



Биолог. журн. Армении, 2 (62), 2010

## РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ УСЛОВИЙ БИОСИНТЕЗА, ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ТИРОЗИН-ФЕНОЛ-ЛИАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *CITROBACTER FREUNDII*.

К.Г. ДЮКОВА

ЗАО “НИИ Биотехнологии”

В работе приведены результаты исследований по разработке эффективной питательной среды для выращивания бактерии *Citrobacter freundii* 62, состоящей из доступных и дешевых компонентов. Предлагаемая нами синтетическая среда с добавлением L-аспарагиновой кислоты обеспечивает быстрый рост культуры с высокой удельной тирозин-фенол-лиазной (ТФЛ) активностью, которая на порядок превышает аналогичный показатель для ТФЛ *C. freundii*, известный из литературы.

Предложен эффективный метод очистки ТФЛ из клеток *C. freundii*, позволяющий получить фермент с высоким выходом и с применением минимального числа стадий очистки. В результате описанного нами метода очистки значение удельной активности ферментного препарата увеличивается в 6,1 раз, а общий выход активности составляет 40,2 %. Полученный очищенный ферментный препарат проявляет максимальную активность при температуре 35° и рН 8,5. Показано, что при хранении в глицерине в присутствии меркаптоэтанола период полуинактивации фермента увеличивается и составляет 15 сут.

Тирозин-фенол-лиаза □ *Citrobacter freundii* □ L-Тирозин

Աշխատանքում մշակվել է *Citrobacter freundii* 62 շտամի աճեցման սննդամիջավայր, որը կազմված է մատչելի և էժան բաղադրիչներից: Մեր կողմից առաջարկվող L-ասպարազինաթթվի հավելմամբ սինթետիկ սննդամիջավայրը ապահովում է կուլտուրայի արագ աճ և թիրոզին-ֆենոլ-լիազի (ԹՖԼ) բարձր ակտիվություն: Վերջինս մեկ կարգով գերազանցում է *C. freundii*-ի ԹՖԼ-ի գրականությունից հայտնի համանման ցուցանիշը:

Առաջարկված է *C. freundii* բջիջներից ԹՖԼ-ի մաքրման արդյունավետ եղանակ: Այն հնարավորություն է տալիս մաքրման նվազագույն փուլերի կիրառմամբ ստանալ բարձրաստիճան մաքրությամբ և ակտիվությամբ ֆերմենտային պատրաստուկ: Մեր կողմից նկարագրված մաքրման մեթոդի արդյունքում ֆերմենտային պրեպարատի տեսակարար ակտիվությունը աճում է ավելի քան 6,1 անգամ, իսկ ակտիվության ընդհանուր ելքը կազմում է 40,2%: Ստացված մաքուր ֆերմենտային պրեպարատը մաքսիմալ ակտիվություն է ցուցաբերում 35° ջերմաստիճանում և 8,5 рН-ում: Ցույց է տրված, որ մերկապտոէթանոլի ներկայությամբ գլիցերինում պահելիս ֆերմենտի կիսահինակտիվացման ժամանակը բազմակիորեն աճում է և կազմում է 15 օր:

Թիրոզին ֆենոլ-լիազ (*Citrobacter freundii*) (L-թիրոզին)

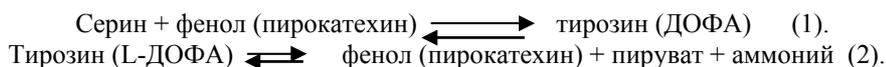
In this study the fermentation medium for growing *Citrobacter freundii* 62 strain, consisting of cheap and available components, was developed. Suggested synthetic growth medium with addition of L-aspartic acid provide the rapid

culture growth with high tyrosine-phenol-lyase (TPL) activity, which in order exceeds the analogous index for TPL of *C. freundii* known from literature.

