

УДК 577.152.2

## КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ *Erwinia carotovora*, ТРАНСАМИНИРУЮЩИХ ФЕНИЛПИРУВАТ

© 2013 г. А. М. Палоян, Л. А. Степанян, С. А. Дадаян, А. А. Амбарцумян,  
Г. П. Алебян, А. С. Сагиян

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Ереван 0056, Армения

e-mail: anipaloyan@yahoo.com, armbiotech@gmail.com

Поступила в редакцию 7.08.2012 г.

Рассчитаны  $K_m$  для L-фенилаланина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и соответствующих кетокислот, а также  $V_{max}$  для пар субстратов: L-фенилаланин – 2-кетоглутарат, L-фенилаланин – оксалоацетат, L-глутаминовая кислота – фенилпируват и L-аспарагиновая кислота – фенилпируват для аминотрансфераз PAT1, PAT2 и PAT3 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ИНМИА № 8724, катализирующих переаминирование фенилпирувата. Аминотрансфераза PAT3 ингибировалась 2-кетоглутаратом ( $K_s = 10.23 \pm 3.20$  мМ) и оксалоацетатом ( $K_s = 3.73 \pm 1.99$  мМ). Конкурентным ингибитором PAT1 являлся L-β-(N-бензиламино)аланин при использовании в качестве субстрата L-фенилаланина ( $K_i = 0.32 \pm 0.07$  мМ,  $K_m = 0.45 \pm 0.1$  мМ,  $V_{max} = 11.6 \pm 0.4$  ед./мг) при концентрации 2-кетоглутарата в реакционной среде 25 мМ. L-β-(N-метиламино)аланин – бесконкурентный ингибитор для PAT3 при той же паре субстратов ( $K_i = 138.4 \pm 95.4$  мМ,  $K_m = 13.7 \pm 3.9$  мМ,  $V_{max} = 18.6 \pm 4.1$  ед./мг) и концентрации 2-кетоглутарата 2 мМ в реакционной среде.

Исследованы L-стереоизомеры некоторых небелковых аналогов ароматических аминокислот в качестве субстратов для PAT1, PAT2 и PAT3.

DOI: 10.7868/S055510991302013X

С тех пор, как в 1937 г. А.Е. Браунштейн и М.Г. Крицман [1] открыли реакцию трансаминирования, выделено, очищено и изучено множество аминотрансфераз. Аминотрансферазы – пиридоксальфосфат-зависимые ферменты [КФ 2.6.1] и катализируют обратимую реакцию трансаминирования, в которой происходит перенос альфа-аминогруппы с аминокислоты на 2-кетокислоту с образованием кетокислоты и аминокислоты по механизму пинг-понг-би-би.

Исследуемые в данной работе аспартат- и ароматические аминотрансферазы, хорошо изучены у *Escherichia coli* [2–5], *Bacillus subtilis* [6, 7], *Bacillus* sp. [8], коринеформных бактерий [9, 10], представителей рода *Pseudomonas* [11, 12], *Klebsiella aerogenes* [13], актиномицета *Amicycolatopsis methanolicus* [14], лактококка *Lactococcus lactis* [15], архебактерий [16], гипертермофильных архебактерий *Thermococcus litoralis* [17], *Pyrococcus horikoshii* [18] и *Pyrococcus furiosus* [19].

Реакции, катализируемые аминотрансферазами, участвуют в биосинтезе различных аминокислот у многих микроорганизмов и вызывают повышенный интерес исследователей возможностью осуществления аналогичных процессов в прикладных целях для синтеза ароматических аминокислот из их синтетических предшественников. Практический интерес представляет способ получения L-фенилаланина. Реакция может осуществ-

ляться как в живых клетках микроорганизмов, так и иммобилизованными клетками и ферментами аспартат и/или ароматическими аминотрансферазами [20–22].

Ранее нами был разработан способ получения L-фенилаланина из фенилпируватной кислоты с применением аминотрансфераз *Erwinia carotovora* [23]. Также нами были выделены, очищены и охарактеризованы ферменты *E. carotovora*, трансаминирующие фенилпируват [24].

Цель работы – изучение каталитических свойств и субстратной специфичности ферментов *E. carotovora*, трансаминирующих фенилпируват.

### МЕТОДИКА

В работе были использованы аминотрансферазы PAT1 (phenylalanine transaminase 1), PAT2 и PAT3 *E. carotovora* способ выделения и очистки которых описан [24]. В работе было выдвинуто предположение, что PAT1 и PAT2 являются ароматическими аминотрансферазами а PAT3 – аспартат-аминотрансферазой.

