А 03.00.02
Г-939

ՀՀ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ և ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՂՈՒԿԱՍՅԱՆ ԳԵՂԱՄ ՍԱՐԳՍԻ

ASPERGILLUS ՍՆԿԵՐԻ ԹԻՐՈԶԻՆԱԶԱՅԻ ՍԻՆԹԵԶԻ ՕՊՏԻՄԻԶԱՑԻԱՆ և ՖԻԶԻԿԱ-ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.02-Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 1999

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГУКАСЯН ГЕГАМ САРГИСОВИЧ

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТИРОЗИНАЗЫ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 -Биофизика

ЕРЕВАН-1999

© National Library of Armenia OCR by Portmind

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական խորհրդատուներ — Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Ա. Հ. Թռչունյան; Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու Զ. Ն. Բաղդասարյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ — Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Ա. Լ. Սիմոնյան; Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Մ. Ա. Սիմոնյան

Առաջատար կազմակերպություն — Հայաստանի "Կենսատեխնոլոգիա" գիտահետազոտական ինստիտուտ

Պաշտպանությունը կայանալու է «30» սեպտեմբերի 1999թ., ժամը 14⁰⁰
Երևանի պետական համալսարանի 051 մասնագիտական խորհրդում
(375049, Երևան, Ալեք Մանուկյան փող. 1, ԵՊՀ, կենսաբանական ֆակուլտետ).
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում
Սեղմագիրն առաքվել է 30 օգոստոսի 1999թ.

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար — Ս. Ա. Ղոնյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научные консультанты: — Доктор биологических наук, профессор А. А. Трчунян; Кандидат биологических наук, с.н.с З. Н. Багдасарян

Официальные оппоненты: — Доктор биологических наук, профессор А. Л. Симонян; Доктор биологических наук, профессор М. А. Симонян

Ведущая организация: — Научно исследовательский институт "Биотехнология"

Защита состоится 30 октября 1999г. в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного Совета 051 при Ереванского государственном университете (375049, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕрГУ, биологический факультет).
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.
Автореферат разослан «30» августа 1999г

Ученный секретарь Специализированного Совета, кандидат биологических наук — С. А. Гонян

2245-99

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Фенолоксидазы - важнейший класс ферментов, обладающих рядом уникальных свойств и широким спектром физиологических функций. Это металлсодержащие ферменты участвующие наряду с процессами синтеза и разложения, в процессах переноса электронов при дыхании и фотосинтезе. Одним из наиболее интересных объектов исследований, среди фенолоксидаз, является тирозиназа (КФ 1.14.18.1), обладающая двумя каталитическими свойствами - гидроксилазной и дегидрогеназной. Объединение двух каталитических свойств в одном ферменте делают тирозиназу хорошим объектом для исследования физической химии ферментативного катализа.

С другой стороны, недостаточно выяснена физиологическая роль тирозиназы. Одной из основных и наиболее исследованных функций тирозиназы является участие в синтезбе меланинов (Лях, 1972; Mishima,1994) У высших организмов тирозиназа участвует в синтезе гормонов, регулирующих деятельность центральной нервной системы (Birkmayer, 1989). Менее исследована роль тирозиназы в жизнедеятельности микроорганизмов, у которых, по-видимому, меланиногенез не является единственной функцией тирозиназы. Выдвинуто предположение об участии тирозиназы в дыхании и аккумуляции энергии окисления субстратов в виде макроэргических соединений (Bull, 1973). Таким образом, выяснение функций тирозиназы является одним из интересных проблем биофизики и биохимии микроорганизмов. К настоящему времени не выяснена внутриклеточная локализация тирозиназы: имеются противоречивые данные о существовании цитоплазматической и мембраносвязанной тирозиназы (Garsia-Borron,1985; Благоева, 1984). Интерес к тирозиназе имеет и практическое значение. В частности перспективным является применение тирозиназы для синтеза 3,4-дигидроксифенилаланина (дофа) из тирозина и для создания биосенсоров при определении ряда фенольных соединений.

Целью работы явилась оптимизация условий синтеза и исследование физико-химических свойств, структуры активного центра и механизма действия тирозиназы грибов рода *Aspergillus*. Для достижения этой цели были поставлены задачи:

- Выявление продуцентов тирозиназы
- Исследование физиологической функции фермента
- Оптимизация условий синтеза
- Получение гомогенного препарата тирозиназы и исследование его физико-химических свойств
- Применение тирозиназы в трансформации тирозина в ДОФА.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые обнаружен эффект индукции тирозиназы у грибов рода *Aspergillus* гидролизным лигнином и некоторыми соединениями фенольной природы. Показано, что активация синтеза тирозиназы связана с включением этих соединений в метаболизм гриба и, что тирозиназа участвует в окислительной деградации их ароматического кольца. Метаболическая роль тирозиназы установлена

© National Library of Armenia

Таблица 1.

Распространение тирозиназы среди грибов родов *Aspergillus, Fuzarium и Penicillium*

Род Микроорганизмов	Число исследованных видов	Число исследованных штаммов	Число активных штаммов
ASPERGILLUS	32	506	41
FUSARIUM	17	200	16
PENICILLIUM	23	206	20

Таблица 2.

