

Химия

УДК 547.294.31.10.1

А. М. ОГАНЕСЯН

ВЛИЯНИЕ (S)- β -(N-БЕНЗИЛАМИНО)АЛАНИНА НА АМИНО-
ТРАНСФЕРАЗУ АМИНОКИСЛОТ С РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПЬЮ
BREVIBACTERIUM FLAVUM И АРОМАТИЧЕСКУЮ АМИНОТРАНС-
ФЕРАЗУ *CITROBACTER FREUNDII*

Исследовалось влияние небелковых аминокислот на активность аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью *B. flavum* и ароматическую трансaminaзу *C. freundii*. В работе показано, что (S)- β -(N-бензиламино)аланин ингибирует оба фермента. В первом случае значение IC50=1,35 мМ, во втором – 3,8 мМ. Выявлен механизм ингибирования исследуемых ферментов (S)- β -(N-бензиламино)аланином: аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью ингибируется по механизму смешанного типа, а ароматическая трансaminaза – конкурентного типа. Изучение механизмов ингибирования имеет важное значение при использовании аминотрансфераз для повышения продукции аминокислот.

Введение. Реакции, катализируемые аминотрансферазами (АТ), занимают ключевые позиции в биосинтезе различных аминокислот у многих микроорганизмов. Особое внимание уделяется исследованиям ферментов коринебактерий, продуцирующих глутамат, на основе которых сконструированы штаммы-продуценты, широко используемые в производстве L-аминокислот.

АТ аминокислот с разветвленной цепью участвуют в биосинтезе гидрофобных аминокислот (лейцина, изолейцина и валина). АТ, катализирующие реакции между аспаратом и глутаминовой кислотой у *Brevibacterium flavum*, играют важную роль как в биосинтезе аспартата, так и в использовании глутамата в качестве источника углерода и азота [1]. Менее изучены АТ, взаимодействующие с L-аланином. Реакция трансформации пирувата в аланин осуществляется ферментами AlaT и AvtA, при этом реакция с участием AlaT глутамат-зависима, в то время как реакция, катализируемая AvtA, L-валин-зависима [2]. Трансaminaза В (PivE) является единственным ферментом *Corynebacterium glutamicum*, участвующим на стадии трансaminирования биосинтеза трех аминокислот с разветвленной цепью. Показано, что повышение активности этого фермента приводит к суперпродукции валина у *C. glutamicum* [3, 4].

Недавно на основе анализа последовательности генома *C. glutamicum* произведен функциональный анализ всех белков, относящихся к АТ. Среди

выявленных 20-и предполагаемых АТ наиболее явными пиродоксаль-5'-фосфат-зависимыми ферментами оказались AlaT, AvtA, (PivE) и AroT. Ароматическая АТ вместе с AroT и PivE участвуют в биосинтезе фенилаланина [5]. Ароматические трансферазы, выделенные из *C. glutamicum* и *B. flavum*, обладают способностью трансформировать префенат, фенилпируват и 4-гидроксифенилпируват – промежуточные соединения биосинтеза соответствующих ароматических аминокислот.

Трансаминирование фенилпирувата является одним из удачных способов получения L-фенилаланина. Реакция может осуществляться как в живых микроорганизмах, так и в иммобилизованных клетках и ферментах. Известен способ превращения фенилпирувата в L-фенилаланин с применением таких микроорганизмов, как *Citrobacter freundii* [6]. Конструирование продуцентов аминокислот основано на усилении потока промежуточных соединений в сторону биосинтеза целевой аминокислоты. Такое усиление достигается введением в исходные штаммы регуляторных мутаций, мутаций, приводящих к ауксотрофности, а также повышением уровня экспрессии генов ключевых ферментов биосинтеза с помощью генных технологий. В получении регуляторных мутантов важную роль играют аналоги аминокислот. Исследование действия небелковых аминокислот и пептидов на их основе на активность АТ ароматических аминокислот и аминокислот с разветвленной цепью прежде всего позволяет выявить механизм действия этих ферментов. В случае аминокислот *C. glutamicum* и *B. flavum* такие исследования имеют важное значение как для получения суперпродуцентов вышеуказанных аминокислот, так и эффективных штаммов для биотрансформации. В настоящей работе представлены данные по исследованию действия небелковых аминокислот на аминокислотные трансферазы. Впервые показано ингибирование обоих исследуемых трансфераз (S)-β-(N-бензиламино)аланином и выявлены механизмы ингибирования.

