

УДК 579.871.8; 579.253.4; 579.222.7; 577.112.382.3

## ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ НЕКОТОРЫХ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА L-АЛАНИНА У ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ *Brevibacterium flavum*

© 2013 г. Л. О. Мелконян, Г. Е. Аветисова, А. А. Амбарцумян, А. Х. Чахалян, А. С. Сагиян

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА Ереван, Армения, 0056  
e-mail: arthambardzumyan@gmail.com, arm\_biotech@yahoo.com

Поступила в редакцию 7.08.2012 г.

Изучены механизмы сверхсинтеза L-аланина у штаммов-продуцентов *Brevibacterium flavum*.

Показано, что  $\beta$ -Cl-L-аланин является ингибитором ключевых ферментов синтеза L-аланина – аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. У родительского штамма-продуцента *B. flavum* AA5 со сниженной активностью аланинрацемазы ( $\geq 98\%$ ) получены устойчивые к  $\beta$ -Cl-L-аланину высокоактивные штаммы-продуценты *B. flavum* GL1 и GL18. Показано, что повышение уровня синтеза L-аланина у новых продуцентов является следствием снятия ингибирования аланин-трансаминазы конечным продуктом, а также дерепрессии аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы.

DOI: 10.7868/S0555109913020098

Аланин – аминокислота, широко распространенная в природе, важный источник энергии для головного мозга и центральной нервной системы, участвует в метаболизме сахаров и органических кислот. L-аланин применяется в медицинской промышленности для производства инфузионных растворов и биохимических тестовых наборов, в пищевой промышленности в качестве пищевой добавки, в химическом синтезе и т.д. Как главный компонент шелка, аланин используется в производстве искусственных нитей [1]. Основными производителями этой аминокислоты являются Япония и Германия [2–4].

Биосинтез L-аланина достаточно детально изучен у коринеформных бактерий. В частности, показано, что L-аланин может синтезироваться из пировиноградной кислоты (основной путь) с участием аланин-трансаминазы (КФ 2.6.1.2, L-аланин:2-оксоглутарат аминотрансфераза) и из L-валина с помощью валин:пируват-трансаминазы (КФ 2.6.1.66, L-валин:пируват аминотрансфераза) [5]. Выявлены и изучены гены, кодирующие синтез этих ферментов. Установлено, что валин:пируват-трансаминаза у различных микроорганизмов кодируется одним геном *avtA*, а аланин-трансаминаза кодируется разными генами, в частности, у *Escherichia coli* – это гены *alaB*, *alaA*, *alaC*, а у *Corynebacterium glutamicum* – *alaT*, *Cg12844* [6–8].

Однако изучение механизмов регуляции синтеза L-аланина и поиск путей получения высокоактивных штаммов-продуцентов продолжает оставаться актуальной задачей [9].

Ранее нами сообщалось об изучении активности аланинрацемазы (КФ 5.1.1.1), аланин-трансамина-

зы и валин:пируват-трансаминазы у штамма дикого типа *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 и аланинрацемазы у ауксотрофных по D-аланину штаммов *B. flavum* AA1 и AA2, продуцирующих 17.5 и 20.4 г/л L-аланина соответственно [10].

Цель работы – изучение влияния мутаций, приводящих к сверхсинтезу L-аланина, на регуляцию синтеза и активность ключевых ферментов биосинтеза: аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы у штаммов-продуцентов *B. flavum*.

### МЕТОДИКА

В работе использованы дикий штамм *B. flavum* ATCC 14067 (ВКПМ В-42), устойчивый к D,L- $\alpha$ -аминомасляной кислоте (D,L- $\alpha$ -АМК-г), ауксотрофный по D-аланину (D-ala<sup>-</sup>) штамм-продуцент *B. flavum* AA5 (ВКПМ В-3991) и полученные на его основе устойчивые к  $\beta$ -Cl-L-аланину штаммы-продуценты – *B. flavum* GL1 и GL18.

Исследуемые штаммы выращивали на мясопептонном агаре (МПА) и минимальной среде Гловера, содержащей (%): NH<sub>4</sub>Cl – 0.5, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 0.1, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.3, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.025, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.1, агар-агар-1.5. Необходимые добавки вносили в следующих концентрациях: глюкоза – 1.0 %, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.001%, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 0.001%, дестибиотин – 500 мкг/л, тиамин – 70 мкг/л, D-аланин – 100 мкг/мл.