Все кинетические исследования проводились в реакционной среде объемом 200 мкл, содержащей: аминокислоты и кетокислоты, (концентрации указаны ниже), 0.05 мМ пиридоксальфосфат (ПДФ), 0.1 М трис-НСl буфер, рН 8.5, и ферментный препарат в необходимом количестве. Скоро-

сти реакций определяли по накоплению продуктов-кетокислот – фенилпирувата, 2-кетоглутарата или оксалоацетата. Концентрацию фенилпирувата определяли, измеряя оптическое поглощение в присутствии 1.0 М NaOH ( $\epsilon_{320} = 17\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) [3]. Концентрацию 2-кетоглутарата и оксалоацетата рассчитывали по окислению НАДН ( $\epsilon_{320} = 6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) в присутствии глутаматдегидрогеназы или малатдегидрогеназы соответственно. Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса [25].

Для реакций с обычным механизмом пинг-понг би-би значения кажущихся констант Михаэлиса –  $K_{m1}$  и  $K_{m2}$  и максимальной скорости реакции –  $V_{max}$  определяли из уравнения (1) [26], измеряя активности ферментов в реакционной среде с 16 сочетаниями концентраций аминокислоты (1.0, 2.5, 3.75, 10.0 мМ) и кетокислоты (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 мМ). Кинетические параметры реакций аминотрансфераз РАТ1, РАТ2 и РАТ3 исследовали для пар субстратов: L-фенилаланин – оксалоацетат, L-фенилаланин – 2-кетоглутарат, L-аспарагиновая кислота – фенилпируват и L-глутаминовая кислота – фенилпируват, за исключением реакций, катализируемых РАТ3, в которых наблюдалось субстратное ингибирование (пары субстратов L-фенилаланин – оксалоацетат, L-фенилаланин – 2-кетоглутарат).

$$v = \frac{V_{max}S_1S_2}{K_{m1}S_1 + K_{m2}S_2 + S_1S_2} \quad (1)$$

Где:  $v$  – скорость реакции,  $S_1$  и  $S_2$  – концентрации аминокислоты и кетокислоты, соответственно,  $K_{m1}$  и  $K_{m2}$  – константы Михаэлиса для аминокислоты и кетокислоты, соответственно.

В случаях субстратного ингибирования (ингибирование РАТ3 2-кетоглутаратом и оксалоацетатом)  $K_m$  для фенилаланина определяли из простого уравнения Михаэлиса–Ментен при концентрациях L-фенилаланина – 1.0; 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 40.0 и 50.0 мМ и максимальной неингибирующей концентрации кетокислоты (2-кетоглутарат – 2.0 и оксалоацетат – 2.0 мМ). При субстратном ингибировании  $K_m$  и  $K_s$  (коэффициент субстратного ингибирования) для кетокислот определяли из уравнения (2) [26] при концентрациях кетокислот – 0.25, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, и 12.5 мМ и концентрации L-фенилаланина – 50.0 мМ.

$$v = \frac{SV_{max}}{K_m + S + \frac{S^2}{K_s}} \quad (2)$$

Для выявления ингибирующего действия L-β-(N-бензиламино)аланина и L-β-(N-метиламино)аланина активность ферментов измеряли при наличии в реакционной среде 10 мМ L-фенилала-

нина, 5.0 мМ 2-кетоглутарата и 5.0 мМ тестируемой небелковой аминокислоты при рН 8.5.

При изучении механизма ингибирования РАТ1 L-β-(N-бензиламино)аланином  $K_m$ ,  $K_I$  и  $V_{max}$  определяли из уравнения конкурентного ингибирования (3) [26], измеряя активность фермента при сочетании 16 различных концентраций L-фенилаланина (1.0, 2.5, 3.75, 10.0 мМ) и L-β-(N-бензиламино)аланина (0, 0.625, 2.5, 6.25 мМ) при наличии в реакционной среде 10 мМ 2-кетоглутарата.

