



УДК 577.155.02

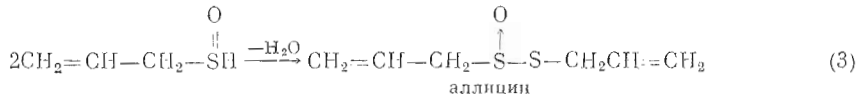
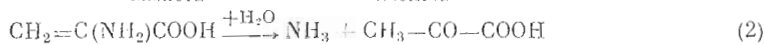
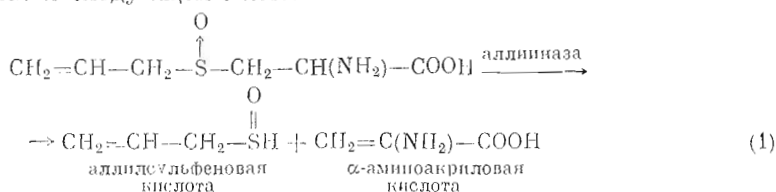
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЛИИНАЗЫ С НЕКОТОРЫМИ ИНГИБИТОРАМИ

Казарян Р. А., Кочергинская С. А., Горяченкова Е. В.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

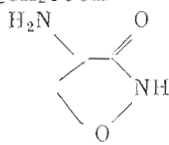

Исследовано влияние различных ингибиторов на активность высокоочищенных препаратов аллииназы чеснока. Установлено, что гидроксилламин и аминоксисульфосная кислота являются высокоактивными, обратимо действующими некокурентными ингибиторами с K_i $3,75 \cdot 10^{-6}$ и $3,75 \cdot 10^{-7}$ М соответственно. Аллииназа ингибируется *L*- и в меньшей степени *D*-циклосерином. Среди аналогов субстрата наиболее сильно подавление активности наблюдается с β -цианоаланином. Показано, что действие этих трех ингибиторов необратимо и протекает с образованием промежуточных фермент-ингибиторных комплексов, аналогичных комплексам Михаэлиса. Для β -цианоаланина, *L*- и *D*-циклосерина определены значения K_i $5,75 \cdot 10^{-2}$, $1,45 \cdot 10^{-4}$ и $2,0 \cdot 10^{-3}$ М соответственно, а также рассчитаны константы скорости превращения промежуточных комплексов в неактивный фермент, равные 0,29; 0,13 и 0,21 мин⁻¹. Из исследованных аминокислот ингибиторами являются субстратные аналоги *L*-цистеин и *D*, *L*-пеницилламин.

Каталитические свойства аллииназы исследовались с целью установить общие закономерности действия пиридоксаль-*P*-зависимых лиаз, катализирующих реакции элиминирования в *L*-цистеине, *L*-серине и их аналогах [1, 2]. Одним из подходов в такого рода исследованиях ферментов, содержащих в качестве кофермента пиридоксаль-*P*, является изучение характера торможения их активности субстратоподобными молекулами, а также различными соединениями, образующими устойчивые комплексы с карбонильной группой кофермента [3]. Аллииназа чеснока, или цистеинсульфоксидлиаза (КФ 4.4.1.4), будучи пиридоксаль-*P*-содержащим ферментом, гидролизует сульфоксиды *S*-алкилпроизводных *L*-цистеина с образованием пировата, аммиака и соответствующих алкилтиосульфенатов [4—7]. Реакция превращения одного из субстратов, аллиина, протекает согласно следующей схеме:



Ранние исследования с малоочищенными препаратами аллииназы чеснока показали, что они проявляют низкую чувствительность к *L*- и