Материалы и методы.

Небелковые аминокислоты синтезированы сотрудниками НИИ “Биотехнология” и химического факультета ЕГУ: β-имидазол-ил-(R)-аланин, β-имидазол-ил-(S)-аланин, α-метил-(R)-фенилаланин, α-метил-(S)-фенилаланин, (R)-аллилглицин, (S)-аллилглицин, (S)-α-аллилаланин, (R)-α-аллилаланин, β-(R)-изовалин, β-(S)-изовалин, p-фтор-(R)-фенилаланин, p-фтор-(S)-фенилаланин, (R)-гидроксивалин, (S)-гидроксивалин, (2R,3S)-β-гидроксильцин, (2S,3R)-β-гидроксильцин, (S)-O-метилсерин, (R)-O-метилсерин, транс-(S)-3-метилпролин, алло-O-метилтреонин, алло-O-этилтреонин, (S)-β-(N-бензиламино)аланин, (S)-β-(S-тиоэтанол)аланин, (S)-O-бензил-α-тирозин, (S)-O-бензил-α-метилтирозин, (S)-(N,N'-диметиламино)аланин, (S)-β-(N-этанол-амино)аланин, (S)-β-(N-метиламино) аланин, β-(N,N-диэтанол-амино)аланин.

Штаммы *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 (дикий тип) и *Citrobacter freundii* 62 взяты из коллекции культур НИИ “Биотехнология”. Штамм *Citrobacter freundii* 62 выращивали на среде следующего состава: 1 % пептона, 1% дрожжевого экстракта, 0,5% K₂HPO₄, 0,001% FeSO₄, 0,05% MgSO₄, 0,01% пиридоксина, pH 7,3. Штамм *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 выращивали на среде следующего состава: 10% глюкозы, 2% (NH₄)₂SO₄, 0,1% K₂HPO₄, 0,03% MgSO₄, 2% CaCO₃, pH 7,0. CaCO₃ осаждали центрифугированием при 500–1000 об/мин.

Активность аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью определяли в клеточных экстрактах *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, полученных путем разрушения клеток ультразвуком (Ultrasonic Processor, "Cole-Parmer") [7]. Культуру высевали в 5 мл среды, инкубировали на качалке 18 ч при 30⁰С, затем переносили в 50 мл той же среды и инкубировали 18 ч в тех же условиях. Выросшую культуру осаждали при комнатной температуре при 5000 g. Клетки суспендировали в 1 мл буфера, содержащего 100 мМ трис-НСl (рН 8,3), 0,2 мМ фенолметилсульфонил фторида (PMSF), 0,05 мМ пиридоксаль фосфата, 5 мМ меркаптоэтанол, 1 мМ ЭДТА. Разрушение клеток ультразвуком проводили в следующем режиме: 200 Вт, 30 с, 40 раз. Клеточные осколки (дебрис) осаждали при 10 000 об/мин на центрифуге фирмы "Эппендорф".

Определение активности аминотрансферазы с разветвленной цепью проводили в 0,4 мл реакционной смеси следующего состава: 50 мМ HEPES (рН 7,6), 50 мМ L-валина, 5 мМ 2-кетоглутарата и 0,1 мМ пиридоксаль-5'-фосфата. Реакцию проводили при температуре 30⁰С. Образовавшуюся в ходе реакции L-глутаминовую кислоту определяли при помощи сопряженной реакции восстановления НАД в трис-гидразиновом буфере (рН 8,9), катализируемой глутаматдегидрогеназой.

Активность ароматической аминотрансферазы *Citrobacter freundii* 62 определяли модифицированным методом [8]. Культуру выращивали на вышеуказанной среде. Обработку клеток ультразвуком проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 8,3), 0,2 мМ PMSF, 0,05 мМ пиридоксаль фосфата, 1 мМ ЭДТА.

Определение активности ароматической трансферазы проводили в 0,4 мл реакционной смеси следующего состава: 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 50 мМ L-фенилаланина, 5 мМ 2-кетоглутарата и 0,1 мМ пиридоксаль-5'-фосфата. Реакцию проводили при 30⁰С. Образовавшуюся в ходе реакции фенилпировиноградную кислоту определяли в щелочных условиях фотометрически ($\epsilon_{320} = 17600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Результаты и обсуждение. Для выявления ингибирующего действия исследуемых небелковых аминокислот на активность аминотрансфераз реакции трансаминирования проводили в реакционной среде, содержащей 5 мМ тестируемых соединений. Из всех исследованных соединений ингибирующим воздействием обладали (S)- β -(N-бензиламино)аланин и (S)- β -(N-метиламино)аланин (см. таблицу).