An efficient method for TPL purification from *C. freundii* cells has been offered, which allows to obtain the purified enzyme in high yield using minimum of purification steps. As a result of described purification procedure the specific activity of preparation arises in 6.1 times, and the yield of activity makes up 40.2 %. The obtained purified enzyme preparation exhibits maximum activity at temperature 35 °C and pH 8.5. It was shown, that in case of keeping in glycerol in presence of mercaptoethanol the enzyme half lifetime increases many times making up 15 days.

*Tyrosine phenol-lyase* □ *Citrobacter freundii*, L □ tyrosine

Тирозин-фенол-лиаза (ТФЛ) – амбифункциональный, пиридоксальфосфат-зависимый фермент, обратимо катализирующий ряд реакций β-замещения (1) и α,β-элиминирования (2) [1, 3], [5,6]



Реакции, катализируемые этим ферментом, представляют большой теоретический и практический интерес. С биотехнологической точки зрения наибольший практический интерес представляют реакции синтеза тирозина и диоксифенилаланина (L-ДОФА) из фенола и пирокатехина соответственно. Для смещения равновесия в сторону синтеза указанные реакции проводят при наличии избытка пировиноградной кислоты и аммиака, но при низких концентрациях фенола (пирокатехина) в силу того, что он необратимо денатурирует ТФЛ.

Наиболее эффективными продуцентами ТФЛ являются штаммы бактерий *Erwinia herbicola*, *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter freundii*. В ряде работ для получения высокой ТФЛ активности детально исследованы условия культивирования штаммов бактерий *E. herbicola* и *C. intermedius* [4,6,9]. В то же время аналогичные работы для *C. freundii* отсутствуют, и, тем самым фактически не выявлен истинный потенциал данной культуры в качестве продуцента ТФЛ.

Ряд исследований посвящен выделению ТФЛ в гомогенном состоянии из различных источников [1,2,7,8]. При этом описанные методы включают большое число стадий очистки, а выход фермента колеблется в пределах 5-40 %.

Целью настоящей работы является разработка доступной и дешевой среды, обеспечивающей образование и накопление ТФЛ *C. freundii*, а также усовершенствование способа выделения и очистки данного фермента.

**Материал и методика: Условия эксперимента. Материалы и питательные среды.**

В работе использовали следующие реактивы: аминокислоты, пиридоксаль-5'-фосфат, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), NADH, лактат-дегидрогеназа ("Reanal", Венгрия), 2-меркаптоэтанол (МЭ), пируват натрия, гидроксипатит производства ("Serva" Германия), дрожжевой экстракт ("BBL", США), диэтиламиноэтил (ДЭАЭ)-тойоперл 650М и тойоперл 55F ("Тоуо Soda", Япония), сефадекс G-25 С ("Pharmacia", Швеция). Все остальные реактивы марки х.ч. - коммерчески доступные, производства Армении и стран СНГ.

В качестве продуцента ТФЛ использовали бактерии *C. freundii* 62, полученные на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ.

Клетки *C. freundii* 62 выращивали и поддерживали на следующих средах: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА); среда № 1 на основе (МПБ), среда № 2 на основе гидролизата БВК, среда № 3 на основе гидролизата сои, среда № 4 синтетическая (бедная), среда № 5 синтетическая (обогащенная), среда № 6 на основе глицерина, среда № 7 на основе глицерина (обогащенная), среда № 8 на основе глюкозы, среда № 9 на основе глюкозы (обогащенная), среда № 10 синтетическая с добавлением аспарагиновой кислоты, среда № 11 синтетическая с добавлением аспарагиновой кислоты и глюкозы.

*мясопептонный бульон / агар* (МПБ, МПА) и *гидролизат БВК* – гидролизат биомассы дрожжей приготовлены согласно [3].

*Гидролизат сои* – гидролизат соевой муки готовили аналогично гидролизату БВК из расчета 50 г соевой муки на 100 мл 4 N серной кислоты.

*Получение биомассы клеток C. freundii.* Биомассу выращивали в колбах объемом 750 мл, содержащих по 100 мл питательной среды, в течение 19 ч на круговых качалках со скоростью вращения 200 об/мин при температуре 30°. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 40 мин (центрифуга К-26, Германия) при температуре 4°. Полученную биомассу дважды промывали в буфере А и сохраняли в замороженном состоянии при температуре -18°.