Действие некоторых ингибиторов на активность аллииназы

Ингибитор	Формула	I_{50} , мМ
Гидроксиламин	H_2NOH	0,045
Аминооксиуксусная кислота	H_2NOCH_2COOH	0,0013
Аминооксипропионовая кислота	$H_2NOCH_2CH_2COOH$	0,0025
<i>L</i> -Циклосерин		0,0080
<i>D</i> -Циклосерин		0,080
β -Аминоокси- <i>D,L</i> -аланин	$H_2NOCH_2CHNH_2COOH$	0,034
<i>L</i> -Цистеин	$HS \cdot CH_2CHNH_2 \cdot COOH$	0,82
<i>D</i> -Цистеин	$HS \cdot CH_2CHNH_2 \cdot COOH$	7,0
<i>D,L</i> -Пеницилламин	$HS \cdot C(CH_3)_2CHNH_2COOH$	1,0
<i>D</i> -Пеницилламин	$HS \cdot C(CH_3)_2CHNH_2COOH$	5,0
<i>D,L</i> -Гомоцистеин	$HS \cdot CH_2CH_2CHNH_2COOH$	6,0
Цистеамин	$HS \cdot CH_2CH_2NH_2$	8,1
β -Циапо- <i>L</i> -аланин	$NC \cdot CH_2CHNH_2COOH$	0,6
<i>S</i> -Метил- <i>L</i> -цистеин	$CH_3 \cdot S \cdot CH_2 \cdot CHNH_2COOH$	25,0
<i>S</i> -Бензил- <i>L</i> -цистеин		10,0
<i>S</i> -Аллил- <i>L</i> -цистеин	$CH_2=CH-CH_2S \cdot CH_2CHNH_2COOH$	20,0

D-циклосерину и к аминоктиолам [1, 2]. Природа действия этих ингибиторов на аллииназу нуждалась в дальнейшем исследовании с использованием очищенных препаратов фермента и чистых препаратов ингибиторов, в том числе энантиомерных форм циклосерина.

В данной работе применяли препараты аллииназы чеснока высокой очистки, полученные по методу, разработанному в лаборатории [8]. В качестве ингибиторов использовали гидроксиламин и некоторые его *O*-замещенные производные, имеющие ациклическую структуру (аминооксиуксусную и аминооксипропионовую кислоты и др.), а также энантиомеры циклосерина. Помимо этого было изучено торможение аллииназы 1,2- и 1,3-аминоктиолами, особенно субстратоподобными (цистеин, гомоцистеин, пеницилламин), соединениями, родственными субстрату (β -циапоаланин, *S*-метил-, *S*-бензил- и *S*-аллилцистеин), и веществами, блокирующими *HS*-группы ферментов.

Как видно из табл. 1, аллииназа ингибируется гидроксиламином. Аминооксиуксусная и аминооксипропионовая кислоты, являющиеся *O*-замещенными субстратоподобными аналогами гидроксиламина, оказывают намного более интенсивное ингибирующее действие. Следовательно, введение в молекулу реагента карбоксильной группы значительно усиливает ингибирующее действие его на аллииназу, как и на другие пиридоксаль-*P*-содержащие ферменты [9, 10].

Из полученных данных (табл. 1) следует, что аллииназа высокочувствительна к *L*-циклосерину; *D*-циклосерин также тормозит аллииназу, однако средство фермента к *D*-изомеру примерно в 10 раз меньше, чем к *L*-циклосерину. Отношение различных подгрупп пиридоксаль-*P*-зависимых лиаз к действию циклосерина неодинаково. Так, лиазы, избирательно катализирующие реакции β -замещения (серинсульфгидраза, β -циапоаланинсинтаза и др.), проявляют полную устойчивость к обоим энантиомерам циклосерина [11, 12]. В то же время γ -цистаминаза, относящаяся к подгруппе элиминирующих (или, точнее, полифункциональных) лиаз, ингибируется *L*- и в меньшей степени *D*-циклосерином [12].

Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что ингибирование аллииназы *L*- и *D*-циклосерином зависит от продолжительности преинкубации; полное инактивирование фермента достигается при 23° С после 20-минутной преинкубации. В тех же условиях тормозящее действие гидроксилamina и аминоксуксусной кислоты не зависит от времени. Установлено, что ингибирование аллииназы, γ -цистатионазы и сериндезаминазы *D*, *L*- и *D*-циклосерином практически не зависит от pH среды [13].

Продукт дециклизации циклосерина — β -аминоксид-*D*, *L*-аланин, представляющий собой *O*-замещенное производное гидроксилamina, обладает по отношению к аллииназе сильным тормозящим действием, которое на 1,5–2 порядка ниже по сравнению с ингибированием другими карбонильными реагентами, а также *L*-циклосерином (табл. 1).

