

М. А. ДАВТЯН, И. В. ГОГИНЯН, Е. Г. БАГДАСАРЯН

ОЧИСТКА И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРАНСАМИНАЗЫ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ДРОЖЖЕЙ С. GUILLIERMONDII ВКМ У-42

Произведена частичная очистка трансаминазы, катализирующей переаминирование разветвленных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин) (Ф1), и лейцинспецифичной трансаминазы (Ф2). Изучены некоторые кинетические свойства выделенных ферментов, в частности, оптимум рН, K_M для аминокислот, α -кетоглутарата и пиридоксальфосфата, а также ингибирующее влияние изониазида. При концентрации последнего $0,078 \cdot 10^{-2}$ Ф1 ингибируется на 20—25%, а Ф2 — почти на 50%.

В предыдущей нашей работе было доказано наличие двух ферментных систем трансаминирования разветвленных аминокислот у дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42: одна — специфичная только к лейцину, а другая — ко всем трем разветвленным аминокислотам (валин, лейцин, изолейцин). Было показано поведение этих ферментативных активностей при гель-фильтрации и ионообменной хроматографии, а также влияние ионной силы среды и низких температур на активность трансаминирования разветвленных аминокислот [1].

В настоящей работе мы задались целью на основании выявленных свойств ферментов трансаминирования разветвленных аминокислот разработать метод их очистки, а также на полученных очищенных препаратах изучить некоторые кинетические свойства последних (рН — оптимум, K_M , влияние ингибиторов).

Материал и методика. Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводились по ранее описанным методам [1].

Результаты и обсуждение. **Ход очистки. I этап.** Биомасса дрожжей гомогенизировалась в гомогенизаторе типа Элведжем-Поттера в присутствии кварцевого песка в 0,02 М КNa-фосфатном буфере при 0°C, после чего полученный гомогенат центрифугировался при 25000 г в течение 30 мин (0—2°C).

2 этап. Бесклеточный экстракт выдерживался при —14°C в течение 18—20 час. Выпавший при этом осадок, лишенный трансаминазной активности, удалялся центрифугированием при 25000 г в течение 15 мин (0—2°C).

3 этап. Полученный надосадок подвергался гельфильтрации на колонке (55×2,4) с сефадексом g—200, уравновешенной 0,02 М КNa-фосфатным буфером (рН 7,8); скорость фильтрации—10 мл/час, объем фракции—5 мл. Активность трансаминирования разветвленных

аминокислот фильтровалась во фракциях 13—24, которые объединялись и подвергались ионообменной хроматографии.

4 этап. Объединенная активная фракция наносилась на колонку с ДЭАЭ целлюлозой (1,4×30), предварительно уравнивающую 0,02 М КNa-фосфатным буфером (рН—7,8). Активность трансаминирования разветвленных аминокислот элюировалась во фракциях 16—18, в то время как лейцин-аминотрансфераза—во фракциях 22—24. Весь ход очистки суммирован в табл. 1. Как видно из приведенных данных, в

Таблица 1
Ход очистки трансаминазы разветвленных аминокислот дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42 (активность в мг глутаминовой кислоты)

Фракция	Белок, мг	Доноры аминокруппы								
		валин			лейцин			изолейцин		
		общая активность	удельная активность	степень очистки	общая активность	удельная активность	степень очистки	общая активность	удельная активность	степень очистки
Бесклеточный экстракт (надосадок центрифугирования гомогената при 25000 g)	348,0	810,0	2,3	—	1015,0	2,9	—	700,0	2,0	—
Холодовая обработка при —14°C 18 час. (надосадок 2500 g)	104,0	840,0	8,1	3,5	1075,0	10,3	3,5	725,0	7,0	3,5
Гельфильтрация (сефадекс g—200). Фракции 13—24	24,8	593,1	23,9	10,3	649,8	22,1	7,5	524,8	21,2	10,5
Ионообменная хроматография на ДЭАЭЦ										
I пик активности (Ф1) (фракции 16—18)	1,4	210,0	151,0	64,9	195,0	140,0	47,4	202,5	145,6	68,8
II пик активности (Ф2) (фракции 22—24)	1,7	—	—	—	232,5	138,4	44,1	—	—	—

результате очистки были получены два ферментных препарата. Один, катализирующий трансаминирование всех трех разветвленных аминокислот, со степенью очистки 65 (Ф1), а другой—специфичный лишь к лейцину, со степенью очистки 44 (Ф2). В последующих экспериментах изучались кинетические свойства полученных препаратов. В частности, оптимум рН для Ф1 оказался равным 8,0, в то время как для Ф2—8,5 (рис. 1, а, б). Следует отметить, что, согласно также литературным данным, трансаминаза, специфичная к лейцину (Ф2), имеет более высокие значения оптимума рН, по сравнению с общей трансаминазой разветвленных аминокислот (Ф1). Так, оптимум рН Ф1 из печени крыс равен 8,2, а Ф2—8,7 [2]. Приведенные в литературе значения оптиму-

ма рН трансаминазы разветвленных аминокислот (Ф1), выделенных из различных объектов, колеблются в пределах 8,0—8,7 [2—10].