$$v = \frac{V_{max}}{K_m + \frac{K_m I}{K_I} + S} \quad (3)$$

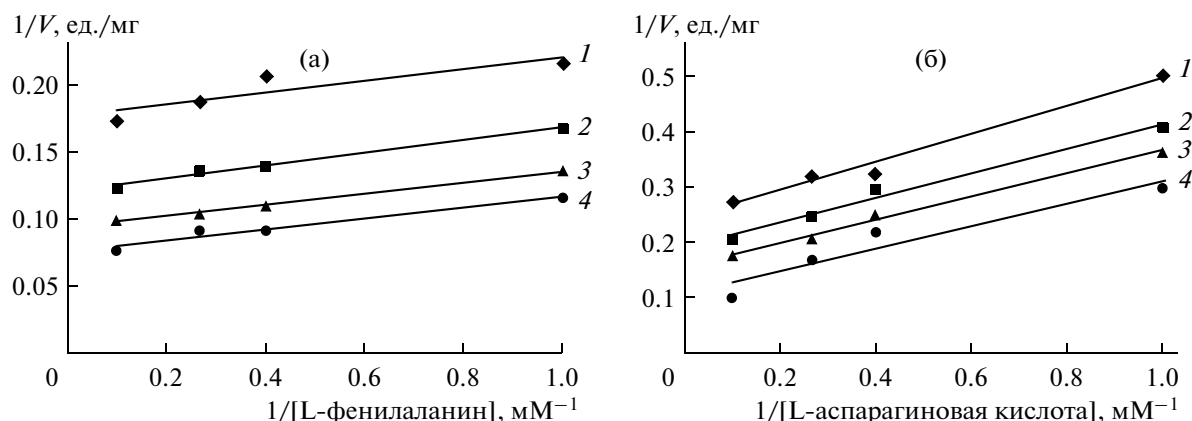
При изучении механизма ингибирования РАТ3 L-β-(N-метиламино)аланином  $K_m$ ,  $K_I$  и  $V_{max}$  определяли из уравнения бесконкурентного ингибирования (4) [26], выведенного нами по алгоритму, описанному у Кинга и Альтмана [27], измеряя активность фермента при 16 различных сочетаниях концентраций L-фенилаланина (8.0, 20.0, 30.0, 80.0 мМ) и L-β-(N-метиламино)аланина (0, 2.5, 10.0, 25.0 мМ) при наличии в реакционной среде 2.0 мМ 2-кетоглутарата.

$$v = \frac{V_{max}S}{K_m + S + \frac{SI}{K_I}} \quad (4)$$

Во всех приведенных выше кинетических исследованиях полученные результаты анализировали графически для выявления механизмов реакций [26]. Далее значения соответствующих кинетических параметров и их стандартные ошибки рассчитывали методом многомерного линейного регрессионного анализа с использованием разработанных нами программ на языке Gauss 4.0.

Субстратную специфичность РАТ1, РАТ2 и РАТ3 *E. carotovora* при использовании в качестве субстратов вновь синтезированных небелковых аминокислот определяли при концентрации доноров аминокислот 25.0 мМ, а в качестве акцептора аминокислот использовали 25.0 мМ 2-кетоглутаровую кислоту (2.0 мМ для РАТ3). Активность ферментов определяли по скорости накопления L-глутаминовой кислоты. Концентрацию L-глутаминовой кислоты определяли качественно – методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках “Silufol” (Чехия) [28] и количественно – с помощью глутаматдегидрогеназы по восстановлению НАД в трис-гидразиновом буфере.

В работе использовали следующие материалы и реактивы: трис, ПЛФ, НАДН, НАД, глутаматдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, 2-кетоглутаровая кислота и оксалоацетат фирмы “Serva” (Германия); L-β-(2-Br-фенил)аланин, L-β-(4-Br-фенил)аланин, L-α-метил-β-(2-Br-фенил)аланин, L-β-гидрокси-β-(3-Br-2-метоксифенил)аланин, L-α-метил-



**Рис. 1.** Зависимость скорости реакции от концентраций субстратов аминотрансферазы *E. carotovora* в координатах Лайнуивера–Берка. а – концентрации оксалоацетата: 1 – 0.5, 2 – 1.0, 3 – 2.0, 4 – 5.0 мМ; б – концентрации фенилпирувата: 1 – 0.5, 2 – 1.0, 3 – 2.0, 4 – 5.0 мМ.

фенилаланин, L-β-(2-F-фенил)аланин, L-β-(4-F-фенил)аланин, L-α-F-фенилаланин, L-O-бензил-тирозин, L-β-(N-бензиламино)аланин, L-β-(N-метиламино)аланин, L-O-бензил-α-метил-тирозин, L-(2-F)-триптофан синтезированы в НПЦ “Армбиотехнология”, остальные реактивы произведены в странах СНГ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ кинетических параметров ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) аминотрансфераз РАТ1, РАТ2 и РАТ3 *E. carotovora* [25], участвующих в переаминировании фенилпирувата. Реакции переаминирования исследовались для пар субстратов: L-фенилаланин – 2-кетоглутарат, L-фенилаланин – оксалоацетат, L-аспарагиновая кислота – фенилпируват и L-глутаминовая кислота – фенилпируват. Для РАТ1 и РАТ2 зависимость скоростей реакций от концентрации варьируемого субстрата при постоянном значении косубстрата в координатах Лайнуивера–Берка представлены параллельными прямыми линиями для различных значений косубстрата, что указывает на протекание реакции по механизму типа пинг-понг би-би, как и в случае других аминотрансфераз [29, 30]. Типичные результаты для аминотрансферазы РАТ1 в случае пар субстратов L-фенилаланин – оксалоацетат и L-аспарагиновая кислота – фенилпируват представлены на рис. 1.