При исследовании влияния на аллииназу 1,2- и 1,3-аминотиолов найдено, что относительно высоким ингибирующим действием обладают *L*-цистеин и *D*, *L*-пеницилламин (табл. 1). Ингибирующее действие *D*-цистеина, *D*-пеницилламина, *D*, *L*-гомоцистеина и цистеина выражено значительно слабее. Действие 1,2-аминотиолов на активность некоторых пиридоксаль-*P*-зависимых лиаз связано с их взаимодействием с формильной группой кофермента, приводящим к образованию неактивных гетероциклических соединений — тиазолидинов. Последние легко диссоциируют на апофермент и тиазолидиновое производное кофермента. В противоположность аллииназе и другим элиминирующим ферментам лиазы, катализирующие реакции превращения *L*-цистеина и *L*-серина по типу β -замещения (серинсульфгидраза, β -цианоаланинсинтаза и др.), проявляют, как известно, полную нечувствительность к аминотиолам [11, 12].

Аллииназа чеснока помимо аллиина использует в качестве субстратов также сульфоксиды некоторых других *S*-алкилзамещенных производных *L*-цистеина (метил-, этил-, пропил- и бутил), но с наибольшей скоростью фермент расщепляет *S*-аллил-*L*-цистеинсульфоксид. Аллииназа не действует на *S*-алкилпроизводные *L*-цистеина, не содержащие окисленной серы. Последние для аллииназы чеснока и лука являются обратимо действующими ингибиторами [7, 14].

По данным Пфесффер и Ресслер [15], активность некоторых элиминирующих лиаз (в частности, γ -цистатионазы) в сильной степени нарушается в присутствии аналога *L*-цистеина — β -циано-*L*-аланина. В данной работе в качестве ингибиторов использовали следующие аналоги субстрата: β -циано-*L*-аланин, а также *S*-метил-, *S*-аллил- и *S*-бензил-*L*-цистеин. Среди этих соединений наибольшим тормозящим действием на фермент обладал β -циано-*L*-аланин (табл. 1). Степень ингибирования активности аллииназы β -циано-*L*-аланином подобно действию циклосерина возрастала с продолжительностью преинкубации фермента с ингибитором. Полная инактивация фермента в условиях проведения опыта достигалась при 23° С после инкубации в течение 25–30 мин (рис. 1). Другие *S*-алкилзамещенные производные цистеина в тех же условиях ингибируют аллииназу в меньшей степени.

Аллииназа чеснока подобно другим *S*-алкилцистеинлиазам почти нечувствительна к реагентам, блокирующим HS-группы ферментов: *n*-хлор-

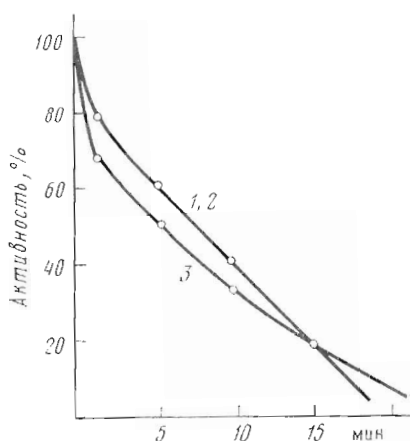


Рис. 1. Кинетика необратимого ингибирования аллииназы в присутствии 10^{-4} М *L*-циклосерина (1), 10^{-3} М *D*-циклосерина (2) и $2 \cdot 10^{-3}$ М β -цианоаланина (3). Концентрация фермента $7,7 \cdot 10^{-7}$ М, 23° С

Таблица 2

Влияние гель-фильтрации и добавления кофермента на активность аллииназы, обработанной ингибиторами

Ингибитор	Белковая фракция элюата	
	без пиридоксаль- <i>P</i>	с пиридоксаль- <i>P</i> (25 мкг)
Гидроксиламин	70	86
β -Цианоаланин	0	0
<i>L</i> -Циклосерин	0	49
<i>D</i> -Циклосерин	0	52

меркурибензоату, *N*-этилмалеимиду, иодуксусной кислоте и реактиву Элмана (5,5-дитио-бис-2-нитробензойная кислота). Эти данные позволяют предполагать отсутствие у аллииназы функционально важных HS-групп.