Тирозиназная активность грибов при росте на среде Чапека и на среде с лигнином

Штаммы грибов	Среда Чапека		Среда с лигнином*	
	Выход биомассы г/л	Тирозиназная активность, ед/г	Выход биомассы г/л	Тирозиназная активность, ед/г
Asp. flavipes 632	48	1,4	48	130
Asp. flavipes 0110	32	2	40	180
Asp. flavipes 10258	36	1,6	40	160
Asp. flavipes 56003	36	10	40	450
Asp. flavipes 65	40	1,04	40	100
Asp. flavipes 22	44	0,9	32	80
Asp. flavipes 1012	36	0,85	36	70
Asp. flavipes 5003	44	5	48	350
Asp. flavus 0377	24	1,3	44	70
Asp. flavus 10573	31	1,5	36	80

*Состав среды: глюкоза- 5гр/л, лигнин-5гр/л, остальное аналогично среде Чапека.

растущего гриба приводило к активации синтеза тирозиназы и не обнаруживалось ингибирование роста биомассы. Изменение тирозиназной активности не наблюдалось при добавлении фенолов к культуре в стационарной фазе роста.

Таблица 3.

Влияние фенолов на рост и тирозиназную активность гриба *Aspergillus flavipes* 56003

Соединение	После 48 ч роста		После 120 ч роста	
	Выход биомассы, г/л	Тирозиназная активность, ед/г	Выход биомассы, г/л	Тирозиназная активность, ед/г
Фенол	34	220	18	10
p-Крезол	34	280	18	10
Пирогаллол	36	120	18	10
p-Аминофенол	32	200	18	10

Механизм разложения лигнина и метаболическая роль тирозиназы. Исследование динамики роста культуры показало, что в начале роста происходит быстрое усвоение глюкозы (рис. 1). Разложение полимерного лигнина наблюдается, начиная с

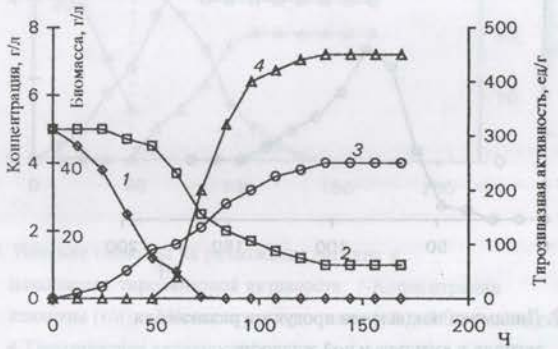


Рис.1. Динамика роста гриба на среде с лигнином.

1 - Концентрация глюкозы (г/л), *2* - Концентрация лигнина (г/л), *3* - Биомасса(г/л), *4* - Тирозиназная активность(ед/г)

24ч роста, и заметно активируется на вторые сутки. К концу роста утилизируется около 80% исходного лигнина. Тирозиназная активность проявляется, начиная с 60ч роста, и достигает максимального значения к началу стационарной фазы. Кривая роста биомассы характеризуется наличием диауксии. Замедление роста наблюдается на 48-60 ч, после чего снова активируется. Анализ культуральной жидкости показал, что разложение лигнина

© National Library of Armenia

сопровождается накоплением в питательной среде растворимых ароматических соединений. Динамика накопления этих соединений имеет типичную кинетику промежуточных продуктов. Концентрация этих соединений достигает максимума на 72-80ч роста, после чего начинает снижаться (рис. 2). Полученные результаты предполагают следующую последовательность активации тирозиназы. В процессе роста происходит быстрое истощение легко усваиваемого источника углерода и энергии. Гриб синтезирует ферменты, разлагающие полимерную структуру лигнина. Разложение лигнина происходит с образованием растворимых ароматических соединений. Накопление этих соединений в питательной среде до определенной концентрации приводит к индукции синтеза тирозиназы. При сопоставлении динамики разложения лигнина и накопления тирозиназной активности очевидно, что тирозиназа не участвует в разложении полимерной структуры лигнина. Активация тирозиназы происходит под влиянием продуктов разложения лигнина и видимо, тирозиназа участвует в процессе включения этих соединений в метаболизм гриба. Такое предположение согласуется с результатами исследования влияния простых фенолов на тирозиназную активность гриба (табл. 3).

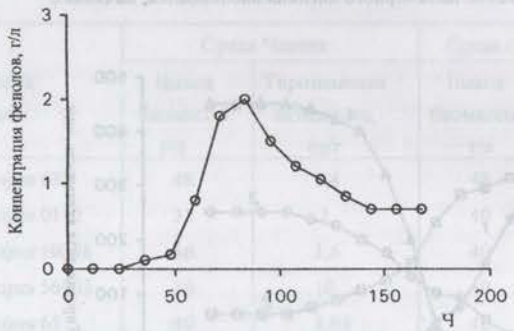


Рис. 2. Динамика накопления продуктов разложения лигнина в культуральной жидкости

Соединения, близкие по строению к продуктам разложения лигнина, вызывают активацию синтеза тирозиназы активно растущей культуры, и происходит их включение в метаболизм гриба. Было показано, что увеличение концентрации глюкозы по отношению к лигнину приводит к торможению разложения лигнина и синтеза тирозиназы. Однако грибы не проявляли способность расти на среде с лигнином в качестве единственного источника углерода. Некоторое минимальное количество легко усваиваемого источника углерода и энергии необходимо для начального роста гриба и синтеза ферментов, разлагающих лигнин. Влияние глюкозы на разложение лигнина и синтез тирозиназы более

наглядно показано на рис. 3. В отличие от динамики роста гриба на лигнин- содержащей среде (рис. 1), после достижения 48-50ч роста в питательную среду дополнительно вводили глюкозу с конечной концентрацией 5г/л. При этом происходило подавление процесса разложения лигнина и синтеза тирозиназы. Эти результаты показывают, что активация синтеза тирозиназы имеет метаболическое значение и, что тирозиназа участвует в дальнейшем включении продуктов разложения лигнина в метаболизм гриба. Мы предполагаем, что наиболее вероятным является окислительная деградация лигнина, представленная на рис. 4. В цепи реакций важное значение имеет образование орто-дифенолов из монофенолов и роль тирозиназы в процессе утилизации лигнина, возможно, заключается в катализе этой реакции.