*Выделение и очистка ТФЛ из C. freundii.* Все работы по выделению и очистке ТФЛ из *C. freundii* проводили при температуре 4°.

*Разрушение клеток.* Дезинтеграцию клеток осуществляли ультразвуковой обработкой в течение 20 мин, при частоте звука 20 кГц и мощности 300 Вт (Labsonic 2000, В. Braun, Германия) в буфере А. Осадок удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин (центрифуга К-24, Германия).

*Фракционирование ферментного экстракта на ДЭАЭ - тойоперл 650М.* Грубый ферментный экстракт подавали на колонку (2,5 x 15 см), содержащую анионит – ДЭАЭ - тойоперл 650М, уравновешенный буфером Б. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0-0,4 М) в буфере Б. Активные фракции собирали по 8-10 мл автоматическим коллектором “Isco” (США), объединяли и использовали на следующем этапе.

*Фракционирование на гидроксиапатите.* Объединенный раствор активных фракций наносили на колонку (2,5x 7см), содержащую гидроксиапатит. Адсорбированные белки элюировали линейным градиентом концентрации К,Na-фосфатного буфера (0-0,3 М), рН 7,3 с 10 mM меркаптоэтанола. Фракции, обладающие активностью, объединяли и высаливали белок сульфатом аммония при 75%-ном насыщении. Осадок отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме буфера А.

*Гель-фильтрация.* Полученный концентрированный раствор белков пропускали через колонку (1,5 x 54 см), содержащую тойоперл 55F, уравновешенный буфером А. Калибровку колонки проводили используя следующие белки: ферритин (450 кДа), каталаза (240 кДа), альдолаза (60 кДа) и цитохром С (12,4 кДа). Фракции белков, имеющие ТФЛ активность, объединяли и обессоливали на колонке (4,5 x 24 см), содержащей уравновешенный буфером Б сефадекс G-25 С, после чего концентрировали на маленькой колонке (1 x 5 см), заполненной ДЭАЭ-тойоперлом 650 М.

*Определение чистоты препаратов ТФЛ.* Чистоту полученного препарата ТФЛ определяли с помощью нативного диск-электрофореза в столбиках 7,7 %-ного полиакриламидного геля (ПААГ) с системой буферов Лаемли, согласно инструкции, предложенной фирмой Фармация [12], рН гелей 8,8, напряжение 4 мА/гель. Белковые зоны выявляли красителем - кумасси бриллиантовым голубым R- 250.

*Измерение активности ТФЛ.* Активность ТФЛ измеряли в реакции  $\alpha$ ,  $\beta$  элиминирования тирозина по накоплению образующегося пирувата в реакционной среде следующего состава: 2,5 mM L-тирозина, 0,1 mM пиридоксальфосфата, бу-фер А [5]. Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл, температура 30°. Реакцию начинали добавлением 10 мкл ферментного препарата, останавливали через 10 мин кипячением пробирок с реакционной смесью в течение 3-5 мин на кипящей водяной бане. Пируват, образующийся в реакционной смеси, определяли по убыли поглощения NADH в реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой на UV-VIS спектрофотометре “Perkin Elmer 340”, США. За единицу активности фермента принимали количество пирувата (мкмоль), которое образует 1 мг ферментного препарата за 1 мин при температуре 30°. Концентрацию белка измеряли методом Гровса и Дейвиса по поглощению при длине волны 224 – 236 нм [10].

*Определение температурного и рН оптимумов.* Активность фермента измеряли при разных температурах, в интервале от 20 до 60° и при разных рН, в интервале от 5 до 10, используя 50mM трис-фосфатный буфер с соответствующими значениями рН.

***Результаты и обсуждение. Влияние состава среды на ТФЛ активность.*** В целях определения влияния состава среды на активность ТФЛ проведен подбор оптимального состава питательной среды для выращивания клеток *C. freundii*,

продуцирующих фермент ТФЛ. Опробированы синтетические и полноценные среды с некоторыми вариациями добавок, всего 11 сред (табл. 1). Результаты полученных данных, характеризующие удельную ТФЛ активность клеточных экстрактов, общий выход биомассы и суммарную активность в зависимости от состава питательной среды представлены в табл. 2.