В следующей серии экспериментов изучалось влияние различных концентраций пиридоксальфосфата на активность Ф1 и Ф2. Следует отметить, что в отсутствие кофактора оба фермента проявляли лишь 15% максимальной активности. При изображении этих данных в ви-

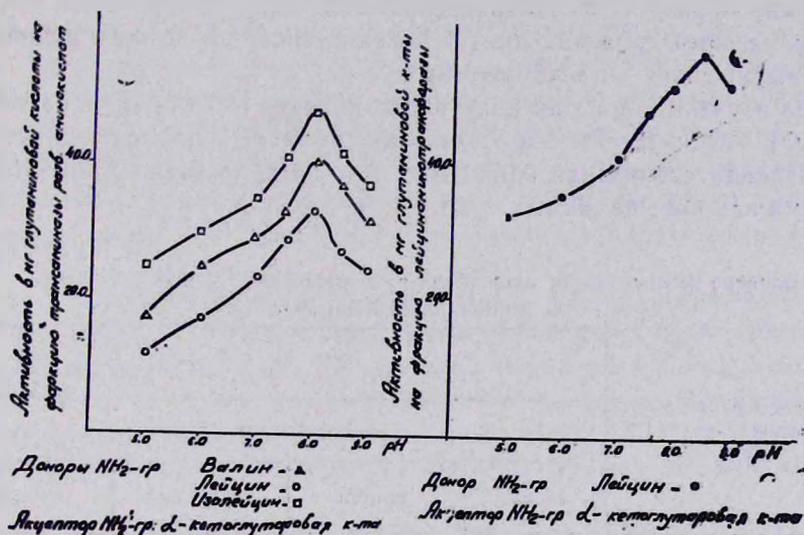


Рис. Зависимость трансаминазной активности от рН инкубационной среды а) Ф1, б) Ф2.

де кривых Лайнуивера-Берка значения K_m для пиридоксальфосфата в отношении Ф1 и Ф2 составляли соответственно 0,018 и 0,001. Интересно отметить, что эти величины в отношении Ф1 и Ф2 печени крыс [2] составляли 0,025 и 0,004 соответственно (значения K_m приводятся в μM). Что же касается величины K_m для аминокислот и α -кетоглутарата (табл. 2), то они в отношении Ф1 близки соответствующим показателям

Таблица 2
Величина K_m для субстратов переаминирования

Субстраты	Значение K_m ($\mu M/l$)	
	Ф1	Ф2
Валин	3,7	—
Лейцин	1,5	6,6
Изолейцин	1,4	—
α -кетоглутаровая кислота	0,64	0,42
Пиридоксальфосфат	0,018	0,001

телям печени крыс [2], и особенно *Pseudomonas aeruginosa* [3], в то время, как в отношении Ф2 они не совпадают с аналогичными показателями печени крыс.

Однако существенно, что в обоих объектах значение Км для лейцина в отношении Ф2 значительно выше, чем в отношении Ф1, в то время как для α -кетоглутарата оно выше в отношении Ф1. Так, Км для валина, лейцина, изолейцина и α -кетоглутарата в отношении Ф1 печени крыс имеет значения 4,3, 0,75, 0,84 и 1,0 соответственно, а в отношении Ф2 для лейцина и α -кетоглутарата—25,0 и 0,065 соответственно.

Таким образом, Ф1 по сравнению с Ф2 как в печени крыс, так и в изучаемых нами дрожжах имеет более высокое сродство к лейцину и менее выраженное—к α -кетоглутарату.

Мы изучали также ингибирующее влияние изониазида на активность Ф1 и Ф2. Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что при концентрации изониазида $0,078 \times 10^{-2}$ Ф1 ингибируется на 20—25%, в то время как Ф2—на 50%.