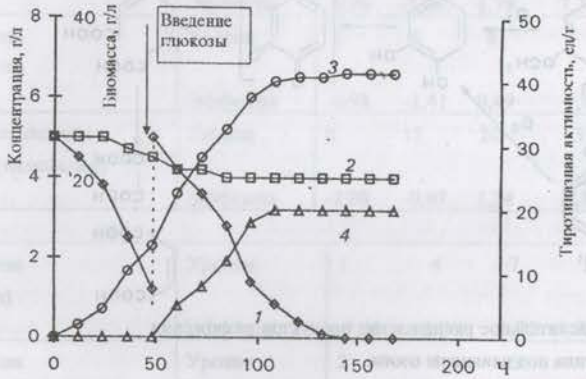


Рис.3. Влияние глюкозы на разложение лигнина и накопление тирозиназной активности: *1*-Концентрация глюкозы (г/л), *2*-Концентрация лигнина (г/л), *3*-Биомасса(г/л) *4*-Тирозиназная активность(ед/г)

Математические модели индукции синтеза тирозиназы. Для определения количественных характеристик зависимости тирозиназной активности от концентраций глюкозы и лигнина нами проведена оптимизация условий синтеза тирозиназы. Задача оптимизации сводилась к нахождению оптимальных условий, обеспечивающих максимальный выход процесса. При исследовании индукции синтеза тирозиназы, мы применили математические методы планирования эксперимента для определения количественных характеристик функций откликов выходов на изменение значений входных факторов и использование этих результатов в объяснении механизмов разложения лигнина и активации синтеза

© National Library of Armenia

тирозиназы. В качестве входных факторов принимали концентрацию глюкозы, лигнина и скорость подачи кислорода. Важность значения скорости подачи кислорода, на наш взгляд, вытекает из предложенного окислительного механизма деградации лигнина (рис. 4). Эксперимент проводили по плану из трех факторов на 4-х уровнях с числом экспериментов 16. Значения уровней входных факторов изменяли в предварительно установленных пределах. Выход процесса контролировали по росту биомассы и тирозиназной активности. Математическую обработку результатов эксперимента проводили согласно аддитивно-решетчатому описанию и с помощью уравнения множественной линейной регрессии.

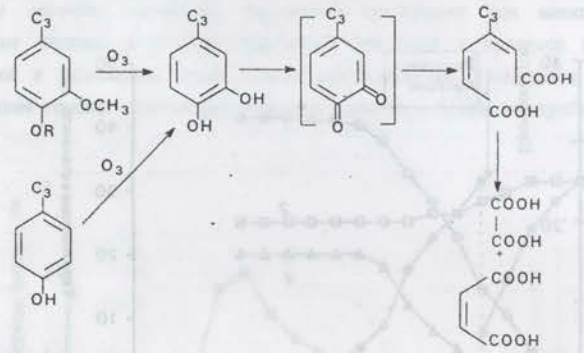


Рис. 4. Окислительное расщепление продуктов разложения лигнина под влиянием озона.

Аддитивно-решетчатое описание позволяет найти коэффициенты влияния уровней входных факторов на отдельные выходы процесса. Вычисление этих коэффициентов проводили согласно формулам (Бирюков, 1985):

$$b_0 = (\sum_{j=1}^{N} Y_j)/N \quad \text{и} \quad b_{ik} = (\sum_{j=1}^{N} Y_{ij}^{(k)})/(N/m) - b_0 \quad (1),$$

где Y_j - выход в j-м сочетании планирования; N - общее число сочетаний в плане; m- число уровней каждого фактора; $\sum Y_{ij}^{(k)}$ - сумма выходов в тех сочетаниях плана, где i -й фактор находится на k-м уровне.

После нахождения уровней факторов, имеющих максимально положительные коэффициенты, выход процесса вычисляется согласно формуле:

$$Y=b_0 + f_1 [X_1] + f_2 [X_2] + \ldots\ldots + f_n [X_n] \quad (2).$$

Где b_0 - экспериментальное среднее значение выхода, f_i-наибольший коэффициент влияния, X_i - значение данного уровня.

Вычисленные значения коэффициентов аддитивно-решетчатого описания для использованных уровней входных факторов по выходам биомассы и тирозиназной активности представлены в табл.4.

Таблица 4.

Коэффициенты аддитивно-решетчатого описания оптимизации синтеза тирозиназы по отдельным выходам:

А- Выход биомассы (г/л)

Б- тирозиназная активность(ед/л)

А

Концентрация лигнина (г/л)	Уровни	1	4	7	10
	Эффекты	-6,06	-3,06	1,79	7,32
Концентрация глюкозы (г/л)	Уровни	2	4	6	8
	Эффекты	-6,98	-1,41	0,49	7,89
Скорость поглощения кислорода (мкмоль/л.ч)	Уровни	8	15	20	32
	Эффекты	-2,08	-0,01	1,24	0,84

Б.