**Таблица 1.** Составы питательных сред для культивирования *C. freundii*, pH 6.6-6.7.

Компо- Ненты среды (%) №	Гидролизат БВК	Гидролизат сои	Дрожжевой экст.	Глицерин	Глюкоза	L-Asp	L-Тур	Пиридоксин	Фумаровая к-та	MgSO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1*	-	-	1.0	-	-	-	0.2	0.01	-	-	-	-
2	2.5	-	1.0	-	-	-	0.2	0.01	1.0	-	-	-
3	-	2.5	1.0	-	-	-	0.2	0.01	1.0	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	0.25	0.01	-	0.1	0.001	0.5
5	-	-	1.0	-	-	-	0.25	0.01	-	0.1	0.001	0.5
6	-	-	-	2.0	-	-	0.2	0.01	-	0.1	0.001	0.5
7	-	-	1.0	2.0	-	-	0.2	0.01	-	0.1	0.001	0.5
8	-	-	-	-	2.0	-	0.2	0.01	-	0.1	0.001	0.5
9	-	-	1.0	-	2.0	-	0.2	0.01	-	0.1	0.001	0.5
10	-	-	-	-	-	2.0	0.2	0.01	-	0.1	0.001	0.5
11	-	-	1.0	-	-	2.0	0.2	0.01	-	0.1	0.001	0.5

\* **примечание:** среда на основе МПБ с указанными добавками.

*Буферные растворы:*

Буфер А: 50 мМ К,Na-фосфат, pH 8,0; 10 мМ МЭ.

Буфер Б: 10 мМ К,Na-фосфат, pH 7,3 10 мМ МЭ.

Полученные результаты показывают, что бактерии *C. freundii* обнаруживают высокую ТФЛ активность при выращивании на богатой среде № 1 с мясным бульоном и пептоном. При концентрации в среде 2,5 % гидролизатов БВК и сои (среды № 2, № 3) наблюдается такой же рост микроорганизмов и накопление ТФЛ, как и в случае среды N 1. На синтетической (бедной) среде № 4, содержащей L-тирозин в качестве единственного источника углерода и азота, наблюдается медленный рост культуры с низкой удельной ТФЛ активностью. Недостатками данной среды являются медленный рост культуры и низкое суммарное количество синтезируемого белка. Введение в среду № 4 дрожжевого экстракта приводит к повышению удельной ТФЛ активности и значительному росту биомассы клеток, однако при этом происходит и увеличение количества посторонних белков (среда № 5). Глюкоза считается хорошим источником углерода, стимулирующим рост клеток. Однако при использовании ее в качестве единственного источника углерода в концентрации 2% не наблюдали ни достаточно хорошего роста клеток, ни аккумуляции фермента (среды № 8, № 9). Аналогичный эффект был получен исследователями для ТФЛ из *E. herbicola* [6].

Авторы считают, что введение в состав питательной среды глюкозы является причиной катаболической репрессии в образовании индуцибельного фермента ТФЛ из *E.herbicolal*. Замена глюкозы глицерином, не являющимся катаболическим репрессором, в качестве единственного источника углерода, не произвела ожидаемого положительного эффекта на рост клеток и активность ТФЛ (среды № 6 и № 4). Основываясь на результатах полученных в работе [4], по потреблению определенных аминокислот в процессе роста клеток *C. intermedius* с высоким содержанием ТФЛ, мы ввели в бедную питательную среду № 4 в качестве источника углерода и азота наряду с L-тирозином и L-аспарагиновую кислоту (среда № 10). Это привело к значительному повышению удельной ТФЛ активности и обеспечило быстрый рост и накопление биомассы клеток. Добавление же дополнительно дрожжевого экстракта (среда № 11) способствовало лишь накоплению посторонних белков, о чем свидетельствует большое количество биомассы клеток и низкая удельная активность ТФЛ.

