

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян Ж. С., Огансян А. С. ДАН АрмССР, 77, 3, 136—140, 1983.
2. Симосян Н. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1969.
3. Dicker K. E., Shirly D. G., J. physiol., 219, 507—523, 1971.
4. Harris R. C., Seltzer J. L., Brenner B. M. J. Clin. Invest., 74, 1979—1987, 1984.
5. Hosteffer A. T., Olson J. L., Remke H. G., Brenner B. M. Am. J. physiol., 241, F-85—F-93, 1981.
6. Kaliszewski M., Szomilo M., Kahten J., Sendekci W. Acta Biochem. Pol., 23, 27—35, 1976.
7. Malt R. A., In Compensatory renal hypertrophy, eds. Nowinsky, W. W. & Goss R. J. 164—171, 1959.

Поступило 23. V. 1989 г.

Биолог журн. Армении, № 2.(46).1993

УДК 577:15.591.8

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОЧИЩЕННЫХ ИЗОЭНЗИМОВ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ПЛЕСНЕВНЫХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

С. П. ОГАНЕСЯН, А. Г. БАБАЯН, М. А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Изоэнзимы—субъединицы—гриб плесневый

Установлено наличие у *Asp. niger* R-3 оксидазы D-аминокислот при выращивании на природных отходах сахарного производства—мелассе. Нами выделены и очищены два изоэнзима данного фермента [1—3].

Целью данной работы является исследование физико-химических свойств очищенных изоэнзимов *Asp. niger* R-3.

Материал и методика. Объектом исследований служил плесневый гриб *Asp. niger* R-3, полученный из Спитякского завода по производству лимонной кислоты в 1988 г. Методика приготовления питательной смеси и выращивания гриба *Asp. niger* R-3 изложена в ранее опубликованных нами работах [2].

Молекулярная масса полученных нативных изоферментов оксидазы D-аминокислот (D-ААОХ, КС 1.4.3.3) была определена методом гель-фильтрации из колонки с сефадексом G-200 (1,6ХК Na фосфатным буфером, pH 8,3).

Для определения D-ААОХ пробу инкубировали при 37° в течение 60 мин в 0,05 М К/Na-фосфатном буфере (pH 8,3) в присутствии 10 мкМ D-Мет при постоянном встряхивании. Реакцию останавливали 20%-ным ТХУ, после чего в экстракте определяли выделившийся аминик микродиффузионным методом Зеллинсона в модификации Силаковой [4]. Активность фермента выражали в мкМ аминика, выделившегося при часовой инкубации, на 1 г мицелия.

Результаты и обсуждение. Относительно молекулярной массы D-ААОХ в литературе имеются различные данные. Установлено, что значение молекулярной массы ферментов меняется в зависимости от применяемого метода и условий эксперимента, определяющих соотношение мономер—димерных форм ферментативного белка в растворе. В частности, на результаты экспериментов по определению мо-

лекулярной массы сильное воздействие оказывает присутствие высокомолекулярных примесей, поэтому стабильные результаты получаются лишь при работе с высокочистыми препаратами [5, 8].

Определение молекулярной массы полученных нами нативных изоферментов D—ААОХ показало, что изоэнзимы не различаются по своей молекулярной массе, которая равна 187000 Да.

Литературные данные относительно молекулярной массы D—ААОХ, выделенной из других объектов, очень разнообразны. В частности, известно, что нативный фермент из штамма плесневых грибов *Asp. niger* R-3 индуцированного к DL—фенилаланину имеет молекулярную массу 200000 [7].

Высокая молекулярная масса, а также имеющиеся в литературе многочисленные данные о субъединичной структуре фермента из различных источников обусловили последующие исследования структуры очищенных нами изоэнзимов.

Нами была проведена серия экспериментов с использованием метода электрофореза в полиакриламидном геле, в присутствии додецилсульфата натрия [7]. Оба изофермента мигрировали в геле одной полосой с молекулярной массой равной 46700 Да.