Значения  $K_m$  и  $V_{max}$  для аминотрансфераз РАТ1 и РАТ2, рассчитанные многомерным линейным регрессионным анализом с применением программного пакета Gauss 4.0, приведены в табл. 1 и 2 соответственно.

При исследовании стационарной кинетики аминотрансферазы РАТ3 *E. carotovora* для пар субстратов L-аспарагиновая кислота – фенилпируват и L-глутаминовая кислота – фенилпируват также наблюдался механизм реакции типа пинг-понг-би-би, свойственный аминотрансферазам. Для этих пар субстратов параметры стационарной кинетики рассчитывали аналогично вышеприведенным результатам (табл. 3). Однако в случае пар субстратов L-фенилаланин – 2-кетоглутарат и L-фенилаланин – оксалоацетат наблюдалось субстратное ингибирование фермента соответствующими кетокислотами. Результаты исследований ингибирования РАТ3 представлены на рис. 2 и в табл. 3.

Различия в значениях  $V_{max}$  для аминотрансферазы РАТ3 в реакциях дезаминирования L-фенилаланина (табл. 3) объясняются тем, что расчет  $V_{max}$  при лимитирующих концентрациях кетокислоты дает пониженные значения исследуемого параметра, тогда как расчет  $V_{max}$  из уравнения субстратного ингибирования при насыщающих концентрациях аминокислоты является истинным зна-

**Таблица 1.**  $K_m$  и  $V_{max}$  для некоторых пар субстратов аминотрансферазы РАТ1 *E. carotovora*

Аминокислота	Кетокислота	$K_m$ аминокислоты, мМ	$K_m$ кето-кислоты, мМ	$V_{max}$ , ед./мг
L-фенилаланин	2-кетоглутарат	$1.15 \pm 0.27$	$2.84 \pm 0.43$	$12.21 \pm 1.27$
L-фенилаланин	Оксалоацетат	$0.71 \pm 0.08$	$0.83 \pm 0.08$	$15.06 \pm 0.66$
L-глутаминовая кислота	Фенилпируват	$3.07 \pm 1.33$	$0.75 \pm 0.44$	$12.69 \pm 3.60$
L-аспарагиновая кислота	Фенилпируват	$4.34 \pm 0.95$	$1.25 \pm 0.33$	$15.10 \pm 2.37$

**Таблица 2.**  $K_m$  и  $V_{max}$  для некоторых пар субстратов аминотрансферазы PAT2 *E. carotovora*

Аминокислота	Кетокислота	$K_m$ аминокислоты, мМ	$K_m$ кетокислоты, мМ	$V_{max}$ , ед./мг
L-фенилаланин	2-кетоглутарат	$1.34 \pm 0.44$	$1.31 \pm 0.37$	$4.05 \pm 0.67$
L-фенилаланин	Оксалоацетат	$0.53 \pm 0.07$	$0.50 \pm 0.06$	$8.34 \pm 0.39$
L-глутаминовая кислота	Фенилпируват	$3.56 \pm 0.71$	$0.97 \pm 0.28$	$5.93 \pm 0.85$
L-аспарагиновая кислота	Фенилпируват	$1.85 \pm 0.50$	$0.56 \pm 0.22$	$6.29 \pm 1.01$

**Таблица 3.** Параметры стационарной кинетики для некоторых пар субстратов аминотрансферазы PAT3 *E. carotovora*

Аминокислота	Кетокислота	$K_m$ аминокислоты, мМ	$K_m$ кетокислоты, мМ	$K_S$ кетокислоты, мМ	$V_{max}$ , ед./мг	$V_{max}$ , ед./мг
L-фенилаланин	2-кетоглутарат	$11.72 \pm 2.74^*$	$0.42 \pm 0.18^{**}$	$10.23 \pm 3.20^{**}$	$13.79 \pm 1.11^*$	$22.01 \pm 3.02^{**}$
L-фенилаланин	Оксалоацетат	$13.83 \pm 5.64^*$	$0.71 \pm 0.54^{**}$	$3.73 \pm 1.99^{**}$	$18.69 \pm 2.91^*$	$30.68 \pm 10.7^{**}$
L-глутаминовая кислота	Фенилпируват	$7.08 \pm 2.15$	$5.54 \pm 1.68$			$61.92 \pm 15.2$
L-аспарагиновая кислота	Фенилпируват	$0.67 \pm 0.51$	$3.11 \pm 1.00$			$13.26 \pm 2.94$

\* Данные рассчитаны по простой кинетике Михаэлиса–Ментен при наивысших неингибирующих концентрациях кетокислоты.

