



• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and theoretical articles •

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(64), 2012

ԱՆՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ԿՐԻՉԻ ՎՐԱ *ERWINIA CAROTOVORA* ՄԱՆԴԻ ՖԵՆԻԼՊԻՐՈՒՎԱՏՔ ՏՐԱՆՍԱՄԻՆԱՑՆՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԿՈՎԱԼԵՆ ԻՍՈԲԻԼԻԶԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ

Ա.Մ. ՊԱԼՈՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ ՊՈԱԿ
anipaloyan@mail.ru

Կատարվել է *Erwinia carotovora*-ի ֆենիլպիրուվատը տրանսամինացնող PAT1, PAT2 և PAT3 ֆերմենտների իմոբիլիզացում սիլոքրոմ C-80 կրիչի վրա: Սպիտակուցը կրիչին կարվել է գլուտարալդեհիդով: Ընտրված լավագույն պայմաններում իմոբիլիզացման արդյունքում պահպանվել է ռեակցիոն միջավայր տրված ֆերմենտային ակտիվության մինչև 42 %-ը: Իմոբիլիզացման արդյունքում 5-10 °C-ով մեծացել են PAT1 և PAT2 ֆերմենտների ջերմաստիճանային օպտիմումները: Ստացված կենսակատալիզատորները հարմար են օգտագործման համար, կայուն են, հեշտությամբ առանձնացվում են ռեակցիոն միջավայրից և կարող են կիրառվել բազմաթիվ աշխատանքային ցիկլերի ընթացքում:

E. carotovora — կովալենտ իմոբիլիզացում — սիլոքրոմ C-80 — L-ֆենիլալանին

Проведена иммобилизация ферментов PAT1, PAT2 и PAT3 из *Erwinia carotovora* трансаминирующих фенилпироват на силохроме C-80. Белок к носителю пришивали через глутаровый альдегид. В оптимальных условиях в результате иммобилизации сохранялось 42 % ферментативной активности. В результате иммобилизации температурный оптимум ферментов PAT1 и PAT2 увеличивался на 5-10 °C. Полученные биокатализаторы удобны в использовании, стабильны, легко отделяются от реакционной среды и могут быть применены в течение многих рабочих циклов.

E. carotovora – ковалентная иммобилизация – силохром C-80 – L-фенилаланин

Immobilization of phenylpyruvate transaminating enzymes PAT1, PAT2 and PAT3 from *Erwinia carotovora* was carried out on silochrom C-80. The protein was bound to the carrier with glutaraldehyde. At best optimal conditions 42 % of enzyme activity was maintained after immobilization. The temperature optimum of immobilized enzymes PAT1 and PAT2 arose on by 5-10 °C as a result of immobilization. The obtained biocatalysts are convenient for usage, are stable, can be easily separated from the reaction medium and can be used in many work cycles.

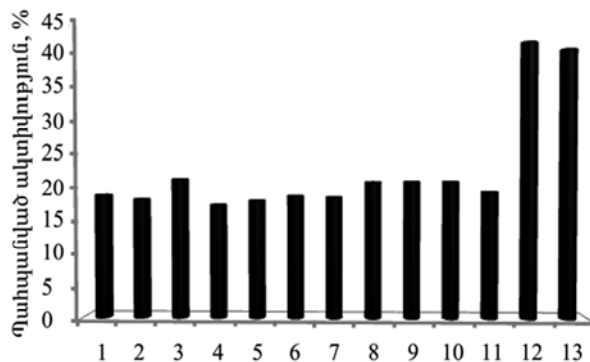
E. carotovora – covalent immobilization – silochrom C-80 – L-phenylalanine