Полученные результаты дают возможность выяснить, является ли торможение аллииназы гидроксиламином, β -циано-*L*-аланином и энантиомерными формами циклосерина обратимым. При гель-фильтрации неактивных комплексов аллииназы с гидроксиламином через колонку с сефадексом G-25 в белковых фракциях элюата обнаруживали до 70–80% первоначальной активности фермента, которая несколько повышалась (до 90%) после добавления пиридоксаль-*P* (табл. 2). Это свидетельствует об обратимом характере ингибирования аллииназы гидроксиламином. Из данных табл. 2 видно, что в тех же условиях подавление активности аллииназы β -циано-*L*-аланином протекает необратимо, поскольку после гель-фильтрации активность в белковых фракциях элюата отсутствовала как до, так и после добавления пиридоксаль-*P*; иначе говоря, элюаты не содержали нативного апофермента.

В противоположность этому при гель-фильтрации аллииназы, ингибированной *L*- и *D*-циклосерином, в элюатах находили нативный апофермент. При добавлении пиридоксаль-*P* к белковой фракции элюата активность в опытах с обоими энантиомерами циклосерина восстанавливалась до 50% от исходной (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии у аллииназы при взаимодействии с *L*- и *D*-циклосерином и последующей гель-фильтрации, диссоциации ингибитора с освобождением активного холофермента, т. е. об отсутствии гомодромно обратимого ингибирования фермента тем и другим энантиомером циклосерина [12]. Аналогичные результаты были получены в лаборатории при исследовании действия энантиомеров циклосерина на другие элиминирующие лиазы — γ -цистатиназу и сериндезаминазу [12].

В отношении ингибирования циклосерином исследуемые нами элиминирующие лиазы существенно отличаются от трансаминаз, для которых *L*-циклосерин является необратимо действующим ингибитором, образующим с ферментом прочную ковалентную связь. На Asp-трансaminaзу *D*-циклосерин тормозящего действия не оказывает [16].

На рис. 2 представлены данные по исследованию влияния на кинетику действия аллииназы гидроксиламина и аминоксуксусной кислоты. Анализ полученных графиков свидетельствует о том, что оба соединения (в условиях эксперимента) служат неконкурентными ингибиторами.

При построении вторичных графиков зависимости V_1^{-1} [I] (рис. 3) определены значения K_i для гидроксиламина ($3,75 \cdot 10^{-6}$ М) и для аминоксуксусной кислоты ($3,75 \cdot 10^{-7}$ М).

Было установлено, что инактивация аллииназы β -цианоаланином, так же как и *L*- и *D*-циклосерином (см. выше), развивается во времени и носит необратимый характер. Прямые линии на полудолгарифмическом гра-

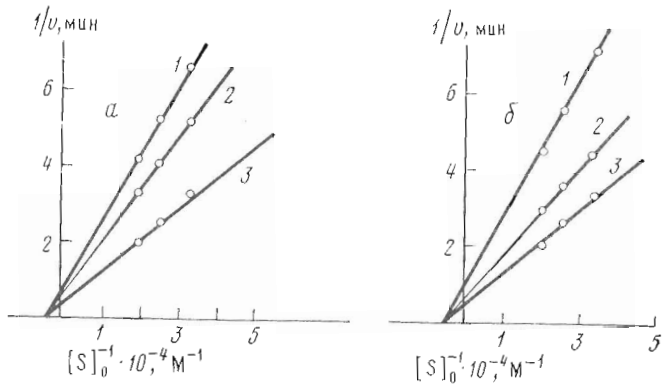


Рис. 2. Ингибирование гидроксиламином (а) и аминоксуксусной кислотой (б) реакции превращения аллиина, катализируемой аллииназой. Концентрации гидроксиламина 10^{-5} М (1), $5 \cdot 10^{-6}$ (2), $2,5 \cdot 10^{-6}$ М (3); аминоксуксусной кислоты 10^{-6} (1), $5 \cdot 10^{-7}$ (2), $2,5 \cdot 10^{-7}$ М (3)