Концентрация лигнина (г/л)	Уровни	1	4	7	10
	Эффекты	-9,44	-5,06	6,72	7,79
Концентрация глюкозы (г/л)	Уровни	2	4	6	8
	Эффекты	16,94	12,59	-14,57	-14,16
Скорость поглощения кислорода (мкмоль/л.ч)	Уровни	8	15	20	32
	Эффекты	-6,74	-2,01	5,42	3,34

Полученные результаты показывают, что увеличение концентраций глюкозы и лигнина положительно влияют на выход биомассы, а влияние скорости подачи кислорода на выход биомассы максимально при 20мкмоль/л.ч. Значения коэффициентов влияния концентрации глюкозы и лигнина на выход тирозиназной активности характеризуются резким антагонизмом. Изменение концентрации лигнина с нижнего уровня до верхнего приводит к увеличению коэффициента , а в случае глюкозы значение коэффициента, наоборот, снижается (табл.4). Эти данные хорошо согласуются с предположением, что активация тирозиназы происходит при переключении метаболизма гриба от усвоения

© National Library of Armenia

глюкозы к усвоению лигнина. Нижние уровни концентрации глюкозы имеют положительный коэффициент влияния, так как глюкоза способствует начальному росту биомассы и синтезу ферментов, разлагающих лигнин. Как по выходу биомассы, так и по тирозиназной активности максимальное значение наблюдается при значении 20мкмоль/л.ч. Сопоставляя это значение с потребностью культуры в кислороде при росте на среде Чапека, обнаружено, что при росте на лигнин- содержащей среде происходит увеличение потребности культуры в кислороде. Этот факт также можно объяснить, исходя из механизма окислительной деградации лигнина.

Математическую модель удается более приблизить к истинному процессу с помощью полиномиального уравнения множественной линейной регрессии (Афифи, 1982). В этой модели, учитываются также межфакторные взаимодействия. Общий вид уравнения следующий:

$$Y_i = \beta_0 + \Sigma\beta_i X_i + \Sigma\beta_{ij} X_i X_j + \Sigma\beta_{ii} X_i^2$$

Уравнение линейной регрессии имеет вид:

$$Y_i = \beta_0 + \Sigma\beta_i X_i + e$$

где e- ошибка аппроксимации.

С учетом экспериментальных результатов получены следующие линейные уравнения, описывающие выход биомассы (F_1) и выход тирозиназной активности (F_2):

$$F_1 = -5{,}99 + 1{,}49X_1 + 2{,}32X_2 + 0{,}11X_3$$

$$F_2 = 35{,}72 + 2{,}11X_1 - 6{,}14X_2 + 0{,}43X_3$$

Где X_1, X_2, X_3 - значения концентрации лигнина, глюкозы и скорости подачи кислорода.

Из полученных уравнений следует, что глюкоза влияет на тирозиназную активность отрицательно. Сопоставление значений коэффициентов влияния лигнина и скорости подачи кислорода показывает, что эти факторы более выраженно влияют на выход биомассы. При оценке соответствия модели множественной линейной регрессии экспериментальным данным было обнаружено 75% соответствие.

Физико-химические свойства тирозиназы.

Очистка фермента. Из гриба *Asp. flavipes* 56003 получен гомогенный, по электрофоретической подвижности и по молекулярной массе, препарат тирозиназы. Очистка тирозиназы включала ряд этапов (табл. 5).

В ходе очистки были обнаружены три молекулярные формы фермента с молекулярными массами 130, 240 и 520кДа. Эти формы фермента являются мономером, димером и тетрамером одного полипептида. В растворе эти формы находятся в состоянии динамического равновесия с приблизительным соотношением 4:1:1.

Таблица 5.

Сводная таблица результатов очистки тирозиназы из Asp. flavipes 56003.

Этапы очистки	Объем (мл)	Общий белок (мг)	Удельная активность (ед/мг)	Выход (%)	Степень очистки
Грубый экстракт	1000	2800	14,3	100	1
Концентрирование	33	234,2	50,65	33,3	3,54
Гель - фильтрация	50	16	700	28	49,56
Ионообменная хроматография	1 2	1,8	750	3,3	53
	2 6	7,672	1000	19,1	71,8
	3 2	1,9	900	4,3	63,4

Были обнаружены растворимая и нерастворимая фракции тирозиназы. В настоящее время не выяснена природа нерастворимости тирозиназы. Некоторые авторы считают, что нерастворимость фермента обусловлена мембранной природой (Rob, 1988) другие - артефактом, обусловленным необратимой адсорбцией фермента на полифенолах в ходе выделения фермента (Рубин, 1976). Наши исследования позволили предположить, что нерастворимая тирозиназа определяется физиологическим состоянием гриба. Было показано, что соотношение количеств растворимой и нерастворимой тирозиназ зависит от температуры культивирования (рис. 5): при снижении температуры ферментации количество растворимой тирозиназы растет и может достигнуть около 35% от общего количества. Возможно, что состояние тирозиназы связано с альтернативностью использования энергии окисления фенолов.

