



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

## НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА АЛАНИН: 2-КЕТОГЛУТАРАТ АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

Լ.Դ. ԳԱՅԲԱԿՅԱՆ

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА  
luizaarm@list.ru

Из клеточных экстрактов *Brevibacterium flavum* выделена и частично очищена мажорная фракция аланинтрансминазы. Показано, что в результате 2-этапной очистки удельная трансминазная активность возросла в 14 раз, а выход ферментативной активности составил 18 %. Методом гель-фильтрации установлена молекулярная масса фермента, равная 96,5 кДа. Установлено, что в прямой реакции синтеза аланина трансминаза проявляет максимальную активность при pH 8,8-9,8, а в обратной – при pH 9,3-9,8. Выявлена 50%-ная потеря активности фермента при температуре 61<sup>0</sup>С в течение 10 мин, тогда как добавление к инкубационной среде 25 % глицерина снижает значение этого параметра до 55<sup>0</sup>С.

*Brevibacterium flavum* – аланинтрансминаза – очистка – молекулярная масса – оптимум pH – термостабильность

*Brevibacterium flavum*-ի բջջային էքստրակտներից անջատվել և մասնակիորեն մաքրվել է ալանին տրանսամինազային ակտիվության հիմնական ֆրակցիան: Մաքրման կիրառված երկու ետապների արդյունքում տրանսամինազի տեսակարար ակտիվությունը բարձրացել է 14 անգամ, իսկ ֆերմենտային ակտիվության ելքը կազմել է 18 %: Գել-ֆիլտրման տվյալներով ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը 96,5 կԴա է: Ալանինի սինթեզի ուղիղ ռեակցիայում տրանսամինազը առավելագույն ակտիվություն է ցուցաբերում pH 8,8-9,8 տիրույթում: Հակադարձ ռեակցիայում ֆերմենտի առավելագույն ակտիվությունը դիտվում է pH-ի առավել նեղ՝ 9,3-9,8 տիրույթում: *B. flavum*-ի ալանին տրանսամինազը ակտիվության 50 %-ը կորցնում է 10 ր 61<sup>0</sup>С ջերմաստիճանում տաքացնելիս, մինչդեռ 25 % գլիցերինի ներկայությամբ այդ պարամետրի արժեքն ընկնում է մինչև 55<sup>0</sup>С:

*Brevibacterium flavum* – ալանին տրանսամինազ – մաքրում – մոլեկուլային զանգված – pH օպտիմում – ջերմակայունություն

From cell extracts of *Brevibacterium flavum* the major fraction of alaninetransaminase activity was isolated and partially purified. In the result of 2-stage purification procedure the specific activity of transaminase increased 14-fold, and the yield of enzyme activity was 18%. According to the gel filtration data the enzyme has a molecular weight of 96.5 kDa. In the direct synthesis reaction of alanine the transaminase exhibits maximal activity at pH 8.8-9.8. In the reverse reaction the maximum enzyme activity was observed in a narrower range of pH 9.3-9.8. Alaninetransaminase of *B. flavum* loses 50 % of activity in the incubation of 10 min at 61<sup>0</sup>С, while the addition to the incubation medium 25% glycerol reduces this value to 55<sup>0</sup>С.

*Brevibacterium flavum* – alanine transaminase – purification – molecular weight – optimum pH – thermal stability

L-аланин: аминотрансфераза (аланинтрансминаза; ЕС 2.6.1.2) катализирует обратимую реакцию переаминирования L-аланина и 2-кетоглутаровой кислоты (L-аланин + 2-кетоглутарат = пируват + L-глутамат), что имеет важное значение в метаболизме аланина.

В 1967 г. Сейер и Дженкинс впервые выделили, очистили и охарактеризовали аланинтрансминазу из сердца быка [10], этот фермент впоследствии также был выделен из других источников и подробно описан. В частности, выделены и охарактеризованы аланинтрансминазы из мозга быка [9], клеток *Chlamydomonas reinhardtii* [6], корней ячменя [4], клеток *Candida maltosa* [12], клеток гипертермофильной археобактерии – *Pyrococcus furiosus* [14], печени пресноводных рыб *Clarias batrachus* и *Labeo rohita* [11] а также клонирована через кДНК, экспрессирована и охарактеризована аланинтрансминаза-1 собаки [8]. Следует отметить, что пути биосинтеза аланина у бактерий и бактериальные аланинтрансминазы у модельного штамма *Escherichia coli* [5] и потенциальных продуцентов аминокислот – коринеформных бактерий мало изучены.

