

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

Таким образом, I-ФАЛ-ы, выделенные из дрожжей *R. gracilis* Ry 335 и его производного IGF-73, будучи в целом близкими по своим свойствам, обнаруживают некоторые различия в оптимальных для активности значениях pH, константах Михаэлиса и M_i субстратами. Наибольшее различие отмечается в воздействии и активности этих ферментов конов двухвалентных металлов Cu⁺² и Ni⁺².

ЛИТЕРАТУРА

1. Abell C.W. and et al. Methods Enzymol., 142, 242-248, 1987.
2. Adachi O. and et al. Agric. Biol. Chem., 54, 2839-2843, 1990.
3. Osborn M.A. and et al. Int. J. Biochem., 20, 217-222, 1988.
4. Lyons J. and et al. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 28, 366-374, 1987.
5. Gilbert H.L. and Luffy M. Biochem. Biophys. Res Commun., 131, 557-560, 1985.
6. Zavarin, I. A. Methods Enzymol., 142, 248-253, 1987.
7. Grogan D.S., J. Biol. Chem., 246, 2977-2985, 1971.
8. Jones S. and et al. Biochem. Biophys. Res Commun., 141, 165-170, 1987.
9. Martin J. and et al. Biochem Int., 24, 1-11, 1991.
10. Lopez-Vallbuena R. and et al. Plant Physiol Biochem., 29, 153-161, 1991.
11. Weber K., Osborn M., J. Biol. Chem., 244, 4406-4412, 1969.

Поступила 19.07.1994

Биохим. журн. Армения, 2 (48), 1995

УДК 576.851.48.1

1-ФЕНИЛАЛАНИН АМИНАК-ЛИАЗА ИЗ *Rhodotorula gracilis* Ry 335 И *Rhodotorula gracilis* IGF-73. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, СТАБИЛИЗАЦИЯ СУБСТРАТАМИ

А.С. САРԳՍՅԱՆ, Խ.Օ. ԲԵՅԻՐՉՅԱՆ, Ն.Վ. ԵՐԵՂԱԿՅԱՆ

Научно-исследовательский институт "Биовихватения", Ереван

Приведены результаты сравнительного изучения термостабильности и pH-зависимости 1-фенилаланин аминк-лиазы из родвольского штамма *Rhodotorula gracilis* Ry 335 и его мутанта IGF-73. Изучено влияние пептонных растворов парагидроксибензоата и 5,5'-динитробензоата (2-нитробензойной кислоты) на активность

Для изучения влияния многоатомных спиртов, ионов солей, а также ряда природных аминокислот на стабильность L-ФАЛ фермент инкубировали в присутствии этих реагентов при соответствующей температуре. В качестве контроля брали пробирки без соответствующих добавок, инкубировали их в тех же условиях. За 100 % принимали активность пробирки без добавления реагентов и не подвергнутой превякубации.

Результаты и обсуждение. Выяснено, что L-ФАЛ лабилен и даже при хранении в 40 %-ном глицерине при 12° теряет около 50 % исходной активности уже через несколько дней. В связи с этим представлялось целесообразным сравнение стабильности фермента из обоих источников - родителского штамма и его мутанта - и изучение влияния различных реагентов на его стабильность.

Изучение термостабильности обоих ферментов выявило между ними определенные различия. Так L-ФАЛ, выделенная из штамма *R. gracilis* LC15-73, заметно уступает ферменту из родителского штамма *R. gracilis* Ry 335. Последний при 55° сохраняет около 70 % своей активности, в то время как первый - лишь около 50 %.

Определенные различия наблюдаются и в pH-стабильности этих ферментов. Так диапазон значений pH, в котором L-ФАЛ из штамма-мутанта стабилен, более широк и лежит в области 6.5-8.0.

В табл. 1 обобщены данные, касающиеся инактивации L-ФАЛ тиоловыми реагентами - п-ХМБ и ДТНБ. Эти данные относятся к ферменту, выделенному из *R. gracilis* LC15-73, однако для фермента из родителского штамма наблюдается та же закономерность. Наиболее четкий инактивирующий эффект по сравнению с контролем наблюдался в варианте с ДТНБ в концентрации 50 и 100 мкМ (24 ч, 25°) и 11 % остаточной активности, при этом меркаптоэтанол восстанавливал активность L-ФАЛ до 32 %. п-ХМБ оказывал менее выраженный эффект. Из этих данных следует, что L-ФАЛ имеет функционально значимые SH-группы, однако для их модификации нужно значительное время, возможно, ввиду их стерической труднодоступности по отношению к реагенту.