Физико-химические свойства. Как уже было отмечено, тирозиназа гриба *Asp. flavipes* 56003 встречается в виде мономера, димера и тетрамера. Молекулярная масса мономера, согласно результатам гель-фильтрации и ультрацентрифугирования, составляет 130кДа, фермент имеет изоэлектрическую точку в области pH 4,6. Спектр абсорбции (рис. 6) тирозиназы характеризуется слабым плечом при 340-400нм, который характерен для всех тирозиназ (Roob, 1983) и обусловлен наличием атомов меди в активном центре фермента.

© National Library of Armenia

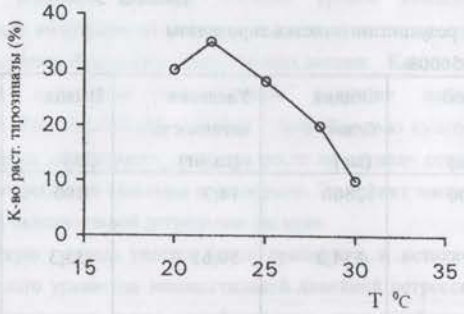


Рис. 5. Влияние температуры культивирования на количество растворимой тирозиназы (% -от суммарной активности) *Asp. flavipes* 56003.

Сопоставление спектров голо и апо тирозиназ показывает, что удаление атомов меди действительно приводит к исчезновению этого плеча (рис. 6).

Для очищенной тирозиназы имеется два основных спектральных индекса чистоты: A_{280}/A_{360} и A_{280}/A_{260}. Для тирозиназы *Asp. flavipes* 56003 эти величины составляют 10 и 2 соответственно.

Определение количества атомов меди показало, что мономер тирозиназы с молекулярной массой 130кДа содержит два атома меди. Атомы меди удается удалить с помощью азида. Ферментативная активность полностью восстанавливается после диализа против раствора сульфата меди. Для выяснения роли гистидиновых остатков и их числа в связывании атомов меди, нами проведены эксперименты по их модификации, которые показалы, что после удаления меди с модификатором связываются дополнительно три остатка гистидина. Модификация гистидиновых остатков апо тирозиназы приводит к потере способности регенерации в присутствии ионов меди. Эти результаты показывают, что в активный центр фермента входят три остатка гистидина, ответственных за связывание атомов меди.

Тирозиназа катализирует окисление ряда ароматических соединений - производных фенола и пирокатехина. Для некоторых из них нами определены основные кинетические параметры. При окислении *p*-крезола, фенола, тирозина, пирокатехина и дофа значения K_m и V_m составляют 0,48мМ, 0,5мМ, 0,3мМ, 4,5мМ, 5мМ и $1,13x10^3$мкм/мин.мг, $0,95x10^3$мкм/мин.мг, $1,3x10^3$мкм/мин.мг, $1,05x10^4$мкм/мин.мг и $1,6x10^4$мкм/мин.мг, соответственно. Тирозиназа катализирует окисление монофенолов в достаточно широком пределе pH 2,5-8,5 с максимумом при pH 6,8. Окисление же дифенолов происходит при значениях pH выше 3,5 с максимумом в пределе pH 6,2-6,8. Оптимальное значение температуры окисления монофенолов составляет 35^0C а дифенолов 40^0C.

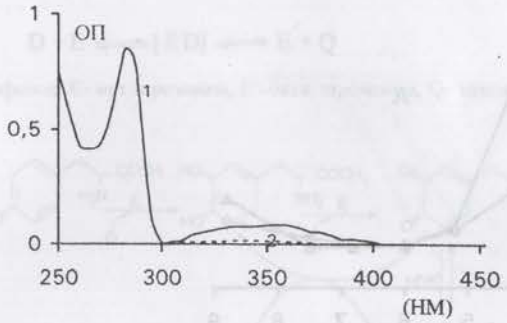
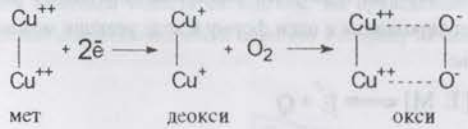


Рис.6. Спектр поглощения нативной (1) и апо-тирозиназы (2).

Известно, что влияние кислотности среды на сродство субстрата к ферменту зависит от степени диссоциации ионогенных групп активного центра фермента и субстрата (Lerch, 1972). Из полученных нами результатов видно, что характер зависимости K_m от pH (рис.7) обусловлен принадлежностью субстратов к моно или дифенолам. Сопоставление результатов для пар тирозин- фенол и дофа- пирокатехин показывает, что побочный радикал субстрата не влияет на форму кривых зависимости K_m от pH. Основное значение имеет степень диссоциации ионогенных групп активного центра фермента. В связывании моно- и ди- фенолов участвуют разные группы активного центра.