Изучены пути биосинтеза аланина у *Brevibacterium flavum* [1] и участие в нем аланинтрансминазы, валин:пируват аминотрансферазы (трансминаза С) [2, 3] и аланинрацемазы. Аналогичная картина наблюдается и у *E. coli*, у которого идентифицированы три гена, участвующие в синтезе аланина – *avtA*, *alaA* и *alaB* [13, 15]. Показано, что *avtA* соответствует гену трансминазы *S. B. flavum*, продукт гена *alaA* не был охарактеризован, а *alaB* кодирует аланинтрансминазу *E. coli* [13].

Дальнейшее детальное изучение биосинтеза аланина у *E. coli* выявило, что у этих бактерий имеются три основные аланинсинтезирующие аминотрансферазы – *AvtA*, *YfbQ* (*AlaA*) и *YfdZ* (названное авторами *AlaC*), которые обеспечивают 90 % синтеза аланина, и около восьми минорных аланинсинтезирующих аминотрансфераз – *ArgD*, *AstC*, *SerC*, *AspC*, *GabT*, *PuuE* (называемый также *GoaG*), *TyrB* и *YgjG*), способных обеспечивать 10 % синтеза аланина [5]. Эти результаты американских ученых были подтверждены независимыми исследованиями японских исследователей [16].

Ким с соавторами очистили до гомогенности *YfbQ* и *YfdZ* аланинтрансминазы *E. coli* и показали, что оба фермента – димеры с молекулярными массами 87 кДа (субъединицы – 46 и 47 кДа соответственно) и проявляют Км(каж.) для пирувата в районе внутриклеточной концентрации этой кислоты [5].

Целью данной работы являлось выделение, очистка и предварительная характеристика аланинтрансминазы *B. flavum* ATCC 14067.

**Материал и методика.** В работе использован штамм *B. flavum* ATCC 14067 (валидное название – *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067), поддерживаемый на мясоептонном агаре (МПА).

Культуру выращивали на питательной среде, содержащей (%): сахарозу – 10;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4$  – 0,1; а также биотин – 1 мг/л; тиамин – 2 мг/л; pH – 7,4, в колбах объемом 750 мл, содержащих по 100 мл питательной среды, в течение 22-24 ч, на круговых качалках со скоростью вращения 200 об/мин при температуре 30°C. Клетки осаждали центрифугированием при 10000 g 40 мин, температуре 4°C. Биомассу промывали буферным раствором А [состав буфера – трис-НСl 20 мМ, pH – 8,9; ЭДТА – 2 мМ; меркаптоэтанол – 15 мМ; пиридоксаль фосфат (ПДФ) – 0,1 мМ; глицерин – 10 %] и после центрифугирования хранили при температуре 18°C.

Клетки дезинтегрировали ультразвуковой обработкой в течение 20 мин при частоте звука 20 кГц и мощности 300 Вт (Labsonic 2000, В. Braun, Германия) в растворе А. Остатки клеток удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин (центрифуга К-24, Германия).

Очистку аланинтрансминазы проводили при температуре 4°C по схеме, представленной в табл. 1.

На втором этапе полученный на предыдущей стадии ферментный препарат подвергли анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-тойоперле, уравновешенном раствором А. Экстракт наносили на колонку (2,5x20 см) и промывали раствором А, объем которого вдвое больше объема колонки. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0-0,4 М), приготовленным на растворе А (V=500 мл). Фракции собирали автоматическим коллектором "Isco" (США), активные фракции объединяли и использовали на следующем этапе.

Далее очистку проводили на колонке (1,5x83 см) с сефарозой CL 6В, уравновешенной буферным раствором А, содержащим 0,1 М NaCl. Аминотрансферазу элюировали тем же буферным раствором. Полученные активные фракции объединяли, концентрировали диализом против полиэтиленгликоля (мол. масса 20 кДа) и использовали в дальнейших экспериментах.

