



• Համառոտ հաղորդումներ • Краткие сообщения • Short communications •

Биолог. журн. Армении, 4 (61), 2009

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АМИНОТРАНСФЕРАЗ

А.М. ОГАНЕСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра фармацевтической химии

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

*Аминотрансфераза- небелковые аминокислоты -ингибирование-
Brevibacterium flavum- Corynebacterium glutamicum.*

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

*ամինատրանսֆերազներ - ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ -
արգելակում - Brevibacterium flavum - Corynebacterium glutamicum*

The influence of nonprotein amino acids on activities of branched-chain amino acids aminotransferase of *B. flavum* and aromatic aminotransferase of *C. freundii* has been studied. According to the obtained results both enzymes are inhibited by (S)- β -benzylamino)alanine. The value of IC50 is 1.35 mM for the first enzyme and 3.8 mM for the second one. The mechanism of inhibition of these enzymes by (S)- β -benzylamino)alanine was revealed. The data obtained suggested that the branched-chain amino acids aminotransferase is inhibited by (S)- β -benzylamino)alanine in mixed mode while the aromatic transferase is inhibited in competitive mode of inhibition. The study of inhibition mechanisms is important for aminotransferases use in improvement of amino acid production with strain-producers.

*Aminotransferase- nonprotein amino acids- inhibition- Brevibacterium flavum-
Corynebacterium glutamicum*

Амиротрансферазы (АТ) аминокислот с разветвленной цепью участвуют в биосинтезе гидрофобных аминокислот (лейцина, изолейцина и валина). АТ-ы, 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, 2]. Трансаминаза В (ПvЕ) является единственным ферментом *Corynebacterium glutamicum*, участвующим на стадии трансаминирования биосинтеза трех аминокислот с разветвленной цепью. Показано, что повышение активности этого фермента приводит к суперпродукции валина у *C. glutamicum* [3,4].

Анализ последовательности генома *C. glutamicum* выявил 20 предполагаемых АТ, как пиродоксаль-5'-фосфат зависимых ферментов, из которых наиболее явными оказались AlaT, AvtA, (ПvЕ) и AroT [5]. Известен способ превращения фенилпирувата в L-фенилаланин с применением таких микроорганизмов как, например, *Citrobacter freundii* [6]. Конструирование продуцентов аминокислот основано в частности на получении регуляторных мутаций. В получении регуляторных мутантов важную роль играют аналоги аминокислот. Исследование действия небелковых аминокислот и пептидов на их основе на активность АТ прежде всего позволяет выявить новый класс аналогов. В настоящей работе представлены данные по исследованию действия небелковых аминокислот на активность аминотрансфераз. Впервые показано ингибирование обоих исследуемых трансфераз (S)- β -(N-бензиламино)аланином и выявлены механизмы ингибирования.

Материал и методика. Материалом для работы служила регенерирующая печень половозрелых ящериц вида *Lacerta agilis* (прыткая ящерица). Средняя

Новый класс небелковых аминокислот синтезирован сотрудниками НИИ Биотехнологии и Химического факультета ЕГУ. Штаммы *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 (дикий тип) и *Citrobacter freundii* 62 взяты из коллекции культур НИИ Биотехнологии. Штаммы выращивали на стандартных средах [4].

Активность аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью определяли в клеточных экстрактах *B. flavum* ATCC 14067 по известному методу [7].

Активность ароматической аминотрансферазы *Citrobacter freundii* 62 определяли модифицированным методом Shiio и соавторов [7].

Результаты и обсуждение. Действие небелковых аминокислот на активность аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью и ароматической аминотрансферазы. Результаты действия исследуемых небелковых аминокислот (5 mM) на активность аминотрансфераз в реакции трансаминирования приведены в таблице 1. Из всех исследованных соединений ингибирующим воздействием обладали (S)- β -(N-бензиламино)аланин и (S)- β -(N-метиламино)аланин (табл. 1).

Ингибирование аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью (S)- β -(N-бензиламино)аланином сильнее (IC₅₀ = 1,35 mM) ингибирования тем же соединением аминотрансферазы ароматических аминокислот (IC₅₀ = 3,8 mM)

Таблица 1. Ингибирование аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью *B. flavum* ATCC 14067 и ароматической трансферазы *C. freundii* 62

Небелковая аминокислота	фермент	Ингибирование при конц. 5 мМ %	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
(S)-β-(метиламино)аланин	Аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью	57,0	>5

Механизм ингибирования аминотрансфераз бензиламиноаланином. Для выявления механизма ингибирования аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью активность фермента измеряли в диапазоне концентраций аминокислоты-субстрата 1– 10 мМ и ингибитора 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 вычисляли графически по профилю зависимостей $1/V - [I]$ и $[S]/V - [I]$, а также расчётным способом по специально разработанной программе. Экспериментальная серия содержала 16 независимых измерений. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