**Таблица 2.** Общий выход биомассы и удельная активность ТФЛ в зависимости от состава питательной среды.

Среда №	Общий выход биомассы, г/л среды	Удельная активность, ед	Общая активность, ед
1	9.91	0.204	202,0
2	10.36	0.227	235,0
3	9.89	0.232	229,0
4	0.31	0,009	0,3
5	10.17	0.176	179,0
6	0	0	0
7	1.64	0	0
8	0	0	0
9	1.22	0	0
10	8,46	0.330	279,0
11	10,50	0,053	550,0

Таким образом, для выращивания бактерии *C. freundii* наилучшими показателями обладает среда № 10, которая не содержит пищевых продуктов и многокомпонентной смеси индивидуальных дорогих аминокислот и состоит из доступных и дешевых компонентов. Предлагаемая нами синтетическая среда с добавлением L-аспарагиновой кислоты обеспечивает быстрый рост культуры с высокой удельной ТФЛ активностью. Удельная активность ТФЛ *C. freundii*, полученная при выращивании на среде № 10, на порядок превышает аналогичный показатель для ТФЛ *C. freundii*, известный из литературы [1].

Выделение и очистка ТФЛ из *C. Freundii*. Клеточный экстракт с максимальной ТФЛ активностью далее использовали для выделения и очистки фермента.

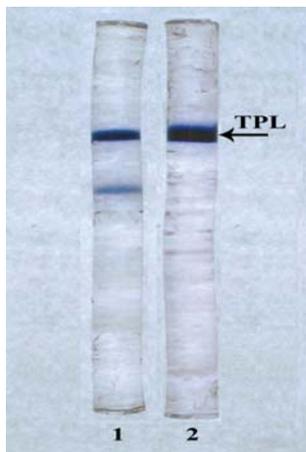
Нами был применен способ очистки фермента, включающий следующие стадии: хроматографию на ионообменнике, содержащем ДЭАЭ - тойоперл 650М, хроматографию на гидроксипатите, гель - фильтрацию через тойоперл 55F с последующим обессоливанием и концентрированием полученного препарата ТФЛ. Результаты выделения и очистки ТФЛ представлены в табл. 3.

Благодаря примененной трехэтапной схеме очистки белка, была достигнута удельная активность 1,41 Ед/мг, что соответствует показателям значений активности очищенных препаратов ТФЛ, известных из литературы [1,2,7,8]. В результате очистки значение удельной активности фермента увеличивается в 6,1 раз, а

общий выход составляет 40,2 %. Необходимо отметить, что высокое содержание ТФЛ в клетках, полученных нами на среде № 10, позволило существенно сократить число стадий очистки по сравнению со способом выделения ТФЛ, описанным в работе [2]. В частности, в предлагаемой нами схеме очистки для извлечения фермента из клеток используется простой метод ультразвуковой обработки, тогда как в литературе разрушение клеток проводят на прессе Френча с последующими многочисленными экстракциями дебриса тритоном X 100. Исключен трудоемкий и продолжительный процесс осаждения белка сернокислым аммонием с последующим диализом полученного осадка, предшествующий каждому этапу очистки; отсутствует стадия повторной гель-фильтрации.

**Таблица 3.** Результаты очистки ТФЛ из *C. freundii*.

Этапы	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная акт., ед/мг	Выход, %
Разрушение и получение клеточного экстракта	56	15,9	0,23	100,0
Хроматография на ДЭАЭ- тойоперле 650М	45	3,2	0,65	45,1
Хроматография на гидроксиапатите	10	7,5	1,22	44,8
Гель-фильтрация через тойоперл 55F	15	3,9	1,41	40,2