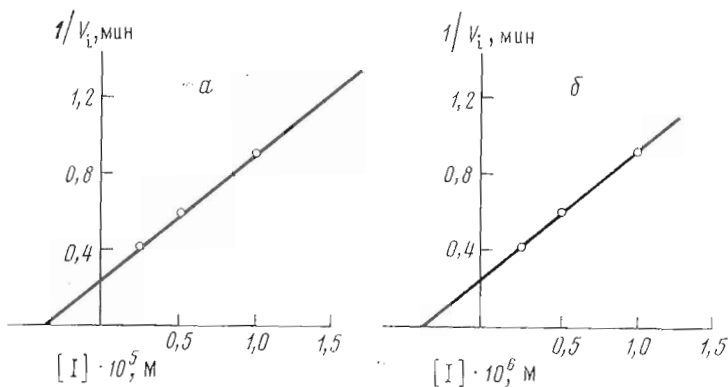


Рис. 3. Определение константы неконкурентного ингибирования превращения аллиина, катализируемого аллииназой, гидроксиламином (а) и аминоксуксусной кислотой (б)

фике зависимости степени ингибирования фермента от времени его преинкубации с различными концентрациями ингибиторов (рис. 4) позволяют вычислить значения кажущихся констант скорости по формуле $k_{\text{ка.к}} = 0,692/t_{1/2}$.

Как видно из рис. 5, графики зависимости двойных обратных величин представляют собой прямые линии, отсекающие на оси ординат положительные отрезки. Это свидетельствует об образовании в реакциях обратимых фермент-ингибиторных комплексов, превращающихся в каталитически неактивную форму фермента. Полученные данные позволяют вычислить константу диссоциации промежуточного фермент-ингибиторного комплекса (K_i) и константу скорости превращения этого комплекса в неактивный фермент (k_2) по методу Китца — Вильсона [17].

Сопоставление полученных данных (табл. 3) свидетельствует о наибольшем сродстве к аллииназе *L*-циклосерина по сравнению с *D*-циклосерином и β -дианоаланином. В то же время скорости превращения промежуточных фермент-ингибиторных комплексов в неактивную форму фермента у трех ингибиторов близки.

Таблица 3
Кинетические параметры необратимого ингибирования аллииназы

Соединение	$K_i \cdot 10^4, M$	$k_2, \text{мин}^{-1}$
β -Цианоаланин	16	0,29
<i>L</i> -Циклосерин	0,7	0,13
<i>D</i> -Циклосерин	5	0,21

Полученные результаты говорят о том, что аллииназа чеснока обладает высокой чувствительностью к действию *L*- и *D*-циклосерина и 1,2- и 1,3-аминотиолов подобно другим элиминирующим лиазам. Как указывалось, характерной особенностью β -замещающих лиаз является полная устойчивость к торможению этими ингибиторами. Наблюдаемые различия между пиридоксаль-*P*-зависимыми лиазами по отношению к таким специфическим ингибиторам, по-видимому, связаны с различиями в их механизме действия и в пространственной конформации фермент-субстратных комплексов в активных центрах лиаз, катализирующих реакции α, β - и β, γ -элиминирования, с одной стороны, и β -замещения — с другой [1, 2].

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты *L*- и *D*-цистеина, *D, L*-гомоцистеина, *D, L*- и *D*-пенициллина (Reanal, ВНР); *D*-циклосерин, пиридоксаль-5'-фосфат, пиридоксамин-5'-фосфат, пиридоксамин·HCl, β -циано-*L*-аланин, *N*-этилмалеимид и реактив Эллмана (Sigma, США). Хлориды аминокислот и аминоксипропионовой кислот, полученные методом синтеза *O*-замещенных гидроксиламинов, любезно предоставлены нам Р. М. Хомутовым.

Препарат β -аминокси-*D, L*-аланина получали путем дециклизации *D, L*-циклосерина при pH 5 с последующей очисткой хроматографией на бумаге.