Таблица 3
Влияние изониазида на трансминазную активность Ф1 и Ф2 дрожжей *S. guilliermondii* ВКМ У-42

Концентрация изониазида, М	Ф1		Ф2	
	доноры аминокруппы			
	валин	лейцин	изолейцин	лейцин
Без ингибитора	98,2 \pm 3,4	110,8 \pm 5,7	110,8 \pm 1,5	132,0 \pm 6,4
$0,078 \times 10^{-2}$	67,4 \pm 4,4	81,7 \pm 0,2	99,0 \pm 0,8	71,2 \pm 8,2
$0,156 \times 10^{-2}$	54,4 \pm 1,8	66,6 \pm 4,1	82,8 \pm 1,3	62,9 \pm 4,3
$0,312 \times 10^{-2}$	46,8 \pm 1,4	55,2 \pm 0,44	72,5 \pm 0,41	43,2 \pm 3,7
$0,625 \times 10^{-2}$	28,7 \pm 0,24	34,1 \pm 3,8	60,0 \pm 0,5	26,2 \pm 2,4
$1,250 \times 10^{-2}$	20,0 \pm 0,8	30,0 \pm 5,7	48,2 \pm 0,2	16,6 \pm 2,36
$2,500 \times 10^{-2}$	11,8 \pm 0,3	21,2 \pm 3,0	39,1 \pm 0,2	11,4 \pm 2,3

Суммируя полученные данные, можно заключить, что впервые на микробиологическом объекте нам удалось показать наличие двух ферментов трансминирования разветвленных аминокислот: один—катализирующий трансминирование всех трех разветвленных аминокислот, другой—специфичный лишь к лейцину, причем оба выделенных фермента по своим основным кинетическим показателям близки соответствующим ферментам печени крыс [2].

Приведенные в работе данные представляют также определенный общезнимологический интерес, так как в литературе имеются достоверные данные о наличии указанных двух форм трансминазы разветвленных аминокислот лишь в печени крыс [2], и косвенные—у *E. coli* [4].

Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Ի. Վ. ԳՈԳԻՆՅԱՆ, Ե. Գ. ԲԱՂԴԱՍՏՐՅԱՆ

С. GUILLIERMONDII ВКМ У—42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՃՅՈՒՂԱՎՈՐՎԱԾ ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԻ ՏՐԱՆՍԱՄԻՆԱԶԱՅԻ ՄԱՔՐՈՒՄԸ ԵՎ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Կատարվել է ճյուղավորված ամինաթթուների (վալին, լեյցին, իզոլեյցին) տրանսամինացումն իրականացնող ֆերմենտի (Փ 1), ինչպես նաև լեյցինին տրանսամինացնող (Փ 2) մասնակի մաքրումը՝ սառը՝ մշակման, դիֆիլտրացիայի (սեֆադեքս ց—200) և իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիայի (ԴէԱէՅ) կիրառմամբ: Ուսումնասիրվել են անջատված ֆերմենտների մի քանի կինետիկական հատկությունները: Հայտնաբերվել են Km-ի հետևյալ արժեքները՝ Փ1՝ վալին—3,7 mM, լեյցին—1,5 mM, իզոլեյցին—1,4 mM:

α-կետոգլուտարական թթու—0,64mM և պիրիդոքսալֆոսֆատ—0,018 mM Փ2՝ լեյցին—6,6 mM, α-կետոգլուտարական թթու—0,42 mM, պիրիդոքսալֆոսֆատ—0,001 mM: Փ1-ի համար օպտիմալ pH հավասար է 8,0, իսկ Փ2-ի համար՝ 8,5: Ուսումնասիրվել է նաև իզոնիզազիդի արգելակիչ ազդեցությունը հրկու ֆերմենտների ակտիվության վրա: Վերջինիս $0,078 \cdot 10^{-2}$ M խտության դեպքում Փ1 ճնշվում է 20—25%-ով, իսկ Փ2՝ մոտ 50%-ով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гогинян И. В., Багдасарян Е. Г., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 29, 9, 1976.
2. Aki K., Ogawa K., Ichihara A. Biochim. Biophys. Acta, 159, 2, 1968.
3. Norton J. E., Sokatch J. R. Biochim. Biophys. Acta, 206, 2, 1970.
4. Raunio R. Acta. Chem. Scand. 22, 8, 1968.
5. Aki K., Yokojima A., Ichihara A. J. Biochem, 65, 4, 1969.
6. Collins M., Wagner R. Arch. Biochem. Biophys, 155, 184, 1973.
7. Ichihara A. Enzyme, 15, 1—6, 1973.
8. Ichihara A., Koyama E. J. Biochem, 59, 2, 160, 1966.
9. Mikulík K. FEBS Letters, 1, 4, 1968.
10. Tochikura T., Tachiki T., Nakahama K., Baich A., Cheldelin V. H. Agr. Biol.-Chem., 37, 5, 1161, 1973.