ганчев К. Л., Жумов Г. Ш., Христова Г. Х., Мургов И. Д. В кн.: Биотехнология и бионженерия. Тез. докл., 2. Рига, 1986.
8. Мухиня Г. Р., Дунце М. Э. Обзор: Новые виды сырья для микробиологических производств. М., 1978.
9. Лиспинош Г. К., Дунце М. Э. В кн.: Сырье и питательные субстраты для промышленной микробиологии. Рига, 1986.
10. Зайцева Э. М., Комвалов Л. В. Приклад биохимия и микробиол., 22, 3, 318—355, 1986.
11. Белозерский А. И., Проскуряков И. И. Практическое руководство по биодинамике растений. 12—17, М., 1951.
12. Araki K., Takasawa Y., Nakajima J. Agr. Biol. Chem., 39 (6), 1193—1200, 1975.
13. Yoshinaga F. J. Gen. Appl. Microbiol., 15, 367—398, 1969.
14. Yoshinaga F., Yoshinaga Y., Okamura Sh., Katsuya H. J. Gen. Appl. Microbiol., 13, 203—210, 1967.

Поступило 27.1 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 10, № 3, 219—223, 1987

UDC 577.150.2

## ВЛИЯНИЕ *p*-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТА НА L-ЛИЗИН-2-МОНООКСИГЕНАЗУ ИЗ *PSEUDOMONAS* *sp.*

Г. Э. ХАЧАТРЯН, Т. Р. КАЗАРЯН, А. Л. СИМОНЯН

Ереванский физический институт ГКНАЭ СССР

**Аннотация** — Изучено влияние *p*-хлормеркурибензоата на активность L-лизин-2-монооксигеназы из двух штаммов рода *Pseudomonas*. Показана трансформация оксигеназной активности фермента в оксидазную.

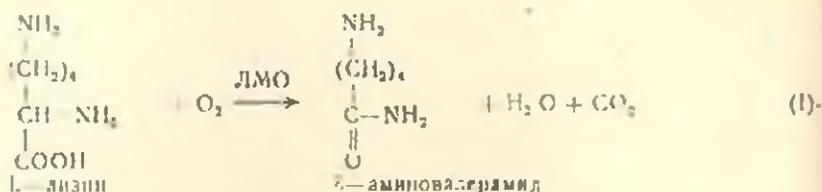
**Նկատից** — Ինտենսիվորեն է պարզվել *p*-քլորմերկուրիենթոատի ազդեցությունը *Pseudomonas* սեղի երկու շտամների L-լիզին-2-մոնօօքսիգենազի ակտիվության վրա: Նույն է տրված ֆերմենտի օքսիգենազային ակտիվության վերափոխման օրինակներ:

**Abstract** — The influence of *p*-chloromercurybenzoate on L-lysine-2-monooxygenase activity from two strains of *Pseudomonas* species is investigated. The transformation of oxygenase activity of enzyme into an oxidase one is shown.

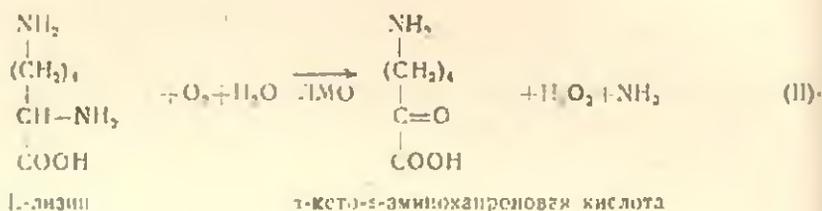
**Ключевые слова** L-лизин-2-монооксигеназа, трансформация, *p*-хлормеркурибензоат, *Pseudomonas* *sp.*

Химическая модификация функциональных групп молекул ферментов часто сопровождается изменением их каталитических свойств. Известно, что при некоторых патологических состояниях, например, вследствие облучения [2], происходят качественные изменения активности ферментов, т. е. трансформация. Изыскание способов избирательного блокирования таких изменений в принципе может быть использовано для создания новых лечебных средств. Кроме того, сопоставление свойств природных и трансформированных ферментов может быть интересным для решения фундаментальных проблем биокатализа [1].