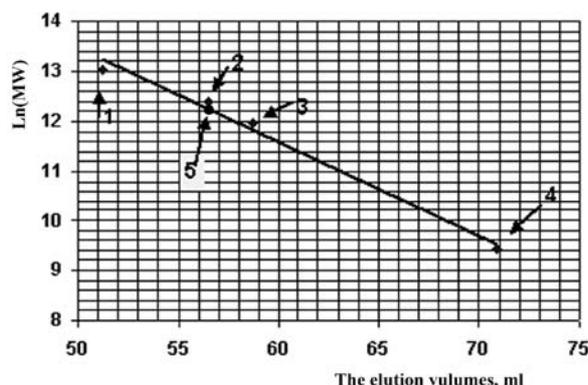


**Рис.1.** Результаты электрофореза ТФЛ из *C. freundii* 62 в 7,7 %ном полиакриламидном геле: 1 – 10 мкг препарата ТФЛ после гидроксиапатита, 2 – 30 мкг очищенного препарата ТФЛ.

Методом аналитического электрофореза в 7,7 %ном полиакриламидном геле проведена оценка степени чистоты полученного препарата ТФЛ. Показано наличие единственной белковой полосы, соответствующей активности ТФЛ, доказанной измерением активности фермента в кусках разрезанного геля (рис.1). Таким образом, разработанный метод выделения позволяет получить гомогенный препарат фермента ТФЛ.

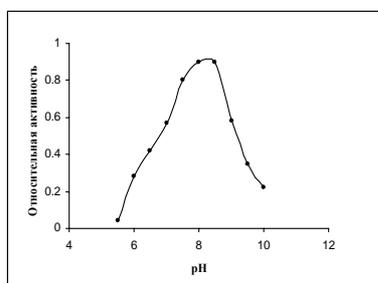
Определение молекулярной массы ТФЛ *C. freundii*. Результаты определения молекулярной массы ТФЛ методом гель-фильтрации приведены на рис.2. Из представленных результатов видно, что молекулярная масса ТФЛ, выделенной

нами из *C. freundii*, составляет 205 КДа. Для сравнения отметим, что, согласно японским исследователям, молекулярная масса ТФЛ, выделенной из *E. intermedia*, 170 КДа [6], а ТФЛ из *E. herbicola* - 259 КДа [7].

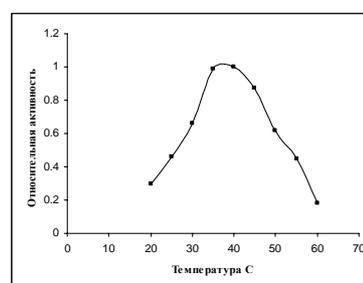


**Рис. 2.** Калибровочная кривая зависимости логарифмов молекулярных масс белков 1- ферритин, 2 - каталаза, 3 - альдолаза, 4 - цитохром С, 5 – ТФЛ от величины их элюционных объемов.

Свойства очищенной ТФЛ. Нами были изучены зависимости активности очищенной ТФЛ от температуры и рН. Данный фермент имеет температурный оптимум около 35° и рН оптимум около 8,5, что отображено на рис. 3 и 4. В области кислых рН, при значениях ниже рН 5.5 фермент подвергается необратимой инактивации, в области же щелочных рН в пределах значений рН 10-12, ТФЛ проявляет незначительную активность (точки на кривой не указаны). Полученные значения оптимума рН для ТФЛ из *C. freundii* близки значениям, полученным для ТФЛ, выделенных из различных источников. Для ТФЛ из *E. herbicola* оптимум рН около 8.2, из *E. intermedia* - около 8.5 [7, 8]



**Рис. 3.** Влияние рН на активность очищенной ТФЛ *C. freundii*.



**Рис. 4.** Влияние температуры на активность очищенной ТФЛ *C. freundii*.

При хранении очищенного фермента в буфере Б в течение трех суток при температуре 4° его активность снижается десятикратно, а по истечении 15 сут фермент инактивируется полностью. С целью повышения стабильности ТФЛ при хранении был проведен поиск возможных стабилизаторов. Исследовано влияние глицерина, ЭДТА, МЭ, фенилметилсульфонилфторида, индивидуально и в сочетании друг с другом. Полученные результаты показали, что дольше всего ТФЛ сохраняет активность при хранении в глицерине с МЭ. В течение 15 сут ее активность снижается в 2 раза, а по истечении 2 месяцев в 10 раз. Данный факт дополнительно подтверждает предположение о возможности участия SH-групп ТФЛ в катализе или в поддержании стабильной конформации фермента [1, 2, 7].