Ингибирование аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью Brevibacterium flavum ATCC 14067 и ароматической трансферазы Citrobacter freundii 62

Небелковая аминокислота	Фермент	Ингибирование, %	IC50, мМ
(S)- β -(N-бензиламино)аланин	аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью	69,2	1,35
(S)- β -(N-бензиламино)аланин	аминотрансфераза ароматических аминокислот	59,4	3,80
L- β -(метиламино)аланин	аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью	57,0	>5

Для измерения IC50 активность фермента определялась в присутствии различных концентраций ингибитора. Результаты приведены на рис. 1.

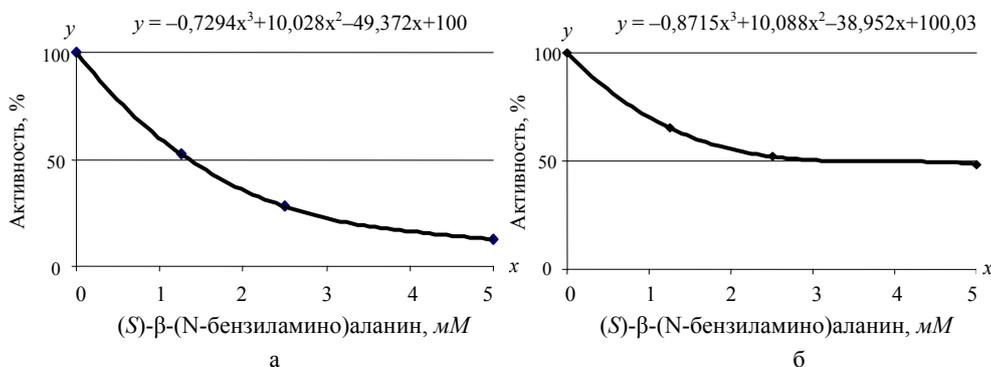


Рис. 1. Ингибирование аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью из *B. flavum* (а) и ароматической трансферазы *C. freundii* (б) (S)-β-(N-бензиламино)аланином.

Как видно из графиков, ингибирование аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью (S)-β-(N-бензиламино)аланином сильнее (IC50 = 1,35 мМ) ингибирования тем же соединением аминотрансферазы ароматических аминокислот (IC50 = 3,8 мМ).

Механизм ингибирования аминотрансфераз бензиламиноаланином. Для выявления механизма ингибирования аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью активность фермента измеряли в диапазоне концентраций аминокислоты-субстрата [S]=1–10 мМ и ингибитора [I]=0–0,5 мМ. В случае аминотрансферазы ароматических аминокислот измерения активности проводили в диапазоне концентраций аминокислоты-субстрата 1–10 мМ и ингибитора 0–5 мМ.

Кинетику ингибирования определяли графически по профилю зависимостей $1/V-[I]$ и $[S]/V-[I]$, а также расчетным способом по специально разработанной программе. Значение константы ингибирования (K_i) и ее стандартную ошибку, а также значения K_M и V_{\max} и их стандартные ошибки рассчитывали методом многомерной линейной регрессии по модифицированной методике [9]. Экспериментальная серия содержала 16 независимых измерений. Результаты представлены на рис. 2.

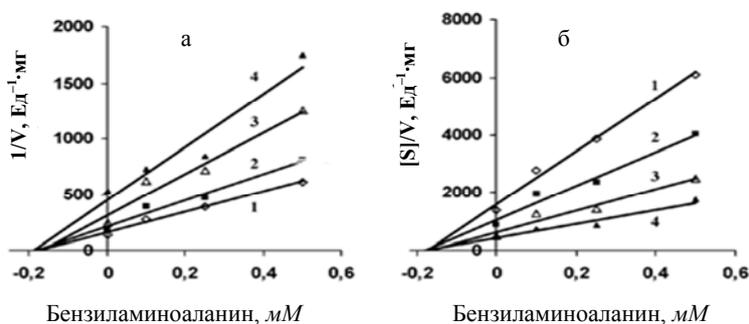


Рис. 2. Кинетика ингибирования аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью *B. flavum* (S)-β-(N-бензиламино)аланином. Зависимости $1/V$ (а) и $[S]/V$ (б) от концентрации ингибитора. Концентрации L-валина: 1 – 10; 2 – 5; 3 – 2; 4 – 1 мМ.