L-ֆենիլալանինը հանդիսանում է անփոխարինելի ամինաթթու, որը լայնորեն օգտագործվում է դեղագործության և սննդարդյունաբերության մեջ: L-ֆենիլալանինի պահանջարկի աճը հատկապես պայմանավորված է դիպեպտիդային բնույթի քաղցրացնող նյութի՝ ասպարտամի մեծածավալ արտադրությամբ, որի կազմի մեջ մտնում է L-ֆենիլալանին և L-ասպարագինաթթու [8]: Նկարագրված են կենսատրանսֆորմացիոն եղանակով L-ֆենիլալանինի ստացման մի շարք մեթոդներ տրանս դարչնաթթվից L-ֆենիլալանին-ամոնիակիլիզ ֆերմենտի օգնությամբ (ՖԱԼ), հայտնաբերված բույսերի, խմորասնկերի, սնկերի և ակտինոմիցետների մոտ, ֆենիլպիրոլիտիզացիայի ամինատրանսֆերազների կիրառմամբ, որոնք լավ ուսումնասիրված են *Escherichia coli*-ի [12], *Bacillus subtilis*-ի [19], *Bacillus sp.*-ի [18], կորինեբակտերիաների [9], *Pseudomonas*-ների [20], *Klebsiella aerogenes*-ի [15], *Amycolatopsis methanolica*-ի [5] և թերմոֆիլ արխեբակտերիաներ *Thermococcus litoralis*-ի [6]:

Ջերմակայունության որոշման համար ազատ ֆերմենտային պատրաստուկները և իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորները ինկուբացվել են տարբեր ջերմաստիճաններում 30 ր և արագ սառեցվել սառցե բաղնիքում: Մնացորդային տրանսամինազային ակտիվությունը որոշվել են վերը նշված մեթոդով:

pH-ից կախված ջերմակայունության որոշման համար PAT1 և PAT2 ազատ ֆերմենտային պատրաստուկները 65°C, PAT3 ֆերմենտային պատրաստուկը՝ 55 °C, իսկ իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորները՝ 52°C ջերմաստիճաններում ինկուբացվել են 30 ր տարբեր pH-ի արժեք ունեցող բուֆերում: Այնուհետև նմուշները արագ սառեցվել է սառցե բաղնիքում: Մնացորդային տրանսամինազային ակտիվությունը որոշվել են վերը նշված մեթոդով:

Արդյունքներ և քննարկում: Գրականության մեջ բերված են տվյալներ, ըստ որոնց իմոբիլիզացման գործընթացի ընթացքում տարբեր սուբստրատների և կոֆերմենտի առկայությունը կայունացնում է ֆերմենտը [3, 11]: *E. carotovora*-ից ստացված ֆերմենտային պատրաստուկի իմոբիլիզացման արդյունքները որոշ նյութերի առկայության պայմաններում բերված են նկ. 1-ում:



Նկ. 1. Իմոբիլիզացման գործընթացում տարբեր սուբստրատների և կոֆերմենտի կայունացնող ազդեցությունը հետազոտումը (1 — ստուգիչ, 2—0,02 մմոլ/լ PLP, 3—0,2 մմոլ/լ PLP, 4—2 մմոլ/լ L-ֆենիլալանին, 5—20 մմոլ/լ L-ֆենիլալանին, 6—2 մմոլ/լ L-ասպարագինաթթու, 7—20 մմոլ/լ L-ասպարագինաթթու, 8—2 մմոլ/լ ֆենիլպիրուվատ, 9—20 մմոլ/լ ֆենիլպիրուվատ, 10—2 մմոլ/լ L-տրիպտոֆան, 11—20 մմոլ/լ L-տրիպտոֆան, 12—0,2 մմոլ/լ PLP, 20 մմոլ/լ ֆենիլպիրուվատ, 13—0,2 մմոլ/լ PLP, 20 մմոլ/լ ֆենիլպիրուվատ, 20 մմոլ/լ L-ասպարագինաթթու):

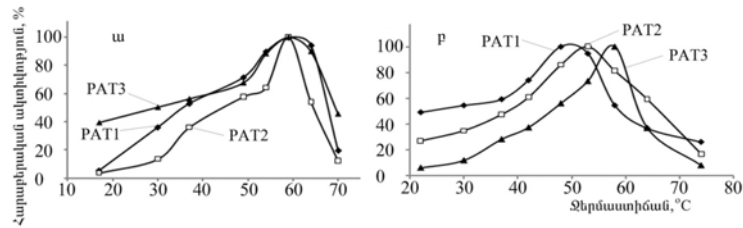
Ինչպես երևում է նկ. 1-ից, իմոբիլիզացման գործընթացում ֆերմենտային պատրաստուկի ակտիվությունը մինչև 42 % պահպանվում է, երբ ռեակցիոն միջավայրում առկա է PLP և ֆենիլպիրուվատ համապատասխանաբար 0,2 մմոլ/լ և 20 մմոլ/լ կոնցենտրացիաներով:

0,2 մմոլ/լ PLP-ի և 20 մմոլ/լ ֆենիլպիրուվատի նատրիումական աղի առկայության պայմաններում PAT1, PAT2 և PAT3 ամինատրանսֆերազների իմոբիլիզացման արդյունքները բերված են աղ. 1-ում:

Աղյուսակ 1. PAT1, PAT2 և PAT3 ամինատրանսֆերազների իմոբիլիզացման արդյունքները:

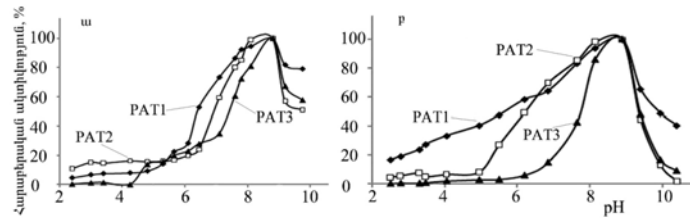
Ֆերմենտային պրեպարատ	Տեսակարար ակտիվություն, միավոր/գրամկատ	Իմոբիլիզացված* կենսակատալիզատորի ակտիվություն, %
PAT1	1,89	22,7
PAT2	0,63	36,1
PAT3	0,92	13,6

* Սյունյակում բերված է իմոբիլիզացումից հետո կրիչի վրա կարված ֆերմենտային պատրաստուկի մնացորդային ակտիվությունը:



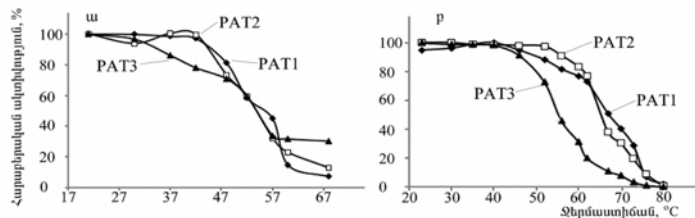
Նկ. 2. *E. carotovora*-ի PAT1, PAT2 և PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների (ա) և ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների (բ*) ջերմաստիճանային օպտիմումները:
* Արդյունքները բերված են [4] աշխատանքից:

Նկ. 2-ում բերված են PAT1, PAT2 և PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների և ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների ջերմաստիճանային օպտիմումների որոշման արդյունքները: Բնչապես երևում է նկարից, PAT1 և PAT2 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների ջերմաստիճանային օպտիմումները բարձրացել են 5-10°C-ով, այն դեպքում երբ PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի ջերմաստիճանային օպտիմումը գրեթե չի փոխվել (նկ. 2) [4]: Նմանատիպ պատկեր դիտվել է նաև թիրոզին ֆենոլ լիազի սիլոբրոմ C-80-ի վրա իմոբիլիզացման արդյունքում [3]: Նկարից նաև երևում է, որ ի տարբերություն ազատ ֆերմենտի PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի ինակտիվացումը բարձր ջերմաստիճանում տեղի է ունենում ավելի դանդաղ:



Նկ. 3. *E. carotovora*-ի PAT1, PAT2 և PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների (ա) և ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների (բ*) pH օպտիմումները:
*Արդյունքները բերված են [4] աշխատանքից