*Активность фермента* определялась в реакционной среде с конечным объемом 400 мкл, содержащей: 100 мМ L-глутаминовой кислоты; 50 мМ пирувата; 0,05 мМ ПЛФ; 5 мМ меркаптоэтанола; 2 мМ ЭДТА; 0,1 М трис-HCl, pH-8,9 и ферментный препарат в необходимом количестве. Количество образованного 2-кетоглутарата определяли по окислению восстановленной НАД в присутствии глутаматдегидрогеназы ( $\epsilon_{340} - 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Активность фермента в обратной реакции определяли в реакционной среде с конечным объемом 400 мкл, содержащей: 100 мМ L-аланина; 50 мМ пирувата; 0,05 мМ ПЛФ; 5 мМ меркаптоэтанола; 2 мМ ЭДТА; указанный буферный раствор и ферментный препарат в необходимом количестве. Количество образованного пирувата определяли по окислению восстановленной НАД в присутствии лактатдегидрогеназы.

За единицу активности фермента принималось образование 1 мкмоль продукта за минуту в указанных условиях. Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса по поглощению в ультрафиолетовой области [7].

*Молекулярные массы ферментов определялись* методом гель-фильтрации на колонке (1,5x83 см) с сефарозой CL 6В, калиброванной белками с известными молекулярными массами: ферритин (450 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), яичный альбумин (45 кДа), химотрипсиноген (25 кДа) и бычий миоглобин (17 кДа).

*Для определения pH оптимумов* активность ферментов измеряли при pH в интервале от 6 до 10. При изучении pH оптимума реакционная смесь содержала четырехкомпонентный буфер (по 100 мМ трис, фосфатного, карбонатного, боратного раствора), pH которой приводили к соответствующим значениям добавлением концентрированного HCl или NaOH.

*Для изучения термостабильности* фермент инкубировали в указанных условиях при разных температурах в течение 10 мин (pH 8,9). После инкубации пробы остужали в ледяной бане и измеряли остаточную ферментативную активность.

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: ЭДТА, меркаптоэтанол, трис(гидроксиметил)аминометан, белковые маркеры для молекулярных масс, 2-кетоглутаровая кислота и диализные мешки фирмы "Serva", Германия; ДЭАЭ тойоперл 650М фирмы "Toyo Soda", Япония, сефароза CL 6В фирмы "Pharmacia", Швеция, остальные реактивы производства стран СНГ.

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами было показано, что у *B. flavum* основной ферментативной активностью в биосинтезе L-аланина является глутамат: пируват трансаминирование [1], обусловленное аланинтрансaminaзой. В данной работе предпринята попытка выяснить характер этой активности. Для этого в предварительных экспериментах было выяснено, что аланинтрансaminaзная активность клеточных экстрактов *B. flavum* очень лабильна, что было известно и у других организмов [5, 10-12]. Фермент из *B. flavum* в обычном трис-HCl буфере теряет активность в течение 2-3 дней. Нами были проверены различные стабилизирующие агенты, в результате чего предложен буферный раствор А, содержащий пиридоксаль фосфат, меркаптоэтанол, ЭДТА и глицерин, в котором при 4<sup>0</sup>С аланинтрансaminaзная активность сохранялась в течение 4-5 недель.

Из клеточных экстрактов *B. flavum* выделяли и частично очищали мажорную фракцию аланин трансaminaзной активности. Результаты очистки представлены в табл. 1. Добавление к приведенной схеме этапов фракционного осаждения сульфатом

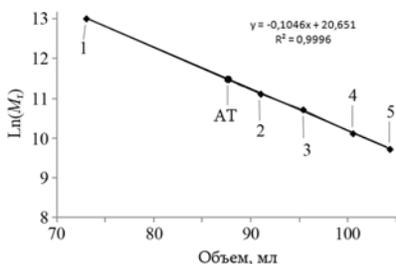
аммония и адсорбционной хроматографии на колонке с гидроксипатитом оказались неэффективны.