1-лизин-2-монооксигеназа—ЛМО (КФ 1.13.12.2.) в пассивном состоянии является внутренней монооксигеназой [3], т. е. катализирует окисление лизина с внедрением одного атома молекулярного кислорода в структуру субстрата по схеме



Известно, что ЛМО из *Ps. fluorescens* ATCC 11250 под воздействием меркаптидообразующих реагентов в значительной степени теряет оксигеназные свойства, приобретая оксидазные. При этом молекулярный кислород расходуется на образование пероксида водорода, а кислород keto-группы  $\alpha$ -кето- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты берется из молекулы воды по схеме



ЛМО не обнаружена ни где, кроме некоторых штаммов *Ps. fluorescens* и *Ps. putida*. Детальное исследование свойств, в том числе свойства трансформации, было проведено только для фермента из *Ps. fluorescens* ATCC 11250.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение свойств ЛМО из штаммов *Ps. putida* ВКМ В-1458Д и *Ps. fluorescens* 011 под влиянием п-хлормеркурибензоата (п-ХМБ).

**Материал и методика.** ЛМО выделяли из *Pseudomonas* по методу Такеда и Ганшини [3]. В каждом случае фермент очищался примерно в 200 раз и содержал незначительную белковую примесь.

В работе использовали натриевую соль п-ХМБ квалификации «ч», «Сигма» (ЧССР); L-лизина гидрохлорид, «Reanal» (ВНР); 2-меркаптоэтанол, «Serva» (ФРГ), каталазу, «Sigma» (США). Остальные реактивы—отечественного производства высших квалификаций.

Активность фермента определяли амперометрически, оценивая убыль кислорода с помощью мембранного кислородного электрода, спектрофотометрически на спектрофотометре «Specord M-40» (ГДР), определяя изменение интенсивности окраски фенолового красного в результате смещения pH в кислую область под воздействием выделяющегося  $\text{CO}_2$  при длине волны 558 нм. Измерения выполняли при 25° в 5 мМ калийфосфатном буфере (pH 8,0), содержащем L-лизин в конечной концентрации 20 мМ. Концентрация фенолового красного при спектрофотометрическом определении составляла 21 мкМ.

Модификацию фермента с помощью п-ХМБ проводили, инкубируя 20 мМ ЛМО с п-ХМБ в концентрациях от 0,03 до 0,9 мкМ в течение 5 мин при 25°. После этого определяли ферментативную активность. Процент оксидазной активности оценивали, определяя количество пероксида водорода, добавленного в реакционную среду избытка каталазы. При этом регистрировали уменьшение поглощения кислорода, пропорцио-

нальные количеству выделявшегося в ходе реакции пероксида водорода. Обратимость трансформации определяли добавлением избытка 2-меркаптоэтанола.

**Результаты и обсуждение.** Предполагается, что причиной появления оксидазной активности у ЛМО после обработки п-ХМБ является модификация тиоловых групп фермента [4]. В наших экспериментах при действии на фермент различных концентраций п-ХМБ наблюдалось ожидаемое уменьшение активности ЛМО. Причем, как видно из рис. 1, существенных различий в степени инактивации фермента из разных ис-

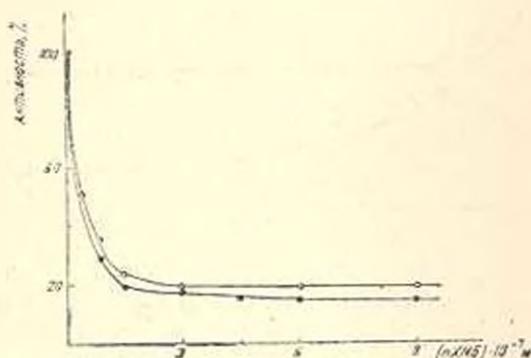


Рис. 1. График зависимости активностей ЛМО из *Ps. fluorescens* (○—○) и *Ps. putida* (●—●) от различных концентраций п-ХМБ. Время преникубации фермента с п-ХМБ 5 мин. Концентрация фермента 20 нМ.