Влияние двухвалентных металлов на активность изоэнзимов I и II оксидазы D—аминокислот *Asp. niger* R-3

Концентрация, 10 мкМ	Изоэнзим I Активность в мкМ NH ₂ на 1 г мицелия	Активность, %	Изоэнзим II Активность в мкМ NH ₂ на 1 г мицелия	Активность, %
экстракт	2,2	100	10	100
MgCl ₂	4,0	125	11,4	114
CoCl ₂	3,0	91	13,1	133
NiCl ₂	3,5	107	10,3	103
MnCl ₂	3,5	109	10,3	100
FeCl ₂	4,0	115	8,9	89
FeCl ₃	3,0	94	10	100
ZnCl ₂	1,3	41	8,3	83
CuCl ₂	0,8	25	2,5	25

Сравнивая молекулярные массы нативного фермента и субъединиц, можно допустить, что D—ААОХ из *Asp. niger* R-3 имеет тетрамерную структуру, с молекулярной массой субъединиц равной 46700 Да. Согласно [10], фермент из других объектов в основном состоит из двух субъединиц, исключение составляет фермент из дрожжей *T. lignorum var. abii*, нативная молекулярная масса которого равна 170000 Да, а масса субъединицы—42000 [9].

В следующей серии экспериментов нами изучалась стабильность изоэнзимов I и II. Выявлено, что I изоэнзим в отличие от II является нестабильным ферментом, то есть при хранении его в течение 48 ч

при температуре 4° активность его понижается, тогда как II изоэнзим практически не теряет свою активность в течение одной недели при тех же условиях хранения.

Интересным представляется факт сохранения активности ферментного препарата, полученного на этапе гель-фильтрации и представляющего собой смесь изоэнзимов I и II, в течение трех недель, при температуре 4°. Но по всей вероятности, во время дальнейшей очистки его на этапе ионообменной хроматографии либо удаляются какие-то стабилизирующие факторы, либо осуществляется его модификация.

В литературе относительно стабильности микробного фермента имеются немногочисленные данные. В частности, показано, что выделенный из штамма *Asp. niger* индуцированного к DL-фенилаланину [6] фермент остается стабильным в течение 30 дней при температуре -20°, а при 4° активность сохраняется 24 ч. Дрожжевой фермент из *Triganopsis variabilis* в замороженном состоянии был стабилен, а при 8° активность его снижалась очень медленно [10].

Далее нами изучалось влияние катионов на активность изоэнзимов D—AAOX (Mg, Co, Ni, Mn, Fe, Zn, Cd). Данные, представленные в таблице, указывают на ингибирующее воздействие Zn на I изофермент, ионов Cd как на I-й, так и на II изоферменты. Наблюдается некоторая активация II-го изофермента при добавлении ионов Co, а для I изофермента—при добавлении ионов Mg и Fe, остальные используемые нами ионы не оказывали никакого воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян М. А., Оганесян С. П. Биол. журн. Армения, 36, 11, 1019—1024, 1983.
2. Оганесян С. П., Бабаян А. Г. Биол. журн. Армения, 41, 5, 402—406, 1988.
3. Оганесян С. П., Давтян М. А., Хандосян Я. Биохимия, 55, 2221—2225, М., 1990.
4. Силакова А. И., Труш Т. П. Вопросы мед. химии, 8, 538—545, 1932.
5. Horrike K., Suga K., Otsu S. J. Biochem., 75, 93—100, 1974.
6. Kishore G., Vaidyanathan G. S., Indira S., Kishore, J. Biochem., 11, 216—222, 1976.
7. Lambert L. K. Nature, 237, 680—685, 1970.
8. Massey V., Garri H. J. Biol. Chem., 241, 3117—3123, 1966.
9. Ren Kegl, Von Hahn, Acta Microbiol. 260, 243—249, 1986.
10. Sewajner B., Moshner K. Biochem. Lett., 7, 1, 1—7, 1978.

Получено 31. I. 1991 г.