Таким образом, в результате проведенной работы разработана питательная среда для выращивания бактерии *C. freundii*, состоящая из доступных и дешевых компонентов. Предлагаемая нами синтетическая среда с добавлением L-аспарагиновой кислоты обеспечивает быстрый рост культуры с высокой удельной ТФЛ активностью, которая на порядок превышает аналогичный показатель для ТФЛ *C. freundii*, известный из литературы [1].

Предложен эффективный метод очистки ТФЛ из клеток *C. freundii*, позволяющий получить фермент с высоким выходом и с применением минимального числа стадий очистки. В результате применения описанного нами метода очистки значение удельной активности ферментного препарата увеличивается в 6,1 раз, а общий выход составляет 40,2 %. Полученный очищенный ферментный препарат имеет максимальную активность при температуре 35° и рН 8,5. Показано, что при хранении в глицерине с МЭ период полуинактивации фермента многократно увеличивается и составляет 15 сут.

Автор благодарит профессора Г. П. Алебяна и кандидата биологических наук А.А. Амбарцумяна за участие в обсуждении экспериментальных данных, а также за ценные и критические замечания в ходе оформления статьи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Демидкина Т.В., Мягих Т.В., Фалеев Н. Г., Беликов В. М. Выделение и некоторые свойства тирозин-фенол-лиазы из *Citrobacter intermedius*. Биохимия, 49, вып. 1, с. 32-36, 1984.
2. Сысуюев В.А., Тысячная И.В., Яковлева В.И., Куплетская М.Б., Березин И.В. Выделение, очистка и некоторые свойства тирозин-фенол-лиазы из клеток *Citrobacter freundii*. Биохимия, 45, вып. 5, с. 32-36, 1980.
3. Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.. Практикум по микробиологии. С. 56-62, Изд. "Колос", Москва, 1979.
4. Фалеев Н. Г., Садовникова М. С., Цырякин В. А., Недоспасов Л. В., Беликов В. М. Селективное потребление различных аминокислот клетками *Citrobacter intermedius*, продуцирующими тирозин-фенол-лиазу, новый подход к составлению питательной среды. Прикладная биохимия и микробиология, 28, вып. 2, 1992.
5. Enei H., Matsu H., Nakazawa H., Okumura S., Yamada H. Synthesis of L-tyrosine or 3,4-dihydroxyphenyl -L-alanine from DL-serine and phenol or pirocatechol. Agr. Biol. Chem., 37, 3, p. 493-499, 1973.
6. Enei H., Yamashita K., Okumura S., Yamada H. Culture conditions for the preparation of cells containing high tyrosine phenol lyase activity. Agr. Biol. Chem., 37, 3, 485-492, 1973.
7. Kumagai H., Kashima N., Torii H., Yamada H., Ehei H., Okumura S. Purification, crystallization and properties of tyrosine phenol lyase from *Erwinia herbicola*. Agr. Biol. Chem., 36, 3, p. 472-482, 1972.
8. Kumagai H., Yamada H. Tyrosine phenol lyase. 1. Purification, crystallization, and properties. The Journal of Biological Chemistry, 245, 7, p.1767-1772, 1970.
9. Para G., Baratti J. Effect of cultural conditions on the production of tyrosine phenol-lyase by *Erwinia herbicola*. Appl. Envir. Microbiology, 48, 6, p.1256—1258, 1984.
10. Peterson G. Methods in Enzymology, 91, 1, p. 95-119, 1983.
11. Phillips R., Demidkina T., Zakomirdina L., Bruno S., Ronda L., Mozzarelli A. Crystals of tryptophan indol lyase and tyrosine phenol lyase form stable quinonoid complexes. The J. of Biol. Chem. 277, 24, p. 21592-21597, 2002.
12. Polyacrylamide Gel Electrophoresis, laboratory techniques. Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

Поступила 13.10.2009.