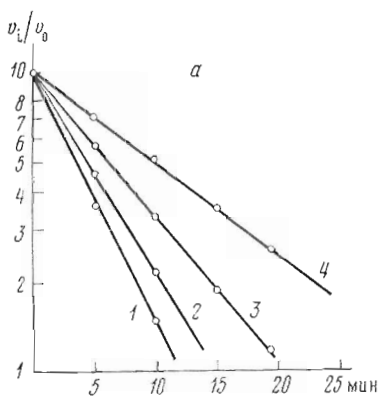
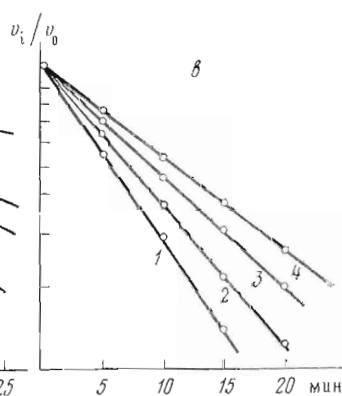
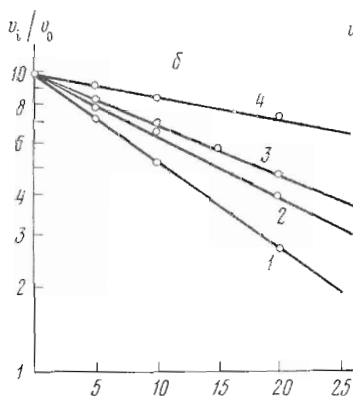


Рис. 4. Кинетика ингибирования аллииназы в присутствии β -цианоаланина (а): $4 \cdot 10^{-3}$ (1), $2 \cdot 10^{-3}$ (2), 10^{-3} (3), $5 \cdot 10^{-4}$ М (4); *L*-циклосерина (б): 10^{-4} (1), $5 \cdot 10^{-5}$ (2), $3,5 \cdot 10^{-5}$ (3), $2,5 \cdot 10^{-5}$ М (4) и *D*-циклосерина (в): 10^{-3} (1), $5 \cdot 10^{-4}$ (2), $3,5 \cdot 10^{-4}$ (3), $2,5 \cdot 10^{-4}$ М (4) в полупологарифмических координатах



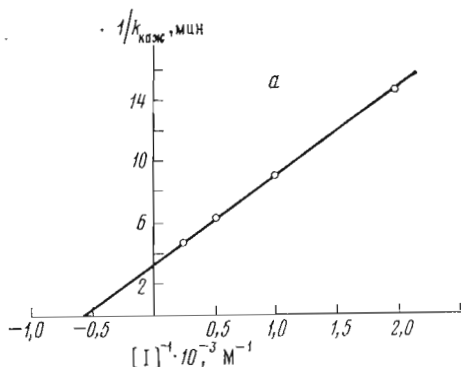
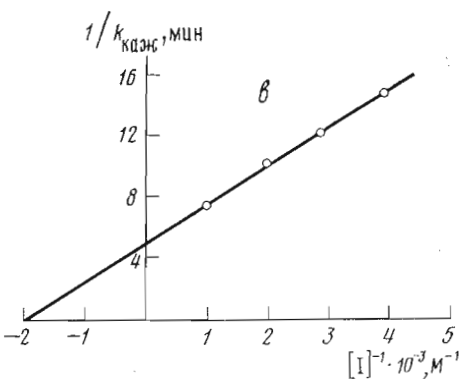
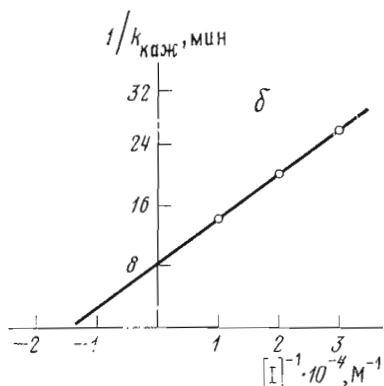


Рис. 5. Зависимость $k_{кат}$ от концентрации леобратимого ингибитора для реакции взаимодействия аллииназы с β -цианоаланином (а), *L*-цикloserином (б) и *D*-цикloserином (в)



Аллиин — (+)S-аллилцистеинсульфоксид выделяли из луковиц чеснока по методу [4], модифицированному нами [10].