точников не было обнаружено. Наблюдаемое резкое падение активности фермента уже при очень низких концентрациях п-ХМБ действительно может быть обусловлено связыванием последнего с SH-группами активного центра или, по крайней мере, с SH-группами, несущими ответственность за активность фермента (например, с SH-группами регуляторных центров). Свидетельством тому может также служить резкий перегиб в кривой инактивации при соотношении 7—8 моль п-ХМБ на моль фермента. Последующее увеличение концентрации п-ХМБ не приводило к изменению каталитической активности ЛМО из *Ps. putida*, в то время как у ЛМО из *Ps. fluorescens* она незначительно снижалась.

На рис. 2 приведена зависимость активности ЛМО от времени преникубации фермента с различными концентрациями п-ХМБ, из которой видно, что связывание п-ХМБ с ферментом практически заканчивается за 4—12 мин и зависит от соотношения п-ХМБ/ЛМО, причем дальнейшая преникубация не приводит к изменению активности.

Модификация ЛМО из обоих источников с помощью п-ХМБ не только приводит к существенной потере каталитических свойств фермента, но и трансформирует значительную часть остаточной активности из оксигеназной в оксидазную. В таблице суммированы данные об изменении характера окислительных свойств фермента. Явление трансформации регистрировали обоими методами оценки ферментативной активности. Как видно из схемы 1, стехиометрия убыли кислорода и образования диоксида углерода в оксигеназной реакции равна 1:1. Между тем с появлением оксидазных свойств количество образующегося  $\text{CO}_2$

должно сократиться (схема II). И действительно, наблюдалось несоответствие между определенным амперометрически количеством кислорода и количеством образовавшегося  $\text{CO}_2$ , определенного спектрофото-

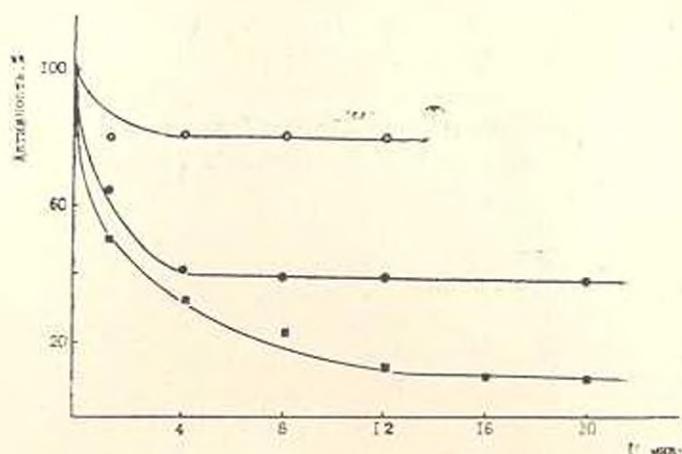


Рис. 2. График зависимости активностей ЛМО из *Ps. fluorescens* от времени инкубации с п-ХМБ:  $\circ - \circ$  0,06 мкМ;  $\bullet - \bullet$  0,15 мкМ;  $\blacksquare - \blacksquare$  0,3 мкМ п-ХМБ. Концентрация фермента 20 мМ.