Штаммы хранили на МПА при 4–7°C.

Обработку культур мутагеном N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ, 300 мкг/мл) проводили в цитратном буфере, pH 5.5, в течение 30 мин при 30°C по стандартной методике [11].

Устойчивые мутанты отбирали высевом обработанных культур на минимальную среду, содержащую соответствующее количество аналога. Выросшие колонии повторно пересеивали на среду с аналогом для получения чистых клонов.

Бактериальную массу для получения ферментных препаратов выращивали на синтетической среде следующего состава (%): сахароза – 5.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1; мел – 3.0; pH 7.0 – 7.5. При выращивании ауксотрофных штаммов добавляли D-аланин до конечной концентрации 100 мкг/мл. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл на качалке Innova 43 Shaker “New Brunswick Scientific” (США) при 250 об/мин и 30°C 24 ч. Выращенную биомассу собирали центрифугированием при 6000 g.

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

В экспериментах по изучению влияния некоторых аминокислот и их аналогов на биосинтез ферментов использовали обработанные толуолом клетки (ОТК). Обработку проводили по модифицированной методике [12]: в пробирках емкостью 1.5 мл 50–100 мг клеток (сырая масса) встряхивали в трис-НСI буфере, pH 8.3, содержащем 2.0% толуола, а затем осаждали центрифугированием при 10000 g 3 мин. Осажденные клетки суспендировали в том же буфере и использовали для определения ферментативной активности.

В остальных экспериментах в качестве ферментов использовали неочищенные гомогенаты, полученные после ультразвуковой дезинтеграции клеток. Для разрушения клеток бактериальную суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин при температуре 4°C (50 Вт, 20 кГц) на дезинтеграторе “Labsonic 2000” (Германия), после чего центрифугировали при 9000 g [13].

Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса по разнице поглощения света при длине волны 224 и 236 нм [14].

Активность аланинрацемазы определяли модифицированным методом, описанным в работе [15]. Реакционная смесь (0.3 мл) содержала: 100 мМ трис-НСI буфер, pH 8.3, 15 мМ L-аланин и необходимое количество фермента. Реакцию останавливали, помещая смесь в кипящую водяную баню на 7 мин. Образовавшийся D-аланин определяли ферментативным способом с использованием оксидазы D-аминокислоты и пероксидазы [16].

Активность аланин-трансаминазы определяли модифицированным методом, описанным в работе [17]. Реакционная смесь (0.4 мл) содержала: 100 мМ трис-НСI-буфер, pH 8.9, 100 мМ глутаминовую кислоту, 50 мМ Na-пируват, 0.1 мМ пиридоксаль-5-фосфат, 5.0 мМ меркаптоэтанол и необходимое количество фермента. Реакцию оста-

навливали, добавляя 2.5 мл дистиллированной воды и помещая смесь в кипящую водяную баню на 7 мин. Образованную в ходе реакции 2-кетоглутаровую кислоту определяли по окислению НАДН глутаматдегидрогеназой [16].

Активность валин:пируват-трансаминазы определяли методом Амбарцумяна и Безирджяна [13]. Реакционная смесь (0.4 мл) включала: 100 мМ трис-НСI-буфер, pH 8.0, 100 мМ L-аланин, 40 мМ 2-кетоиэвалериат, 0.1 мМ пиридоксаль-5-фосфат, 5.0 мМ меркаптоэтанол и необходимое количество фермента. Реакцию останавливали, добавляя 2.5 мл дистиллированной воды и помещая смесь в кипящую водяную баню на 7 мин. Образованный в ходе реакции пируват определяли по окислению НАДН лактатдегидрогеназой.

Для изучения ингибирования трансаминазы указанные выше реакции проводили в присутствии D-аланина, L-валина, D,L- $\alpha$ -аминокислоты (D,L- $\alpha$ -АМК), L-циклосерина и  $\beta$ -Cl-L-аланина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Изучение активности аланинрацемазы, аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы.** Ранее в НИТИА, ныне НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА был получен устойчивый к D,L- $\alpha$ -АМК, ауксотрофный по D-аланину штамм-продуцент *B. flavum* AA5, который в условиях ферментации в колбах на качалке синтезировал 43.8 г/л L-аланина [9].