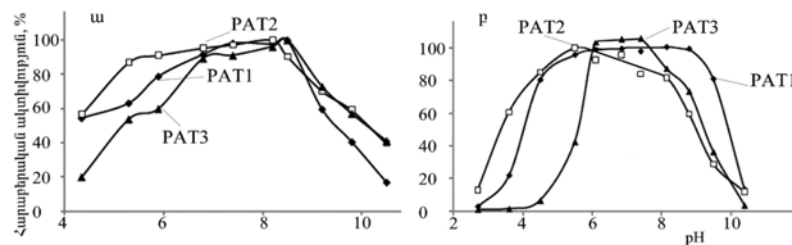
Նկ. 3-ում բերված են PAT1, PAT2 և PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների և ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների pH օպտիմումների որոշման արդյունքները: Բնչապես երևում է ստացված արդյունքների համեմատումից, PAT1, PAT2 և PAT3 ֆերմենտային պատրաստուկների pH օպտիմումները իմոբիլիզացման արդյունքում գրեթե չեն փոխվել: Օպտիմալ pH արժեքը ազատ և իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների համար գտնվում է 8,5-9 տիրույթում: Նմանատիպ պատկեր դիտվում է նաև L-ֆենիլալանին ամոնիակ լիազի սիլոբրոմ C-80-ի վրա իմոբիլիզացման արդյունքում [2]:



Նկ. 4. *E. carotovora*-ի PAT1, PAT2 և PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների (ա) և ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների (բ) ջերմակայունությունը

Նկ. 4-ում բերված են ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների և իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների ջերմակայունության որոշման արդյունքները: Ինչպես երևում է նկ. 4բ-ից, նշված ջերմաստիճաններում 30 ր ինկուբացումից հետո արոմատիկ ամինատրանսֆերազները (PAT1 և PAT2) ակտիվության 50 %-ը կորցնում են 65°C, իսկ ասպարտատ ամինատրանսֆերազը (PAT3)՝ 55°C ջերմաստիճանում: Իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորները նշված ջերմաստիճաններում 30 րոպե ինկուբացումից հետո իրենց ակտիվության կեսը կորցնում են 52-55°C ջերմաստիճանում (նկ. 4ա): Արդյունքների համեմատությունից երևում է, որ PAT1 և PAT2 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորները ավելի ջերմազգայուն են դարձել ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների հետ համեմատած, իսկ PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի ջերմակայունության փոփոխություն չի դիտվել:

Մինչդեռ *Rhodospiridium toruloides* շտամի L-ֆենիլալանին-ամոնիակ-լիազի իմոբիլիզացման արդյունքում դիտվում է հակառակ գործընթացը՝ իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորը իր ջերմակայունությամբ գերազանցում է ազատ ֆերմենտին [2]: Համեմատության համար նշենք, որ *Bacillus subtilis* շտամից անջատած արոմատիկ ամինատրանսֆերազը 55°C ջերմաստիճանում 10 րոպե ինկուբացումից հետո պահպանում է ակտիվության միայն 10 %-ը [19]: Միևնույն ժամանակ հայտնի է *Bacillus species* շտամից անջատած ասպարտատ ամինատրանսֆերազ, որը բավականին կայուն է բարձր ջերմաստիճանի նկատմամբ: 80°C ջերմաստիճանում 20 ր ինկուբացումից հետո պահպանվում է այս ֆերմենտի ակտիվության 65 %-ը [18]:



Նկ. 5. *E. carotovora*-ի PAT1, PAT2 և PAT3 իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների (ա) և ազատ ֆերմենտային պատրաստուկների (բ) ջերմակայունության կախվածությունը pH-ից

Նկ. 5-ում բերված են ազատ ֆերմենտային պրեպարատների և իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորների pH-ից կախված ջերմակայունության որոշման արդյունքները: Ինչպես երևում է նկ. 5բ-ից, PAT1 և PAT2 ֆերմենտային պատրաստուկները 65°C ջերմաստիճանում տարբեր pH-ում 30 րոպե ինկուբացնելիս կայուն են pH-ի բավականին լայն տիրույթներում, համապատասխանաբար՝ pH 4-10 և 4-8,5, իսկ PAT3 ֆերմենտային պրեպարատը՝ 55°C ջերմաստիճանում տարբեր pH-ում 30 րոպե ինկուբացնելիս կայուն է pH-ի 6-8,5 տիրույթում: Նկ. 5ա-ից երևում է, որ իմոբիլիզացման արդյունքում արոմատիկ ամինատրանսֆերազների (PAT1 և PAT2) pH-ից կախված ջերմակայունությունը գրեթե չի փոխվում, իսկ իմոբիլիզացված ասպարտատ ամինատրանսֆերազը (PAT3) ի տարբերություն ազատ ֆերմենտային պրեպարատի ջերմակայուն է դառնում pH-ի 5-9,4 տիրույթում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Պալոյան Ա., Դուրկովա Գ., Պապոյան Ա., Աղաջանյան Ա., Համբարձումյան Ա., Հալեբյան Ղ. L-ֆենիլալանինի ստացման եղանակ ՀՀ Արտոնագիր 2479A, C12P 13/00, 2011:
2. Бабич О.О., Солдатова Л.С. Изучение свойств свободной и иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы из *Rhodospiridium toruloides* на силохроме с-80. Вопросы общей биологии, 1, с. 279-282, 2012.
3. Дюкова, К. Г., Амбарцумян, А.А., Алебян Г.П., Ковалентная иммобилизация очищенной тирозин фенол-лиазы из *Citrobacter freundii* на неорганических носителях. Биотехнология, 2, с. 58-65, 2011.