Таблица 1. Инактивация L-ФАЛ из *R. gracilis* LC15-73 тиоловыми реагентами п-ХМБ и ДТНБ

Реагент	Концентрация реагента, мкМ	Условия инкубации	% остаточной активности	Восстановление после 10 мин инкубации с меркаптоэтанолом	% остаточной активности
Контроль	-	-	82	-	29
п-ХМБ	50	10 мин	74	1 ч	48
п-ХМБ	100	52°	60	25°	27
ДТНБ	50	-	50	-	31
ДТНБ	100	-	35	-	20
Контроль	-	-	80	-	30
п-ХМБ	50	24 ч	70	1 ч	32
п-ХМБ	100	25°	60	25°	25
ДТНБ	50	-	20	-	40
ДТНБ	100	-	11	-	12

В поисках стабилизирующих факторов была исследована возможность защиты L-ФАЛ от химической и термической инактивации субстратом, оказалось, известно, что в некоторых случаях фермент-субстратный комплекс более стабилен, чем свободный фермент. В качестве таковой использовалась L-Phe в 1-м ряду в различных концентрациях, от 0.05 мМ до 1 мМ, а также смесь 0.5 мМ

L-Tyr и 0.5 мМ L-Phe. Результаты эксперимента приведены в таб. 2. Если оба субстрата под действием ППНБ остаточная активность равна 10 %, то субстрат, как L-Phe, так и L-Tyr, в также оба имеют оказывают сильное ингибирующее защитное действие, повышая остаточную активность до 40-45 %.

Таблица 2. Зависимость L-ФАЛ от *R. drosophila* LCL-73 субстратами от термической и химической ингибации

Субстрат	% остаточной активности		Субстрат	% остаточной активности	
	51° 10 мин	100 мкМ ППНБ		40° 20 мин	100 мкМ ППНБ
Контроль	80	10	Контроль	80	10
0.05 мМ L-Phe		30	0.05 мМ L-Phe		15
0.5 мМ L-Phe		40	0.5 мМ L-Phe		42
1.0 мМ L-Phe		45	1.0 мМ L-Phe		46
0.5 мМ L-Tyr		32	0.5 мМ L-Tyr		35
1.0 мМ L-Tyr		46	1.0 мМ L-Tyr		42
0.5 мМ L-Phe		45	0.5 мМ L-Phe		40
0.5 мМ L-Tyr			0.5 мМ L-Tyr		

Продолжая поиск стабилизатора L-ФАЛ мы применили в качестве ингибирующего агента, в также соли. Из многочисленных экспериментов наиболее стабильными были обнаружены CaCl_2 и MgCl_2 карбонаты, дикальций фосфат. Водные растворы оказывают стабилизирующее влияние, однако наиболее эффективным является добавка 2%, водного раствора.

Катионы NH_4^+ , Na^+ , анионы Cl^- , SO_4^{2-} почти не оказывают влияния на стабильность L-ФАЛ.

Изучено также влияние ряда скелетно-углеродных производных аминокислот на активность L-ФАЛ (таб. 3). Из аминокислотных производных наиболее ингибирующими оказались для S-2-аминопропил-L-цистеина и метилметионина S-фенил-L-цис-Окстатина соединения, не оказывающие положительного влияния на активность фермента.

Таблица 3. Влияние некоторых аминокислотных производных дитерминации на активность L-ФАЛ от *R. drosophila* LCL-73.

Применяемые аминокислоты	Концентрация производной, мМ	% остаточной активности
Контроль	5	100
α -Me-L-Phe	5	100
θ -Me-L-Ser	5	90
β -оксипро-L-Val	5	96
β -оксипро-L-Leu	5	95
β -Ala-L-Ala	5	90
S-фенил-L-Cys	2	55
S-2-аминопропил-L-Cys	5	0
2L, 3L-ди- β -фенил-L-метионин-L-Cys	2	96

Обобщая результаты, полученные при изучении стабильности ферментов, можно прийти к выводу, что ферменты окислительного типа