Для выявления механизма сверхсинтеза L-аланина у этого штамма и поиска путей повышения синтеза была изучена активность аланинрацемазы. Исследования показали, что по сравнению с диким типом, у штамма-продуцента *B. flavum* AA5 активность этого фермента была снижена почти на 99%.

Сопоставление полученных нами данных с приведенными в статье [10] позволило заключить, что независимо от последовательности получения ауксотрофности по D-аланину у ранее описанных D-ala<sup>-</sup> штаммов *B. flavum* AA1 (ВКПМ В-3061), *B. flavum* AA2 (ВКПМ В-3062) и у штамма *B. flavum* AA5, мутация устойчивости к D,L- $\alpha$ -АМК не влияла на активность аланинрацемазы.

Таким образом, полученные данные подтвердили отсутствие активности аланинрацемазы у продуцентов *B. flavum*, ауксотрофных по D-аланину, в результате чего они синтезируют значительное количество L-аланина, в отличие от штамма дикого типа, содержащего этот фермент и накапливающего в среде рацемат аланина.

Для исследования влияния мутации устойчивости к D,L- $\alpha$ -АМК на активность аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы было изучено действие D-аланина, L-валина, D,L- $\alpha$ -АМК,

**Таблица 1.** Активности аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы у штамма дикого типа *B. flavum* ATCC 14067 и штамма-продуцента *B. flavum* AA5

Аминокислота	IC <sub>50</sub> , мМ			
	аланин-трансаминаза		валин:пируват-трансаминаза	
	ATCC 14067	AA5	ATCC 14067	AA5
D-аланин	–	–	–	–
L-валин	–	–	–	–
D,L- $\alpha$ -АМК	68	68	>80	>80
L-циклосерин	1.3	2.3	4.1	3.1
$\beta$ -Cl-L-аланин	0.155	0.155	>20	>20

L-циклосерина и  $\beta$ -Cl-L-аланина на активность ферментов в неочищенном гомогенате клеток исходного штамма *B. flavum* ATCC 14067 и *B. flavum* AA5. Данные приведены в табл. 1.

Из значений IC<sub>50</sub>, приведенных в табл. 1, следует, что D,L- $\alpha$ -АМК, L-циклосерин и  $\beta$ -Cl-L-аланин ингибируют активность аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. При этом как в случае штамма дикого типа, так и его мутанта – продуцента L-аланина, указанные вещества почти в одинаковой степени ингибировали активность ферментов.

Исходя из полученных данных,  $\beta$ -Cl-L-аланин был наиболее сильным ингибитором для аланин-трансаминазы, а L-циклосерин – для обеих трансаминаз.

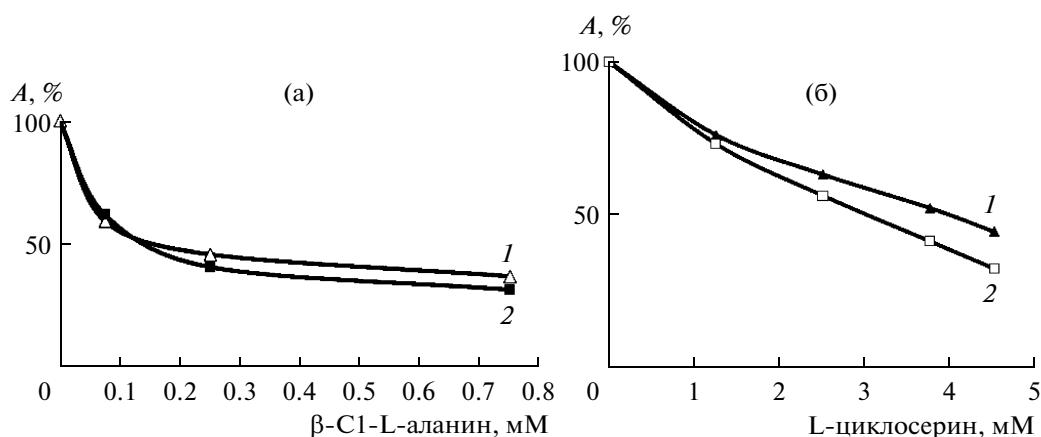
Действие  $\beta$ -Cl-L-аланина на активность аланин-трансаминазы представлено на рисунке (а). Действие L-циклосерина на активность валин:пируват-трансаминазы представлено на рисунке (б).