Из рис. 2 следует, что (*S*)-β-(*N*-бензиламино)аланин ингибирует аминокотрансферазу аминокислот с разветвленной цепью *B. flavum* по механизму смешанного типа с $K_M=2,78\pm 0,58$ (мМ) (субстрат – L-валин) и константами ингибирования $K_1=0,23\pm 0,14$ (мМ); $K_2=0,11\pm 0,022$ (мМ).

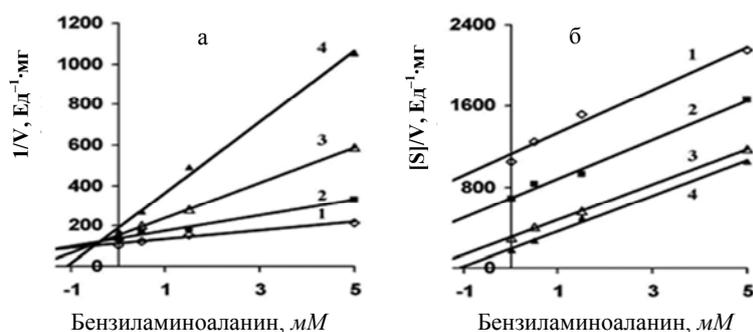


Рис. 3. Кинетика ингибирования ароматической аминокотрансферазы *C. freundii* (*S*)-β-(*N*-бензиламино)аланином. Зависимости 1/*V* (а) и [*S*]/*V* (б) от концентрации ингибитора. Концентрации L-фенилаланина: 1 – 10; 2 – 5; 3 – 2; 4 – 1 мМ.

Из рис. 3 следует, что (*S*)-β-(*N*-бензиламино)аланин ингибирует ароматическую аминокотрансферазу *C. freundii* по механизму конкурентного типа с $K_M=0,65 \pm 0,13$ (мМ) (субстрат – L-фенилаланин) и константой ингибирования $K=0,34 \pm 0,071$ (мМ).

Пиридоксаль-зависимые АТ аминокислот катализируют обратимую реакцию трансаминирования, в которой происходит перенос альфа-аминогруппы с аминокислоты на 2-кетокислоту с образованием кетокислоты и аминокислоты по механизму “би-би пинг-понг” [9]. Поэтому аминокотрансферазы должны узнавать и связывать две аминокислоты, содержащие боковые цепи и отличающиеся по форме и свойствам от многих других небольших молекул. Механизм двойственного узнавания субстрата выявлен на основе трехмерных структур ароматических аминокислот – гистидинолфосфата, глутаминфенилпирувата, ацетилорнитина – и аминокотрансфераз аминокислот с разветвленной боковой цепью. Представлены две стратегии двойственного субстрат-узнавания [10]. Сайты связывания у ароматических трансфераз представлены предпочительно заряженными и нейтральными карманами для бензиламино-аланин-кислых и ароматических боковых цепей соответственно. При этом происходит значительное перераспределение сети водородных связей. У аминокотрансфераз аминокислот с разветвленной цепью гидрофобная полость с внедренными гидрофильными сайтами приспособлена и для кислых, и для гидрофобных боковых цепей. При этом перераспределения связей в боковых цепях аминокислот активного центра фермента не происходит, что напоминает механизм, действующий по принципу «замок-ключ». Согласно полученным данным, ингибирование аминокотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью из *B. flavum* (*S*)-β-(*N*-бензиламино)аланином происходит по механизму смешанного типа, т.е. ингибитор, по-видимому, конкурирует с обоими субстратами при связывании с ферментом. Ингибирование же ароматической аминокотрансферазы из *C. freundii* (*S*)-β-(*N*-бензиламино)аланином

происходит по механизму конкуретного типа, что может свидетельствовать о связывании ингибитора с сайтом связывания фенилаланина. Выявление механизмов ингибирования исследованных аминотрансфераз имеет важное значение как для получения штаммов-продуцентов аминокислот с разветвленной цепью и ароматических аминокислот, так и для усовершенствования штамма, необходимого для получения фенилаланина путем биотрансформации.