4. Палоян А.М., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П. Выделение, очистка и характеристика ферментов *Erwinia carotovora*, трансминерирующих фенилпируват. Биохимия, 1, с. 123–129, 2012.
5. Abou-Zeid A., Euverink G.J.W., Hessels G.I., Jensen R.A. and Dijkhuizen L. Biosynthesis of l-phenylalanine and l-tyrosine in the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. Appl. Environ. Microbiol., 61, p. 1298–1302, 1995.
6. Andreotti G., Cubellis M.V., Nitti G., Sannia G., Mai X., Marino G. and Adams M.W.W. Characterization of aromatic aminotransferases from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. Eur. J. Biochem., 220, p. 543–549, 1994.
7. Araki K., Ozeki T., Ito Y., Ishino Sh., Anazawa H., Kamimori Sh., Process for producing L-phenylalanine. US Patent, 4,783, 403, 1988.
8. Izumi Y., Chibata I. and Itoh T. Production and utilization of amino acids. Angew. Chem., 90, p. 187–194, 1978.
9. Lee C., and Desmazeaud M.J. Evaluation of the contribution of the tyrosine pathway to the catabolism of phenylalanine in *Brevibacterium linens* 47. J. Gen. Microbiol., 131, p. 459–467, 1985.
10. Leng Y., Zheng P., Sun Z.-H. Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli* SW0209-52. Process of Biochemistry, 41, p. 1669–1672, 2006.
11. Lopez C., Rios S.D., Lopez-Santin J., Caminal G. and Alvaro G., Immobilization of PLP-dependent enzymes with cofactor retention and enhanced stability. Biochemical Engineering Journal, 49, p. 414–421, 2010.
12. Mavrides C., and Orr W. Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 250, p. 4128–4133, 1975.
13. Nakamichi K., Mishida Y., Nabe K., and Tosa T. Production of L-phenylalanine from acetamidocinnamic acid using *Bacillus sphaericus* and *Paracoccus denitrificans*. Applied biochemistry and biotechnology, 11, p. 367–376, 1985.
14. Nishida Y., Nakamichi K., Nabe K., Tosa T. Continuous production of L-phenylalanine from acetamidocinnamic acid using co-immobilized cells of *Corynebacterium* sp. and *Paracoccus denitrificans*. Enzyme and Microbial Technology, 9, p. 479–483, 1987.
15. Paris C.G. and Magasanik B. Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferase from *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol., 145, p. 266–271, 1981.
16. Peterson, G. Determination of total protein. Meth. Enzymol., 91, p. 95–119, 1983.
17. Robinson, P.J. Porous glass as a solid support for immobilization or affinity chromatography of enzymes. Biophys. Acta., 242, p. 659–661, 1971.
18. Sung M., Tanizawa K., Tanaka H., Kuramitsu S., Kagamiyama H., and Soda K. Purification and characterization of thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. J. Bacteriol., 172, p. 1345–1351, 1990.
19. Weigent D.A., and Nester E.W. Purification and properties of two aromatic aminotransferases in *Bacillus subtilis*. J. Biochem., 251, p. 6974–6980, 1976.
20. Whitaker R.J., Gaines C.G., and Jensen R.A. A multispecific quintet of aromatic aminotransferases that overlap different biochemical pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., 257, p. 13550–13556, 1982.

Մագիլ է 18.06.2012