**Табл.1.** Результаты очистки аланинтрансаминазы *B. flavum*.

Этапы очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Дезинтеграция клеток	70	15,1	0,09	100,0
ДЭАЭ тойоперл 650М	60	1,3	0,67	54,9
Сефароза CL 6В	15	0,9	1,27	18,0

В результате примененных 2-х этапов очистки удельная трансаминазная активность возросла в 14 раз, а выход ферментативной активности составил 18 %. Однако полученный препарат электрофоретически гетерогенен (данные не приведены) и нуждается в дальнейшей очистке для возможного применения в экспериментах по изучению субстратной специфичности и других свойств. Некоторые характеристики частично очищенной аланинтрансаминазы *B. flavum* представлены ниже.

Результаты определения молекулярной массы аланинтрансаминазы *B. flavum* методом гель-фильтрации на сефарозе CL 6В приведены на рис.1.

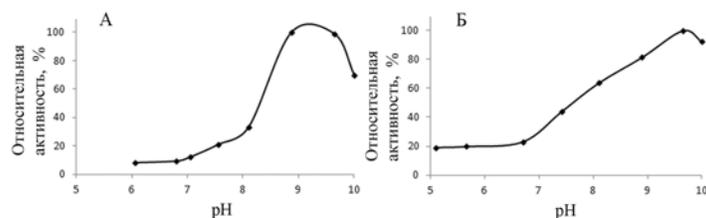


**Рис.1.** Определение молекулярной массы аланинтрансаминазы *B. flavum* методом гель-фильтрации. 1 – ферритин (450 кДа), 2 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 3 – яичный альбумин (45 кДа), 4 – химотрипсиноген А (25 кДа), 5 – бычий миоглобин (17 кДа), АТ – аланинаминотрансфераза *B. flavum*.

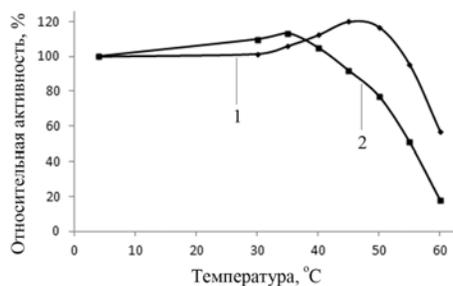
Из рис.1 следует, что фермент имеет молекулярную массу 96,5 кДа. Эти данные соответствуют известным литературным данным для аланинтрансаминаз: фермент из сердца свиньи имеет молекулярную массу 100 кДа [1], из *Chlamydomonas reinhardtii* – 105 кДа [6], из корней ячменя – 97 кДа [4], из *Candida maltosa* – 99 кДа [12], из *Pyrococcus furiosus* – 93,5 кДа [6], из *Escherichia coli* – 87 кДа [1].

Зависимость активности аланинтрансаминазы *B. flavum* от pH представлена на рис. 2. Из рисунка следует, что фермент в прямой реакции синтеза аланина проявляет максимальную активность при pH 8,8-9,8. В обратной реакции максимальная активность трансаминазы наблюдается в более узком диапазоне pH – 9,3-9,8. По сравнению с оптимумами pH известных аланинтрансаминаз: фермент имеет оптимум из сердца свиньи pH в диапазоне 7,5-8,5 [10], из *C. maltosa* – 7,0-8,0 [12], из *P. furiosus* – 6,5-8,0 [14], оптимум pH действия данного фермента сильно смещен в щелочную область.

Результаты изучения термостабильности аланинтрансаминазы *B. flavum* представлены на рис. 3.



**Рис.2.** Зависимость активности аланинтрансминазы *B. flavum* от pH реакционной среды. А – прямая реакция (реакция синтеза аланина, 100 % активности соответствует 1,2 ед/мг), Б – обратная реакция (100 % активности соответствует 0,25 ед/мг).



**Рис.3.** Влияние инкубирования 10 мин при указанных температурах на активность аланин-трансминазы *B. flavum* (прямая реакция, 100 % активности соответствует 1,2 ед/мг). 1 – среда инкубации содержала: 50 мМ трис-НСl буфера, pH 8,9, 0,05 мМ ПЛФ, 5 мМ меркаптоэтанола и 2 мМ ЕДТА, 2 – та же инкубационная среда с добавлением 25 % глицерина.