К механизму окисления монофенолов. Окисление монофенолов тирозиназой представляет собой последовательность двух этапов превращений (рис. 8). Ферментативными в этой цепи являются гидроксилирование монофенолов и дегидрогенизация образовавшегося дифенола. Обе реакции катализируются тирозиназой. Хиноны, образующиеся дегидрогенизацией дифенолов - лабильные соединения и претерпевают ряд химических превращений до образования стабильных структур. Стабилизация хинонов может происходить либо внутримолекулярной циклизацией, либо взаимодействием с водой или другим нуклеофилом. Химический этап превращения хинонов влияет на скорость ферментативных реакций. Другим моментом в понимании особенностей окисления монофенолов является существование каталитически неидентичных форм тирозиназы. Наличие этих форм обусловлено валентностью ионов меди активного центра тирозиназы. Изменение состояния активного центра тирозиназы можно представить следующей схемой:



© National Library of Armenia

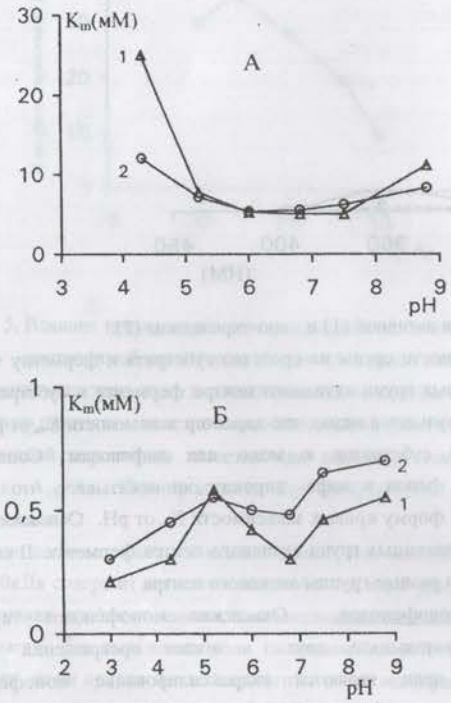


Рис. 7. Влияние pH на Km окисления.

А- ДОФА (1) и пирокатехина (2) Б- тирозина (1) и *p*- крезола(2)

Окисление монофенолов характеризуется наличием лаг- периода. Это объясняется тем, что в препарате тирозиназы основное количество фермента находится в мет состоянии, и лишь незначительная часть в -окси. Активация окисления монофенолов связана с увеличением количества окси тирозиназы в ходе реакции. Можно предположить, что кинетика окисления монофенолов тирозиназой имеет автокаталитический характер. Исходя из схемы, приведенной на рис. 8, возможно, что активатором тирозиназы в ходе реакции является дифенол, который образуется вследствие спонтанного восстановления хинонов. Превращение мет тирозиназы в окси форму в ходе реакции можно представить согласно следующей схемы:

$$E' + M \rightleftharpoons [E'M] \rightleftharpoons E' + Q$$

$$Q \rightleftharpoons D$$

$$D + E \rightleftharpoons [ED] \rightleftharpoons E' + Q$$

где D-дифенол, E- мет тирозиназа, E'- окси тирозиназа, Q- хинон и M-монофенол

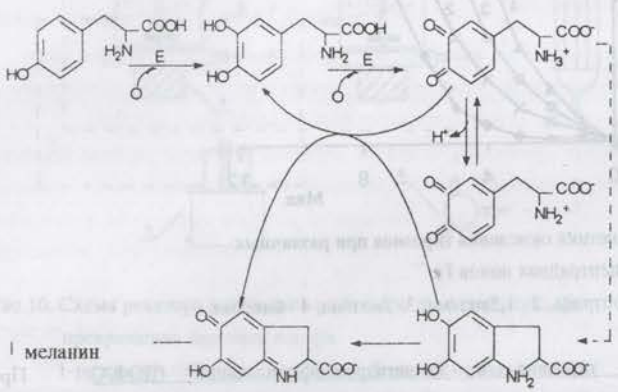


Рис. 8. Механизм синтеза меланина .

Автокаталитический характер реакции удается установить при проведении реакции с различными исходными концентрациями активного катализатора. При этом получается пучок S- образных кривых с перемещением точки перегиба в сторону начала координат (Эмануэль, 1969). В случае тирозиназной реакции необходимо было провести реакцию при различных исходных концентрациях окси- тирозиназы. Мы использовали косвенный подход, с учетом способности Fe^{++} восстанавливать ионы меди активного центра тирозиназы и способствовать образованию окси- тирозиназы (Palumbo, 1985). Проведение реакции окисления тирозина тирозиназой в присутствии различных концентраций ионов железа (рис.9) показало, что полученные кривые соответствуют автокаталитическому характеру. Необходимо отметить, что активация в присутствии ионов железа характеризуется наличием области насыщения. На приведенных кривых это отражается неравномерностью перемещения точки перегиба в сторону начала координат.

© National Library of Armenia

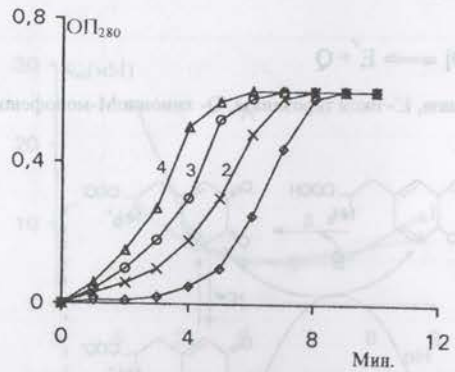


Рис. 9. Кинетика окисления тирозина при различных концентрациях ионов Fe^{++}.
1-контроль, 2- 1,5мкг/мл, 3- 2мкг/мл, 4 -4мкг/мл.