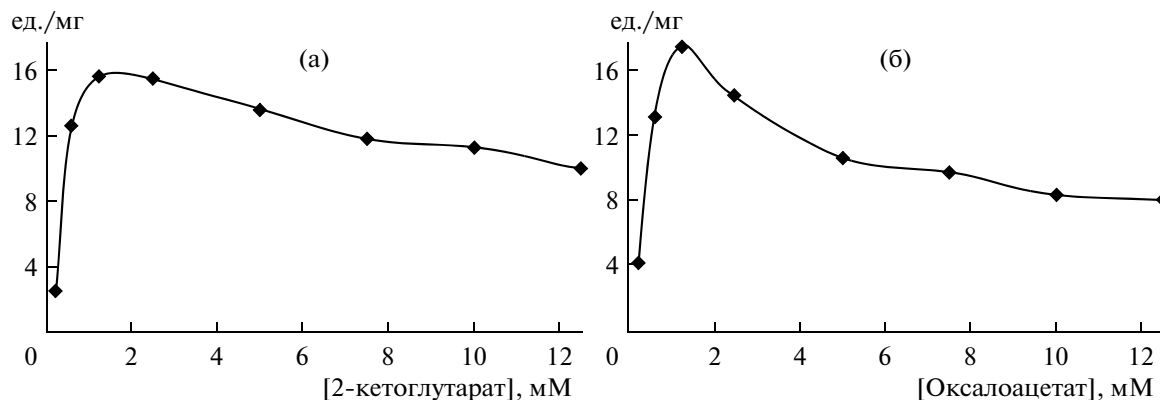
\*\* Данные рассчитаны по кинетике субстратного ингибирования при насыщающих концентрациях аминокислоты.

чением максимальной скорости ферментативной реакции.

Нами было изучено влияние L- $\beta$ -(N-бензил-амино)аланина и L- $\beta$ -(N-метиламино)аланина на скорость реакции трансминирования, катализируемой аминотрансферазами *E. carotovora*. L- $\beta$ -(N-бензиламино)аланин с  $[I]_{50} = 3.92$  мМ и L- $\beta$ -(N-метиламино)аланин с  $[I]_{50}$  более 5.0 мМ проявляли ингибирующее действие на аминотрансферазы PAT1 и PAT3, соответственно. Механизм ингибирования PAT1 L- $\beta$ -(N-бензиламино)аланином и PAT3 L- $\beta$ -(N-метиламино)аланином был изучен более детально. Результаты изучения ингибирования PAT1 L- $\beta$ -(N-бензил-

амино)аланином при насыщающей концентрации кетокислоты 10 мМ представлены на рис. 3.

Из рис. 3а следует, что кривые зависимости  $1/V$  от  $I$  (концентрация ингибитора) представляют прямые линии, пересекающиеся в верхнем левом квадранте координатной плоскости. Одновременно из рис. 3б следует, что кривые зависимости  $S/V$  от  $I$  представляют параллельные прямые линии. В целом результаты графического анализа указывают на конкурентный тип ингибирования PAT1 L- $\beta$ -(N-бензиламино)аланином. Кинетические параметры ингибирования ( $K_I$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ) рассчитывали методом многомерной линейной регрессии. Были получены следующие значения па-

**Рис. 2.** Зависимость скорости реакции аминирования 2-кетоглутарата (а) и оксалоацетата (б) аминотрансферазой PAT3 *E. carotovora* от концентрации субстратов.