Процентное соотношение оксигеназной и оксидазной активностей ЛМО после модификации фермента п-ХМБ

Шаги	Состояние фермента	Остаточная активность, %		Оксидазная активность, %	
		по $[\text{O}_2]$	по $[\text{CO}_2]$	по $([\text{O}_2] - [\text{CO}_2])$	по каталазе
<i>Ps. fluorescens</i>	натив.	100	100	0	0
	модиф.	24,2	10	14,2	13
<i>Ps. putida</i>	натив.	100	100	0	0
	модиф.	26,7	18,4	8,9	10

\* Модификацию проводили инкубируя 20 мМ фермента со 120 мМ п-ХМБ.

метрически. Эта разность и соответствует оксидазной активности. Последнюю определяли также с помощью каталазы. Из схемы II видно, что в оксидазной реакции образуется пероксид водорода эквимолярно расходу кислорода. Если бы вся остаточная активность была оксидазной, то в случае добавления в реакционную смесь каталазы половина поглощенного кислорода должна была вернуться в реакционную среду согласно схеме



Наблюдаемое в нашем случае отклонение от подобной стехиометрии указывает на то, что реакция ферментативного окисления протекает одновременно по двум механизмам: оксидазному и оксигеназному. Приведенные в таблице значения уровня оксидазной активности двумя методами дают неплохое совпадение. Добавление к модифицированному ферменту избытка 2-меркаптоэтанола восстанавливает оксигеназ-

ную активность ЛМО до 80%, при этом оксидазная активность полностью утрачивается.

Таким образом, ЛМО как из *Ps. putida* ВКМ В-1458Д, так и из *Ps. fluorescens* 011 действительно проявляет способность к трансформации под действием п-ХМБ.

Авторы выражают благодарность Аустре Лишман за любезное предоставление штамма *Ps. fluorescens* 011 и Н. И. Мкртчян за выполнение микробиологической части работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. Э. Мол. биология, 10, 713, 1976.
2. Зейналов Т. А. и др. Радиобиология, 15, 16, 1975.
3. Taheda H., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 241, 2733, 1966.
4. Yamouchi T., Yamamoto S., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 248, 3750, 1973.

Поступило 13.XI 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 223—227, 1987

УДК 539.16.047:611/612

### ЭНЗИМОДОЗИМЕТРИЯ КАК МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ ПОРАЖЕНИЯ ОТ ВНЕШНЕГО БЕТА-ОБЛУЧЕНИЯ

В. Б. МАТЮШИНЧЕВ, И. Б. АМПИЛОВА, Н. Ю. БАЛАНИНА, И. Н. СОКОЛОВ

Ленинградский государственный университет им. А. А. Жданова

**Аннотация** — С помощью множественного регрессионного анализа изучена связь уровней 16-ти ферментных показателей с дозой (30—100 Гр) внешнего бета-облучения крыс. Отобрана группа из 9-ти эффективных тестов. Показана перспективность использования энзимодозиметрии для отбора признаков, информативных в отношении оценки тяжести постлучевых нарушений.

Աննոտացիա — Ընդամենը 16 ֆերմենտային ցուցանիշների մակարդակների կապը արտաքին բետա-ճառագայթման քաղաքի (30—100 Գր) հետ: Ընտրված է 9 էֆեկտիվ տեսակից կազմված մի խումբ: Ցույց է տրված կիրառելիությունը օգտագործման հեռանկարային չիտանագայթային խանգարումների մարտնչման գնահատմանը վերաբերվող ճանկանիշների ընտրության համար:

**Abstract** — By means of multivariate regression analysis the relationship of 16 enzymatic indices levels with the dose (30—100 gray) of rats outward beta-irradiation has been studied. A group has been selected, consisting of 9 effective tests. The perspectiveness of enzymatic dosimetry utilization for selection of indices, informative with respect to estimation of the heaviness of postirradiation breaches, has been shown.

**Ключевые слова:** ферменты, бета-излучение, регрессионный анализ.

Хотя проблема биологического тестирования лучевого поражения организма еще далека от окончательного решения, признается, что значительные успехи в этой области могут быть достигнуты на путях биохимических исследований.