Препарат *L*-цикloserина получали из раствора *D,L*-цикloserина путем осаждения *D*-цикloserин-*D*-тарtrate в присутствии *D*-винной кислоты [18]. С этой целью к раствору 15,6 г (104 ммоль) *D*-винной кислоты в 40 мл H_2O , охлажденному до $5^\circ C$, быстро добавляли 10 г (98 ммоль) предварительно очищенного *D,L*-цикloserина. Образовавшийся осадок отфильтровывали. Фильтрат, содержащий *D*-тарtrate *L*-цикloserина, разлагали на колонке с дауэксом 50 в H^+ -форме. После тщательного отмывания смолы от винной кислоты водой и этанолом *L*-цикloserин элюировали с колонки, пропуская 10% раствор аммиака в абсолютном этаноле. Собирали фракции, дающие синее окрашивание с 1% раствором нитропруссид натрия в уксусной кислоте (реактив Джонса, дающий специфическую реакцию с цикloserином). При сгущении объединенных фракций выпадал осадок *L*-цикloserина.

Очистка *L*- и *D*-цикloserина. Цикloserин (1 г) растворяли в 30 мл охлажденного до $5^\circ C$ 10% раствора аммиака в абсолютном этаноле. Осадок отфильтровывали, а раствор сгущали под вакуумом до полного удаления аммиака. Выпавший при этом осадок отфильтровывали и промывали абсолютным этанолом. Эту операцию повторяли дважды. Осадок сушили над $CaCl_2$. Чистоту полученных препаратов цикloserина проверяли хроматографией на бумаге в системе метилэтилкетон — пропионовая кислота — H_2O (15:5:6) с последующим окрашиванием хроматограмм 0,5% раствором нингидрина в ацетоне.

Об отсутствии производных гидросиламина в исследуемых препаратах цикloserина судили по влиянию их на активность серинсульфгидразы. Известно, что этот фермент высокочувствителен к гидросиламину и его *O*-алкилпроизводным ($10^{-5} M$) и резистентен к высоким концентрациям цикloserина [2].

Отсутствие *L*-изомера в препаратах *D*-циклосерина определяли по их влиянию на активность Asp-трансаминазы [17]. Поскольку используемый после предварительной очистки препарат *D*-циклосерина в концентрации 10^{-1} М не ингибирует активность Asp-трансаминазы, в нем, очевидно, не содержится *L*-циклосерин.

Высокоочищенные препараты аллииназы получали из луковиц чеснока по разработанному нами методу [8]. В исследованиях использовали препараты фермента с уд. акт. 110–120 ед. акт./мг (см. ниже). Наличие в растворах аллииназы свободного пиридоксаль-*P* (10^{-5} М), добавляемого для стабилизации активности, существенно снижало степень ингибирования фермента гидроксиламином и его производными. Учитывая это, фермент перед использованием подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-25. Удельная активность аллииназы в элюате составляла 70–80% от исходной.

Определение активности фермента. Активность аллииназы определяли, как описано ранее [8], путем измерения скоростей образования одного из конечных продуктов реакции — пировиноградной кислоты. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое образует 1 мкмоль продукта за 1 мин в условиях измерения активности. Удельную активность выражали в единицах активности на 1 мг белка. Образующийся в реакции пируват определяли колориметрическим методом с 2,4-динитрофенилгидразином.

Пробы объемом 1 мл содержали 2,1 мкмоль аллиина, 0,1 мкмоль пиридоксаль-*P*, 100 мкмоль Na-фосфатного буфера (рН 6,5) и 0,2–0,3 ед. акт. фермента. Инкубацию проводили при 23°С в течение 2 мин. Белки осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 5%) и отделяли центрифугированием. В аликвотах безбелковой части определяли пировиноградную кислоту в виде ее динитрофенилгидразона, количество которого измеряли спектрофотометрически при 520 нм [8].

Определение степени ингибирования. Сравнительную характеристику тормозящего действия исследуемых соединений выражали величиной I_{50} . Для определения I_{50} использовали один и тот же препарат фермента и одинаковые условия опыта — преинкубацию с различными концентрациями ингибитора (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-2}$ М) при 23°С в течение 30 мин с последующим добавлением субстрата и определением активности, как указано выше. Из данных этих опытов рассчитывали для разных концентраций ингибитора степень торможения активности и путем графической экстраполяции устанавливали молярную концентрацию ингибитора, вызывающую уменьшение активности фермента на 50%, т. е. I_{50} .