Кафедра фармацевтической химии

Поступила 01.06.2009

ЛИТЕРАТУРА

1. **Shiio I. and Ujigawa K.** J. Biochem., 1978, v. 84, p. 647–655.
2. **Blombach B., Schreiner M.E., Bartek T., Oldiges M., Eikmanns B.** J. App. Microbiol. Biotechnol., 2008, v. 79, № 3, p. 471–479.
3. **Radmacher E., Vaitsikova A., Burger U., Krumbach K., Sahm H., Eggeling L.** Applied Environmental Microbiology, 2002, v. 68, p. 2246–2250.
4. **Безирджян Х.О., Амбарцумян А.А.** Биохимия, 1994, т. 59, с. 1385–1392.
5. **Marienhagen J., Kennerknecht N., Sahm H., Eggeling L.** J. Bacteriol., 2005, v. 187, p. 7639–7646.
6. **Araki K., Ozeki T., Ito Y., Ishino Sh., Anazawa H., Kamimori Sh.** United States Patent. Tokyo: Kyowa Hakko Kogyo Co., 1988, v. 4, № 783, p. 403.
7. **Амбарцумян А.А., Безирджян Х.О.** Биохимия, 1994, т. 59, с. 1378–1384.
8. **Shiio I., Mori M. and Ozaki H.** Agric. Biol. Chem., 1982, v. 46, p. 2967–2977.
9. **Корниш-Бууден Э.** Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979, с. 244–253.
10. **Hirotsu K., Goto M., Okamoto A., Miyahara I.** Chem. rec., 2005, v. 5, p.160–172.

Ա Մ ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

(S)-β-(N-բենզիլամինո)ԱԼԱՆԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
BREVIBACTERIUM FLAVUM-Ի ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՃՅՈՒՂԱՎՈՐՎԱԾ
ԱՄԻՆԱՏՐԱՆՍՖԵՐԱԶԻ ԵՎ *CITROBACTER FREUNDII*-Ի ԱՐՈՍՍՏԻԿ
ԱՄԻՆԱՏՐԱՆՍՖԵՐԱԶԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների ազդեցությունը *B.flavum*-ի ամինաթթուների ճյուղավորված ամինատրանսֆերազի և *C. freundii*-ի արոմատիկ ամինատրանսֆերազի վրա: Աշխատանքում ցույց է տրված, որ (S)-β-(N-բենզիլամինո)ալանինն արգելակում է երկու ֆերմենտների ակտիվությունը: Առաջին դեպքում արգելակման ցուցանիշն է՝ IC50=1,35 մU, իսկ երկրորդ դեպքում՝ 3,8 մU: Բացահայտվել է ուսումնասիրվող ֆերմենտների արգելակման մեխանիզմը: (S)-β-(N-բենզիլամինո)ալանինով ամինաթթուների ճյուղավորված ամինատրանսֆերազի արգելակումն ընթանում է խառը տիպի մեխանիզմով, իսկ արոմատիկ ամինատրանսֆերազինը՝ մրցակցային: Արգելակման մեխանիզմների ուսումնասիրությունը մեծ նշանակություն ունի ամինատրանսֆերազինը՝ օգտագործման ժամանակ ամինաթթուների արտադրության շտամ-արտադրիչների արդյունավետության բարձրացման գործընթացում:

A. M. HOVHANNYSYAN

INFLUENCE OF (S)- β -(N-BENZYLAMINO)ALANINE ON BRANCH
CHAIN *BREVIBACTERIUM FLAVUM* AMINO ACIDS
AMINOTRANSFERASE AND AROMATIC AMINOTRANSFERASE OF
CITROBACTER FREUNDII

Summary

The influence of nonprotein amino acids on branch chain amino acids aminotransferase of *B. flavum* and aromatic transaminase of *C. freundii* has been studied. According to the obtained results activity of both enzymes are inhibited by (S)- β -(N-benzylamino)alanine. The values of IC₅₀ are 1,35 mM for the first enzyme and 3,8 mM for the last one. The mechanism of inhibition of these enzymes by (S)- β -(N-benzylamino)alanine was revealed. The data obtained suggested that branch chain amino acids aminotransferase is inhibited by (S)- β -(N-benzylamino)alanine in mixed mode and aromatic transferase is inhibited in competitive mode of inhibition. The study of inhibition mechanisms is important for aminotransferases usage in improvement of amino acid production with strain-producers.