Из приведенных результатов следует, что примененные добавки стабилизируют фермент от тепловой денатурации, а добавление 25 % глицерина понижает термостабильность трансминазы. В указанных условиях аланинтрансминаза *B. flavum* теряет 50 % активности при инкубировании 10 мин, температуре 61°C, тогда как добавление к инкубационной среде 25 % глицерина снижает значение этого параметра до 55°C. Необходимо отметить значительное активирование фермента при низких температурах инкубирования. Для сравнения аланинтрансминаза из *S. Malitosa* при той же pH теряет 50 % активности при инкубировании 30 мин, температуре 46°C [12].

Исследования показали наличие в бесклеточных экстрактах *B. flavum* более одной аланинтрансминазы, что совпадает с известными результатами, полученными для *E. coli* [5, 16]. В данной работе изучены некоторые характеристики основной фракции аланин трансминазы *B. flavum*. Необходимы дальнейшие исследования для характеристики ферментов биосинтеза L-аланина у этого биотехнологически важного объекта.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гайбакян Л.Д., Аветисова Г.Е., Азизян А.Г., Амбарцумян А.А., Давтян М.А. Изучение ферментов биосинтеза аланина у *Brevibacterium flavum*. Биотехнология, 1, 44-48, 2003.

2. *Ambartsumyan A.A., Bezirdzhyan Kh.O.* Isolation and preliminary characterization of valine: pyruvate aminotransferase from *Brevibacterium flavum*. *Biochemistry (Moscow)*, 59, 9, 1021-1026, 1994.
3. *Ambartsumyan A.A., Bezirdzhyan Kh.O.* Catalytic properties of valine:pyruvate aminotransferase from *Brevibacterium flavum*. *Biochemistry (Moscow)*, 59, 9, 1027-1032, 1994.
4. *Good A.G., Muench D.G.* Purification and characterization of an anaerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. *Plant Physiol.*, 99, 1520-1525, 1992.
5. *Kim S.H., Schneider B.L., Reitzer L.* Genetics and regulation of the major enzymes of alanine synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 192, 20, 5304–5311, 2010.
6. *Lain-Guelbenzu B., Cardenas J., Muroz-Blanco J.* Purification and properties of L-alanine aminotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.*, 202, 881 - 887, 1991.
7. *Peterson G.L.* Determination of total protein. *Meth Enzymol.* 91, 95–119, 1983.
8. *Rajamohan F., Nelms L., Joslin D.L., Lu B., Reagan W.J., Lawton M.* cDNA cloning, expression, purification, distribution, and characterization of biologically active canine alanineaminotransferase-1. *Protein Expr. Purif.*, 48, 1, 81-9, 2006.
9. *Ruscák M., Orlický J., Zúbor V., Hager H.* Alanine aminotransferase in bovine brain: purification and properties. *J. Neurochem.*, 39, 1, 210-6, 1982.
10. *Saier Jr. M.H., Jenkins W.T.* Alanine Aminotransferase I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 242, 1, 91-100, 1967.
11. *Srivastava A.S., Oohara I., Suzuki T., Shenouda S., Singh S.N., Chauhan D.P., Carrier E.* Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 137, 2, 197-207, 2004.
12. *Umemura I., Yanagiya K., Komatsubara S., Sato T., Tosa T.* Purification and Some Properties of Alanine Aminotransferase from *Candida maltosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2, 283-287, 1994.
13. *Wang M.D., Buckley L., Berg C.M.* Cloning of genes that suppress an *Escherichia coli* K-12 alanine auxotroph when present in multicopy plasmids. *J. Bacteriol.*, 169, 5610–5614, 1987.
14. *Ward D.E., Kengen S.W.M., van der Oost J., de Vos W.M.* Purification and characterization of the alanine aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its role in alanine production. *J. Bacteriol.*, 182, 9, 2559–2566, 2000.
15. *Whalen W.A., Berg C.M.* Analysis of an avtA::Mu d1 (Ap lac) mutant: metabolic role of transaminase C. *J. Bacteriol.*, 150, 739–746, 1982.
16. *Yoneyama H., Hori H., Lim S.-L., Murata T., Ando T., Isogai E., Katsumata R.* Isolation of a mutant auxotrophic for L-alanine and identification of three major aminotransferases that synthesize L-alanine in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 5, 930-938, 2011.

Посылана 28.12.2012