Трансформация тирозина в 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА). Процесс гидроксилирования тирозина идет одноэтапно с высокой специфичностью (Адзиномото, 1976). Первый недостаток такого процесса связан с тем, что тирозиназа также катализирует окисление ДОФА и при проведении реакции необходимо подобрать условия, позволяющие направить реакцию в сторону накопления промежуточного процесса. Мы показали, что это можно осуществить при проведении реакции в кислой среде (pH 2,5-3,0) и в присутствии восстановителей. При использовании эквивалентного количества аскорбиновой кислоты нам удалось осуществить 95% трансформацию тирозина в дофа. Другая проблема связана с низкой растворимостью тирозина, вследствие чего, даже при очень высокой степени трансформации продукт получается с низкой конечной концентрацией. Для устранения этого недостатка нами было предложено использование закрытого циклического процесса с использованием реактора идеального смешения (рис. 10). Установка представляет собой резервуар для субстрата, реактор идеального смешения и катионообменную колонку. С помощью насоса насыщенный раствор субстрата подается в реактор с катализатором (тирозиназа), затем смесь продукта с остатками субстрата подается на колонку. На катионообменнике происходит связывание продукта и субстрата, а буферная смесь снова подается в резервуар с субстратом, где, снова насыщаясь, подается в реактор. После насыщения ионообменника колонку отделяли от системы и продукт элюировали градиентом концентрации HCl (0-0,5M). Дальнейшую очистку дофа проводили дробным осаждением. В результате нам удалось получить продукт с 99% чистотой и ~70% выходом.

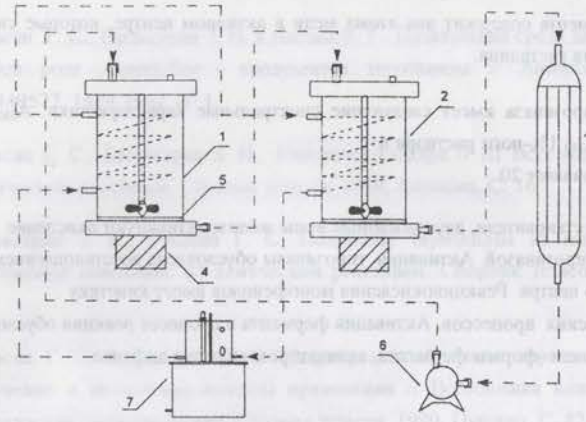


Рис.10. Схема реактора идеального смешения, для осуществления превращения тирозина в дофа.
1-резервуар субстрата, 2-реактор, 3-ионообменная колонка, 4-мешалка, 5-фильтр, 6-насос, 7-термостат.

ВЫВОДЫ

1) Среди представителей грибов *Asp. flavus* и *Asp. flavipes* выявлены штаммы с высокой тирозиназной активностью.

2) Гидролизный лигнин и некоторые фенольные соединения при введении в питательную среду с недостатком углевода активируют синтез тирозиназы. Фенол, *p*-аминофенол, *p*-оксибензойная кислота при введении в среду в фазе активного роста культуры также приводят к активации синтеза тирозиназы.

3) С помощью математических моделей анализа микробиологических процессов получены функции зависимости выхода биомассы и тирозиназной активности от концентраций глюкозы, лигнина, а также от скорости поглощения кислорода.

4) Получена гомогенная, по электрофоретической подвижности и по молекулярной массе, тирозиназа из гриба *Asp. flavipes* 56003.При этом обнаружены две формы тирозиназы: растворимая и мембраносвязанная, количественное соотношение этих форм зависит от температуры культивирования. Тирозиназа имеет три молекулярные формы с массами 130кДа, 240кДа и 520кДа и изоэлектрическими точками в области pH 4,6; 4,4 и 5,0 .

© National Library of Armenia

Мономер фермента содержит два атома меди в активном центре, которые связаны с тремя остатками гистидина.

5) Гомогенная тирозиназа имеет следующие спектральные характеристики: $A_{280}/A_{260}=2$, $A_{280}/A_{360}=10$, A_{280} 1%-ного раствора в 1см кювете составляет 20.

6) Дифенолы, восстановители, двухвалентные ионы железа активируют окисление монофенолов тирозиназой. Активация тирозиназы обусловлена восстановлением ионов меди активного центра. Реакцияокисления монофенолов имеет кинетику автокаталитических процессов. Активация фермента в процессе реакции обусловлена образованием окси -формы фермента, активатором является дифенол.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Получен нерастворимый препарат тирозиназы с высокой удельной активностью (200ед/мг) и стабильностью, который может быть использован для получения дофа из тирозина, в проточной системе для определения концентраций различных фенольных соединений, а также синтеза 5-s- цистеинилдофа со -окислением цистеина и дофа.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Гукасян Г. С., Пасоян В. Г. О некоторых особенностях синтеза тирозиназы грибами *Aspergillus oryzae*// VII съезд Всесоюзного микробиологического общества. Сборник тезисов, Алма-Ата , 1985, Т.2, С.39.

2. Гукасян Г. С., Пасоян В. Г., и Матевосян Р. О. Биосинтез L-Дофа из L-Тирозина// Республиканская конференция, посвященная проблемам физико-химической биологии. Сборник тезисов, Ереван, 1986, С. 125.

3. Гукасян Г. С., Редчиц Т. И., Билай Т. И., Захарченко В. А., Багдасарян З. Н., Пасоян В. Г. Тирозиназная активность мезо- и термофильных микромицетов // Микробиологический журнал (Киев), 1987, Т. 49, N⁰ 6, С. 54-59.

4. Гукасян Г. С., Багдасарян З. Н., и Пасоян В. Г. Штамм грибов *Aspergillus flavipes* - продуцент тирозиназы // Авторское свидетельство N⁰1437395, 1988, Бюл. N⁰ 42.