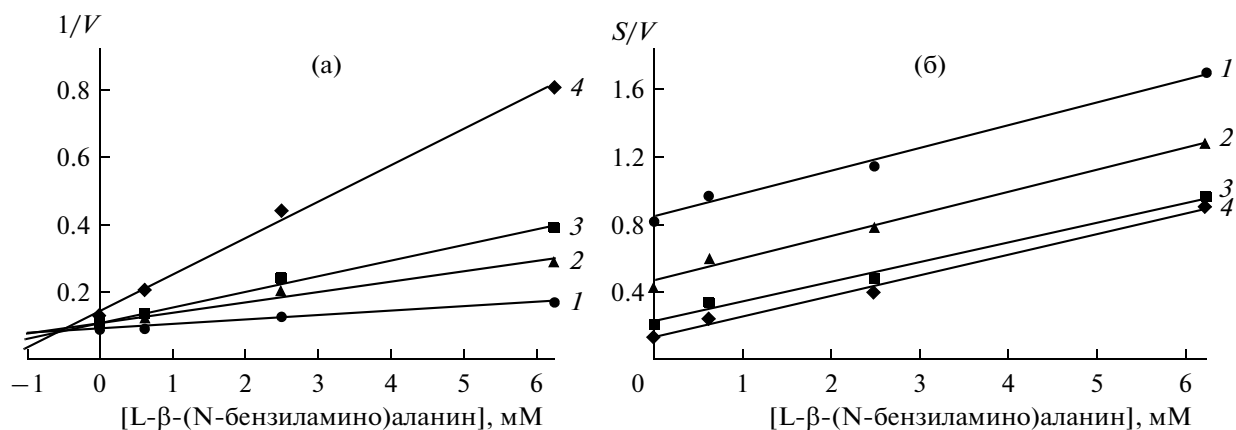


Рис. 3. Зависимость  $1/V$  (а) и  $S/V$  (б) от концентрации L- $\beta$ -(N-бензиламино)аланина при концентрациях L-фенилаланина: 1 – 10.0, 2 – 3.75, 3 – 2.5, 4 – 1.0 мМ.

раметров:  $K_1 = 0.32 \pm 0.07$  мМ,  $K_m = 0.45 \pm 0.1$  мМ,  $V_{max} = 11.6 \pm 0.4$  ед./мг.

Аналогичным образом при концентрациях кетокислоты 2.0 мМ ПАТ3 бесконкурентно ингибировалась L- $\beta$ -(N-метиламино)аланином (конкуренцию рассматривали по отношению к L-фенилаланину). Были получены следующие значения параметров:  $K_1 = 138.4 \pm 95.4$  мМ,  $K_m = 13.7 \pm 3.9$  мМ,  $V_{max} = 18.6 \pm 4.1$  ед./мг.

Результаты исследования субстратной специфичности ферментов в реакциях аминирования 2-кетоглутарата приведены в табл. 4. В качестве доноров аминной группы были проверены следующие небелковые аминокислоты: L- $\beta$ -(2-Вг-фенил)аланин, L- $\beta$ -(4-Вг-фенил)аланин, L- $\alpha$ -метил- $\beta$ -(2-Вг-фенил)аланин, L-гидрокси- $\beta$ -(3-Вг-4-метоксифенил)аланин, L- $\alpha$ -метил-фенилаланин, L- $\beta$ -(2-F-фенил)аланин, L- $\beta$ -(4-F-фенил)аланин, L- $\alpha$ -F-фенилаланин, L-O-бензил-тирозин, L-O-бензил- $\alpha$ -метил-тирозин, L-2-F-триптофан. В табл. 4 приведены данные только для тех небелковых аминокислот, которые были донорами аминной группы.

Изучена аффинность субстратов — L-фенилаланина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, фенилпирувата, 2-кетоглутарата и оксалоацетата к аминотрансферазам ПАТ1, ПАТ2 и ПАТ3 *E. carotovora*, участвующим в переаминировании фенилпирувата. Исследования показали близость значений соответствующих констант Михаэлиса для ароматических аминотрансфераз ПАТ1 и ПАТ2. Причем у обоих ферментов значения  $K_m$  для L-фенилаланина и для фенилпирувата, измеренные в присутствии различных пар ко-субстратов, совпадали в пределах ошибки эксперимента. Аспаратаминотрансфераза ПАТ3 отличается от ароматических аминотрансфераз *E. carotovora* как высоким значением  $K_m$  для L-фенилаланина ( $11.72 \pm 2.74$  мМ и  $13.83 \pm 5.64$  мМ

для разных пар ко-субстратов), так и субстратным ингибированием — 2-кетоглутаратом ( $K_s = 10.23 \pm 3.20$  мМ) и оксалоацетатом ( $K_s = 3.73 \pm 1.99$  мМ). Для ПАТ3 значения  $K_m$  для L-фенилаланина и для фенилпирувата, измеренные в присутствии различных пар ко-субстратов, совпадали в пределах ошибки эксперимента.

В табл. 5 обобщены результаты сравнения  $K_m$  для указанных субстратов ароматических и аспаратаминотрансфераз, выделенных из различных организмов.

Из приведенных данных следует, что у одних и тех же организмов L-фенилаланин, L-глутаминовая кислота и фенилпируват проявляли более высокую аффинность к ароматическим аминотрансферазам, а L-аспарагиновая кислота, оксалоацетат и 2-кетоглутарат проявляют более высокую аффинность к аспаратаминотрансфе-

Таблица 4. Субстратная специфичность ферментов *E. carotovora*, трансминирующих фенилпируват, с 2-кетоглутаровой кислотой в качестве акцептора аминокислотной группы