С использованием мутагена НГ, были получены мутанты штамма-продуцента *B. flavum* AA5, устойчивые к  $\beta$ -Cl-L-аланину. Из коллекции му-

тантов были отобраны два штамма – *B. flavum* GL1, устойчивый к 0.025 мг/мл  $\beta$ -Cl-L-аланина и *B. flavum* GL18, устойчивый к 0.05 мг/мл  $\beta$ -Cl-L-аланина, которые синтезировали около 54 и 61 г/л L-аланина, соответственно. Штаммы депонированы в Центре депонирования микробов НАН Армении под регистрационными номерами ИНМИА 11841 (*Brevibacterium flavum* GL1) и ИНМИА 11842 (*Brevibacterium flavum* GL18).

Учитывая сильный ингибирующий эффект  $\beta$ -Cl-L-аланина, для выяснения механизмов повышения синтеза L-аланина у новых штаммов, было изучено его влияние на активность аланин-трансаминазы у *B. flavum* GL1 и GL18. В качестве контроля в экспериментах был использован родительский штамм – *B. flavum* AA5. Показано, что у родительского штамма 50%-ное ингибирование активности этого фермента достигалось при концентрации  $\beta$ -Cl-L-аланина 0.16 мМ, а у штаммов-продуцентов *B. flavum* GL1 и GL18 при концентрации 1.96 мМ и более 5.0 мМ  $\beta$ -Cl-L-аланина соответственно.

Таким образом, у новых штаммов, устойчивых к  $\beta$ -Cl-L-аланину, значительно снижена степень ин-



Ингибирование активности (A, %) аланин-трансаминазы  $\beta$ -Cl-L-аланином (а) и валин:пируват-трансаминазы L-циклосерином (б).

1 – *B. flavum* ATCC 14067; 2 – *B. flavum* AA5.

**Таблица 2.** Влияние некоторых аминокислот на синтез аланин-трансаминазы у штаммов-продуцентов L-аланина (ATCC 14067, AA5, GL1, GL18)

Аминокислота	Активность аланин-трансаминазы							
	ATCC 14067		AA5		GL1		GL18	
	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%
контроль	0.360	100.0	0.317	100.0	0.178	100.0	0.442	100.0
L-аланин, 20 мМ	0.368	102.2	0.385	121.5	0.207	116.3	0.621	140.5
D-аланин, 20 мМ	0.059	16.4	0.345	108.8	0.175	98.3	0.633	143.2
L-валин, 20 мМ	0.325	90.3	0.115	36.3	0.182	102.2	0.340	76.9
D,L- $\alpha$ -АМК, 20 мМ	0.382	106.1	0.255	80.4	0.425	238.8	0.342	77.4
$\beta$ -Cl-L-аланин, 2 мМ	0.184	51.1	0.242	76.3	0.207	116.3	0.540	122.2

**Таблица 3.** Влияние некоторых аминокислот на синтез валин:пируват-трансаминазы у штаммов-продуцентов L-аланина (ATCC 14067, AA5, GL1, GL18)

Аминокислота	Активность валин:пируват-трансаминазы							
	ATCC 14067		AA5		GL1		GL18	
	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%
контроль	0.083	100.0	0.032	100.0	0.032	100.0	0	0
L-аланин, 20 мМ	0.086	103.6	0.048	150.0	0.032	100.0	0.015	—
D-аланин, 20 мМ	0.014	16.9	0.063	196.9	0	0	0.120	—
L-валин, 20 мМ	0.104	125.3	0.023	71.9	0.035	109.4	0.047	—
D,L- $\alpha$ -АМК, 20 мМ	0.091	109.6	0.052	162.5	0.190	593.8	0.049	—
$\beta$ -Cl-L-аланин, 2 мМ	0.027	32.5	0.033	103.1	0.088	275.0	0.100	—

гибирования аланин-трансаминазы. Это нарушение регуляции активности фермента, по-видимому, и привело к повышению синтеза L-аланина.