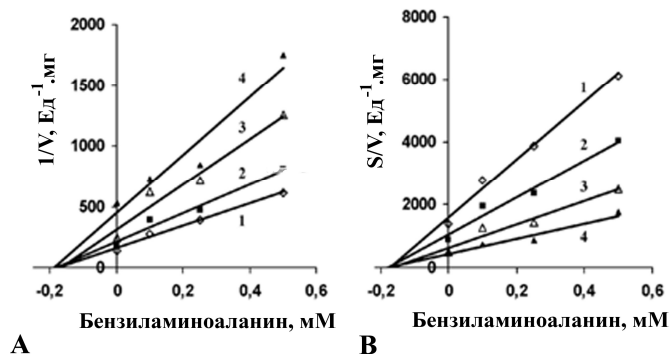


Рис.1. Кинетика ингибирования аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью из *B. flavum* (S)-β-(N-бензиламино)аланином.

Зависимости $1/V - I$ (А), и $S/V - I$ (В) от концентрации ингибитора. Концентрации L-валина: 1 – 10 мМ; 2 – 5 мМ; 3 – 2 мМ; 4 – 1 мМ.

Из характера зависимости $1/V - I$, и $S/V - I$ для аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью из *B. flavum* следует (рис. 1), что (S)-β-(N-бензиламино)аланин ингибирует фермент 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.

Соответственно, из характера зависимости $1/V - I$, и $S/V - I$ для ароматической аминотрансферазы из *C. freundii* следует (рис.2), что (S)-β-(N-бензиламино)аланин ингибирует фермент по механизму конкурентного

типа, с $K_m = 0,65 \pm 0,13$ мМ (субстрат – L-фенилаланин), и константой ингибирования $K_i = 0,34 \pm 0,071$ мМ.

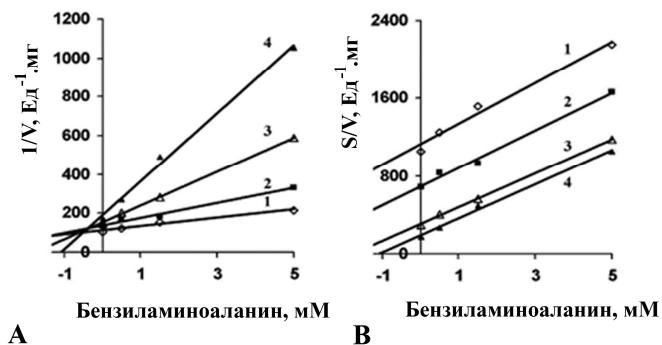


Рис.1. Кинетика ингибирования ароматической аминотрансферазы из *C. freundii* (S)- β -(N-бензиламино)аланином. Зависимости $1/V$ – (А), и S/V – (В) от концентрации ингибитора. Концентрации L-фенилаланина: 1 – 10 мМ; 2 – 5 мМ; 3 – 2 мМ; 4 – 1 мМ.

Согласно полученным данным ингибирование аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью из *B. flavum* (S)- β -(N-бензил-амино)аланином происходит по механизму смешанного типа, т.е. ингибитор по видимому конкурирует с обоими субстратами при связывании с ферментом. Ингибирование же ароматической аминотрансферазы из *C. freundii* (S)- β -(N-бензиламино)аланином происходит по механизму конкуретного типа, что может свидетельствовать о связывании ингибитора с сайтом связывания фенилаланина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shiio I., Ujigawa K. Jour. of Biochem., 84, 3, 647 – 657, 1978.
2. Blombach B, Schreiner ME, Bartek T, Oldiges M, Eikmanns BJ. Appl Microbiol Biotechnol. 2008 Jun;79, 3, 471-9. 2008.
3. Radmacher E., Vaitsikova A., Burger U., Krumbach K., Sahn H., Eggeling L. Applied Environmental Microbiology, 68, 2246-2250, 2002.
4. Ambartsumyan A., Bezirdzhyan Kh. Biochemistry (Moscow). - 59, 9. –1027-1032, 1994.
5. Marienhagen J, Kennerknecht N, Sahn H, Eggeling L. J Bacteriol., 187, 7639-46, 2005.
6. Araki K., Ozeki T., Ito Y., Ishino Sh., Anazawa H., Kamimori Sh. United States Patent 4,783,403, 1988, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, JP).
7. Shiio I., Ozaki H. Journ. of Biochemi. 68, 5, 633-647, 1970.

Поступила 24.07.2009.