Для отделения избытка ингибитора при ингибировании аллииназы гидроксиламином, циклосерином и β -цианоаланином использовали колонку с сефадексом G-25, предварительно уравновешенную 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 7,5, содержащим для стабилизации 10% глицерина и 10 мкмоль дитиотреита. В элюатах определяли активность фермента без пиридоксаль-*P* и в его присутствии.

При ингибировании аллииназы гидроксиламином и аминоксиуксусной кислотой значение K_i определяли методом двойных обратных величин. Поскольку торможение аллииназы β -цианоаланином, *L*- и *D*-циклосерином носит необратимый (в условиях эксперимента) характер, для определения K_i и k_2 фермент (0,2–0,3 ед. акт.) инкубировали при рН 6,5 в 0,1 М Na-фосфатном буфере с тремя различными концентрациями ингибиторов и через определенные промежутки времени определяли активность. Полученные данные обрабатывали по методу Китца и Вильсона [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E. (1972) in: Enzymes: Structure and Function, FEBS Symposium No 29 (J. Drenth et al., eds), pp. 135–150, North – Holland, Amsterdam.
2. Браунштейн А. Е. (1974) Изв. АН СССР. Сер. биол., № 5, 629–642.

3. Braunstein A. E. (1960) in: *Enzymes* (P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, eds), 2-nd ed., vol. 2, pp. 113-184, Acad. Press, N. Y.
4. Stoll A., Seebeck E. (1951) *Adv. Enzymol.*, **11**, 377-400.
5. Горяченкова Е. В. (1952) Докл. АН СССР, **87**, 457-460.
6. Schwimmer S., Carlson J. F., Mazelis M., Wong F. F. (1960) *Experientia*, **16**, 449-450.
7. Mazelis M., Crews L. (1968) *Biochem. J.*, **108**, 725-730.
8. Казарян Р. А., Горяченкова Е. В. (1978) *Биохимия*, **43**, 1905-1913.
9. Толоса Э. А., Горяченкова Е. В., Хомутов Р. М., Северин Е. С. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 769-777.
10. Сащенко Л. П., Северин Е. С., Хомутов Р. М. (1968) *Биохимия*, **33**, 142-147.
11. Braunstein A. E., Goryachenkova E. V. (1976) *Biochimie*, **58**, 5-17.
12. Браунштейн А. Е., Горяченкова Е. В., Казарян Р. А., Полякова Л. А., Толоса Э. А. (1978) в сб.: *Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии*, с. 183-202, «Наука», М.
13. Толоса Э. А., Рабинков А. Г., Казарян Р. А., Полякова Л. А., Бреусов Ю. Н., Горяченкова Е. В. (1976) Тез. III Всес. симпозиума «Структура и функции активных центров ферментов», с. 56, «Наука», М.
14. Schwimmer S., Ryan C. A., Wong F. F. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 777-782.
15. Pfeffer M., Ressler C. (1967) *Biochem. and Pharmacol.*, **16**, 2299-2309.
16. Хомутов Р. М., Карпейский М. Я., Северин Е. С. (1961) *Биохимия*, **26**, 772-781.
17. Kitz R., Wilson J. B. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 3245-3249.
18. Stammer C. H., Wilson A. N., Holly F. W., Folkers K. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 2346-2347.

Поступила в редакцию
15.V.1979.

ALLIINASE INTERACTION WITH INHIBITORS

KAZARYAN R. A., KOCHERGINSKAYA S. A., GORYACHENKOVA E. V.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The effect of various inhibitors on the activity and some spectral properties of highly purified garlic alliinase was studied. The enzymatic activity was determined by measuring the pyruvate formation. Hydroxylamine and its O-substituted derivatives were found to be reversible inhibitors of the enzyme. Alliinase was also inhibited by D- and L-cycloserine, the L-form being more effective. In the course of gel-filtration of the cycloserine-inhibited enzyme, the separation of the active apoenzyme from the coenzyme-inhibitor complex was observed. Among the substrate analogs tested, β -cyano-L-alanine proved the most effective, specific and irreversible inhibitor. Alliinase can be inhibited by aminothiols but exhibits low sensitivity towards thiol reagents.