5. Гукасян Г. С., Багдасарян З. Н. и Пасоян В. Г. Трансформация некоторых производных фенола грибной тирозиназой // В сборнике «Органические реактивы для научных исследований, 1988, Москва, С. 39-43.

6. Гукасян Г. С., Багдасарян З. Н. и Пасоян В. Г. Питательная среда для культивирования грибов рода *Aspergillus* - продуцентов тирозиназы // Авторское свидетельство N⁰1449577, 1989, Бюл. N⁰ 1.

7. Гукасян Г. С., Багдасарян З. Н. Биосинтез L-Дофа // III Всесоюзное совещание по химическим реактивам. Сборник тезисов, 1989, Ашхабад, С. 16.

8. Багдасарян З. Н., Гукасян Г. С. Получение тирозиназы из микромицетов // III Всесоюзное совещание по химическим реактивам. Сборник тезисов, 1989, Ашхабад, С. 17.

9. Гукасян Г. С., Багдасарян З. Н. Индуцированный синтез тирозиназы микомицетов, получение и возможные аспекты применения // Всесоюзная конференция «Новые направления Биотехнологии». Сборник тезисов, 1990, Пущино, С. 82.

10. Гукасян Г. С. Влияние лигнина на рост и тирозиназную активность грибов рода *Aspergillus* // Биохимия, 1999, Т. 64, N. 2, С. 274-278.

11. Гукасян Г. С. Очистка и некоторые свойства тирозиназы из *Aspergillus flavipes* 56003 // Биохимия, 1999, Т. 64, N. 4, С. 497-501.

© National Library of Armenia

ՂՈՒԿԱՍՅԱՆ ԳԵՂԱՄ ՍԱՐԳԻՍ

ASPERGILLUS ՍՆԿԵՐԻ ԹԻՐՈԶԻՆԱԶԱՅԻ ՍԻՆԹԵԶԻ ՕՊՏԻՄԻԶԱՑԻԱՆ և ՖԻԶԻԿԱ-ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ թիրոզինազա, լիգնին, օպտիմիզացիա, կենսատրոհում, *Aspergillus*.

Կենսաքիմիական փոխարկումների կարևոր մաս է հանդիսանում արոմատիկ բնույթի նյութերի տրոհումը և սինթեզը: Այդ ռեակցիաները խթանվում են հատուկ ֆերմենտների՝ ֆենոլօքսիդազաների շնորհիվ: Ֆենոլօքսիդազաների տիպիկ ներկայացուցիչ է հանդիսանում թիրոզինազան, որը շատ տարածված է բնության մեջ և հայտնաբերված է կենդանի օրգանիզմների զարգացման բոլոր մակարդակներում (Պոմերենզ, 1974; Լերչ, 1976; Բալգինզամ, Ֆերդինանդ, 1970; Մարմոլ, Բիիրման, 1996): Չնայած մանրեների թիրոզինազայի դերին և մոլեկուլյար հատկություններին նվիրված բազմաթիվ ուսումնասիրություններին, այդ բնագավառում շատ հարցեր մնում են չպարզաբանված:

Հայտնի է, որ թիրոզինազան հանդիսանում է մելանինային պիգմենտների սինթեզի գլխավոր ֆերմանտը (Լյախ, Ռուբան,1972; Ռուբին, Խանդոբինա, 1976; Միշիմա, 1994): Սակայն բացի մելանինի սինթեզից թիրոզինազան ունի նաև մի շարք այլ ֆունկցիաներ: Մասնավորապես ցույց է տրված, որ բարձրակարգ կենդանիների մոտ այն մասնակցում է աղրենալինի և նորայրենալինի միջանկյալ պրոդուկտների սինթեզին (Միրանդա, Ամիքարելի,1993): Պակաս խորությամբ է ուսումնասիրված թիրոզինազայի դերը մանրեների մոտ: Շատ հետազոտողներ գտնում են, որ թիրոզինազան երկրորդային մետաբոլիզմի ֆերմանտ է և նրա դերը հանդիսանում է պիգմենտների սինթեզին մասնակցելը:

Ատենախոսության բերված տվյալները ցույց են տալիս որ *Aspergillus* սնկերի մոտ թիրոզինազայի սինթեզը ուղղակիորեն կապված է սննդամիջավայրում արոմատիկ բնույթի նյութերի, մասնավորապես լիգնինի, առկայությունից: Առաջին անգամ ցույց է տրված, որ ածխաջրերով աղքատ և լիգնին պարունակող սննդամիջավայրում աճելիս, սնկերի թիրոզինազայի սինթեզը խթանվում է մոտ 60-100 անգամ: Մեր ստացած փորձնական տվյալները ցույց են տալիս, որ թիրոզինազայի սինթեզի խթանումը պայմանավորված է արոմատիկ նյութերի կենսատրոհմամբ և որ այս ֆերմանտը որոշակի դեր է կատարում այդ պրոցեսում: Կատարված են նաև աշխատանքներ թիրոզինազայի անջատման, մաքրման և ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների հետազոտման բնագավառում:

15.05.2014

Տպագրված է ՀՀ ԲՈՀ-ի պատվերով

Հանձնված է տպագրության 23.07.99 թ: Պատվեր 111: Տպաքանակ 60:

Տպագրված է «Դավիթ» կոոպերատիվի տպարանում:
Երևան, Տերյան 72:

© National Library of Armenia

© National Library of Armenia