Субстрат	Удельная активность, ед./мг		
	ПАТ1	ПАТ2	ПАТ3
L- $\beta$ -фенилаланин	12.0	4.0	13.5
L- $\beta$ -(2-Вг-фенил)аланин	5.7	4.7	12.6
L- $\beta$ -(4-Вг-фенил)аланин	7.0	4.8	29.0
L- $\alpha$ -метил- $\beta$ -(2-Вг-фенил)аланин	0.0	0.0	4.7
L- $\beta$ -(2-F-фенил)аланин	6.3	8.9	14.6
L- $\beta$ -(4-F-фенил)аланин	5.0	0.6	4.7
L-O-бензил-тирозин	0.0	0.0	5.9
L-2-F-триптофан	7.1	4.7	15.1

**Таблица 5.** Сравнение  $K_m$  некоторых субстратов ароматических и аспартат-аминотрансфераз *E. carotovora* и других организмов

Штамм	Тип аминотрансферазы	$K_m$ , мМ						Источник литературы
		L-Фенилаланин	L-Глутаминовая кислота	L-Аспарагиновая кислота	Фенилпируват	2-Кетоглутарат	Оксалоацетат	
<i>E. carotovora</i>	Аром.* (РАТ1)	0.9	3.1	4.3	1.0	2.8	0.8	Данная работа
	Аром. (РАТ2)	0.9	3.4	1.9	0.8	1.3	0.5	
	Асп.** (РАТ3)	12.8	7.1	0.7	4.3	0.4	0.7	
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Аром.	3.3	—	—	—	2.5	3.1	[3]
	Асп.	2.2	—	4.4	—	0.1	0.4	
<i>E. coli</i> K12	Аром.	0.1	0.3	5.0	0.1	0.2	3.8	[5]
	Асп.	0.6	0.9	0.5	0.7	0.2	0.6	
<i>B. subtilis</i>	Аром.	9.8	—	—	—	38.0	—	[6]
<i>K. aerogenes</i> W-70	Аром.	83.0	—	—	1.6	<0.1	<0.1	[13]
<i>B. linens</i>	Аром.	1.3	—	8.4	—	—	—	[10]
	Асп.	6.2	—	3.8	—	—	—	
<i>M. aeolicus</i>	Аром. (ArAT-I)	0.4	—	—	—	0.6	—	[16]
	Аром. II)	1.2	—	—	—	0.6	—	
	Асп.	—	—	3.7	—	0.5	—	
<i>T. cruzi</i> Tul 0	Аром.	20.1	—	—	—	38.7	19.2	[31]
<i>P. furiosus</i>	Аром.	1.3	—	—	—	0.9	—	[19]
	Асп.	—	—	4.2	—	0.5	—	

\* Аром. — ароматическая аминотрансфераза.

\*\* Асп. — аспартаминотрансфераза.

разе. Примечательны низкие аффинности L-фенилаланина и оксалоацетата по отношению к ароматическим аминотрансферазам *B. subtilis* и *T. cruzi*, а также низкая аффинность L-фенилаланина к ароматической аминотрансферазе *K. aerogenes*.

Интересен факт субстратного ингибирования аспартаминотрансферазы *E. carotovora* оксалоацетатом и 2-кетоглутаратом с  $K_S$   $3.73 \pm 1.99$  мМ и  $10.23 \pm 3.20$  мМ соответственно. Ингибирование аспартаминотрансферазы 2-кетоглутаратом наблюдалось также у *Methanococcus aeolicus* [16].

Что же касается влияния L-β-(N-бензиламино)аланина и L-β-(N-метиламино)аланина на аминотрансферазы, то следует отметить, что они оказывали схожее ингибирующее действие на аминотрансферазы, выделенные из *Citrobacter freundii* [32].

Активность РАТ1, РАТ2 и РАТ3 *E. carotovora* исследовалась в реакциях переаминирования 2-кетоглутарата некоторыми аналогами L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана. L-β-(2-Вг-фенил)аланин, L-β-(4-Вг-фенил)аланин, L-β-(2-

F-фенил)аланин и L-2-F-триптофан оказались хорошими субстратами для всех трех аминотрансфераз, L-α-метил-β-(2-Вг-фенил)аланин и L-О-бензил-тирозин являлись субстратами только для РАТ3, а L-β-(4-F-фенил)аланин был субстратом для РАТ1 и РАТ3. Ранее была показана субстратная специфичность ароматической аминотрансферазы *Pseudomonas putida* к рацематам (4-F-фенил)аланина, (2-F-фенил)аланина и (4-Вг-фенил)аланина [14]. Следовательно, указанные аналоги ароматических аминокислот могут быть стереоселективно синтезированы с применением указанных аминотрансфераз при наличии соответствующих кетокислот.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Браунштейн А.Е., Крицман М.Г. // Энцимология. 1937. Т. 2. С. 129–137.
2. Collier R.H., Kohlhaw G. // J. Bacteriology. 1972. V. 112. № 1. P. 365–371.

3. Mavrides C., Orr W. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 11. P. 4128–4133.
4. Gelfand D.H., Steinberg R.A. // J. Bacteriology. 1977. V. 130. P. 429–440.
5. Powell J.T., Morrison J.F. // J. Biochemistry. 1978. V. 87. P. 391–400.
6. Weigent D.A., Nester E.W. // J. Biochemistry. 1976. V. 251. № 22. P. 6974–6980.
7. Nester E.W., Montoya A.L. // J. Bacteriology. 1976. V. 26. № 2. P. 699–705.
8. Sung M., Tanizawa K., Tanaka H., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Soda K. // J. Bacteriology. 1990. V. 172. № 3. P. 1345–1351.
9. Fazal A.M., Jensen R.A. // J. Bacteriology. 1979. V. 140. № 2. P. 580–587.
10. Lee C., Desmazeaud M.J. // J. General Microbiology. 1985. V. 131. P. 459–467.
11. Whitaker R.J., Gaines C.G., Jensen R.A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 22. P. 13550–13556.
12. Ziehr H., Kula M-R. // J. Biotechnology. 1985. V. 3. № 1–2. P. 19–31.
13. Paris C.G., Magasanik B. // J. Bacteriology. 1981. V. 145. № 1. P. 266–271.
14. Abou-Zeid A., Euverink G.J.W., Hessels G.I., Jensen R.A., Dijkhuizen L. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 4. P. 1298–1302.
15. Rijnen L., Bonneau S., Yvon M. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 11. P. 4873–4880.
16. Xing R.Y., Whitman W.B. // J. Bacteriology. 1992. V. 174. № 2. P. 541–548.
17. Andreotti G., Cubellis M.V., Nitti G., Sannia G., Mai X., Marino G., Adams M.W.W. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 220. P. 543–549.
18. Matsui I., Matsui E., Sakai Y., Kikuchi H., Kawarabayasi Y., Urai H., Kawaguchii S., Kuramitsu S., Harata K. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 7. P. 4871–4879.
19. Ward D.E., De Vos W.M., Van Der Oost // J. Archaea. 2002. V. 1. P. 133–141.
20. Cardenas-Fernandez M., Lopez C., Alvaro G., Lopez-Santin J. // J. Biochemical Engineering. 2012. V. 63. P. 15–21.
21. Патент США. 1988. № 4783403.
22. Патент США. 1988. № 4745059.
23. Патент Армении. 2010. № 2479A.
24. Палоян А.М., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 1. С. 123–129.
25. Peterson G. // Methods Enzymol. 1983. V. 91. № 1. P. 95–119.
26. Корниш-Боуден Э. // Основы ферментативной кинетики. Мир: Москва, 1979. 280 с.
27. King E.L., Altman C. // J. Phys. Chem. 1956. V. 60. P. 1375–1378.
28. Курхнер Ю. // Тонкослойная хроматография. Т. 1. Мир: Москва, 1981. 261 с.
29. Velick S.F., Vavra J. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. № 7. P. 2109–2122.
30. Ambartsumyan A.A., Bezirdzhyan Kh.O. // Biochemistry (Moscow). 1994. V. 59. № 9. P. 1027–1032.
31. Montemartini J.A., Santome J.J., Cazzulot, Nowicki C. // J. Biochem. 1993. V. 292. P. 901–906.
32. Оганесян А.М. // Биолог журн. Армении. 2009. Т. 64. № 4. С. 101–104.

## Catalytic Properties of Enzymes from *Erwinia carotovora* Involved in Transamination of Phenylpyruvate

A. M. Paloyan, L. A. Stepanyan, S. A. Dadayan, A. A. Hambardzumyan,  
Gh. P. Halebyan, and A. S. Saghyan

Scientific and Production Center Armbiotechnology, National Academy of Sciences of Armenia,  
14 Gyurjan str., Yerevan, 375056 Armenia

e-mail: anipaloyan@yahoo.com

Received August 7, 2012

**Abstract**— $K_m$  for L-phenylalanine, L-glutamic acid, L-aspartic acid, and the corresponding keto acids were calculated, as well as  $V_{max}$  was measured for the following pairs of substrates: L-phenylalanine–2-ketoglutarate, L-phenylalanine–oxaloacetate, L-glutamic acid–phenylpyruvate, and L-aspartic acid–phenylpyruvate for aminotransferases PAT1, PAT2, and PAT3 from *Erwinia carotovora* catalyzing transamination of phenylpyruvate. The ping-pong bi–bi mechanism was shown for the studied aminotransferases. The substrate inhibition ( $K_s$ ) of PAT3 with 2-ketoglutarate and oxaloacetate was  $10.23 \pm 3.20$  and  $3.73 \pm 1.99$  mM, respectively.