**Синтез аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы.** Было изучено влияние L-аланина, D-аланина, L-валина, D,L- $\alpha$ -АМК,  $\beta$ -Cl-L-аланина на синтез ключевых ферментов у штаммов-продуцентов L-аланина – аланин-трансаминазу и валин:пируват-трансаминазу. Учитывая, что  $\beta$ -Cl-L-аланин в опытах по определению активности ферментов проявлял сильное ингибирующее действие, этот аналог был использован в сравнительно низкой концентрации. Усредненные данные 5 опытов приведены в табл. 2 и 3. Анализ данных, приведенных в табл. 2, свидетельствует о том, что по сравнению со штаммом дикого типа, у которого наблюдалась репрессия аланин-трансаминазы D-аланином и  $\beta$ -Cl-L-аланином, у штамма-продуцента *B. flavum* AA5 репрессия D-аланином отсутствовала, сохранялась репрессия  $\beta$ -Cl-L-аланином и D,L- $\alpha$ -АМК и обнаруживалась значительная репрессия L-валином. При этом L-аланин оказывал дерепрессирующее действие.

У штамма-продуцента *B. flavum* GL1 с дополнительной мутацией устойчивости к 0.025 мг/мл

$\beta$ -Cl-L-аланина, по сравнению с *B. flavum* AA5, репрессия фермента L-аланином, D-аланином, L-валином,  $\beta$ -Cl-L-аланином не наблюдалась. Сильное дерепрессирующее действие оказывала только D,L- $\alpha$ -АМК. В то же время, у *B. flavum* GL18 сохранялась репрессия D,L- $\alpha$ -АМК и частично была снята репрессия L-валином. Слабая дерепрессия наблюдалась  $\beta$ -Cl-L-аланином, а D-аланин и L-аланин оказывали значительное дерепрессирующее действие.

Таким образом, можно заключить, что устойчивость к  $\beta$ -Cl-L-аланину у высокопродуктивных штаммов *B. flavum* приводила к снятию репрессии синтеза аланин-трансаминазы веществами, которые или связаны с синтезом L-аланина, или являются аналогами этой аминокислоты. Дерепрессия аланин-трансаминазы в значительной степени увеличивалась в присутствии D-аланина, L-аланина, D,L- $\alpha$ -АМК и  $\beta$ -Cl-L-аланина.

У штамма дикого типа (табл. 3) наблюдалась сильная репрессия валин:пируват-трансаминазы D-аланином и  $\beta$ -Cl-L-аланином, как и в случае аланин-трансаминазы. У штамма-продуцента *B. flavum* AA5 мутации ауксотрофности по D-аланину и устойчивости к D,L- $\alpha$ -АМК привели к снятию ре-

прессии валин:пируват-трансаминазы  $\beta$ -Cl-L-аланином и к сильной дерепрессии D-аланином, L-аланином и D,L- $\alpha$ -АМК.

У штамма *B. flavum* GL1, устойчивого к  $\beta$ -Cl-L-аланину, наблюдалась значительная дерепрессия D,L- $\alpha$ -АМК,  $\beta$ -Cl-L-аланином и полная репрессия D-аланином. У *B. flavum* GL18 в контрольных условиях активность валин:пируват-трансаминазы не наблюдалась, на фоне чего все исследуемые вещества оказывали дерепрессирующее действие. При этом D-аланин и  $\beta$ -Cl-L-аланин в наибольшей степени дерепрессировали синтез валин:пируват-трансаминазы.

Таким образом, установлено, что у полученных нами высокоактивных штаммов-продуцентов *B. flavum* сверхсинтез L-аланина обусловлен нарушением биосинтеза L-аланина как на генном уровне в результате разрегуляции синтеза ферментов аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы, так и на уровне активности этих ферментов путем снятия ингибирования конечным продуктом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kimura H., Kishi S., Shoji A., Sugisawa H., Deguch K. Proc. The 15th European Experimental NMR Conference. Leipzig: University of Leipzig, 2000. P. 12–17.
2. Ikeda M. // Adv. Biochem. Eng/Biotechnol. 2003. V. 79. P. 1–35.
3. Kumagai H., Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. The prokaryotes / Ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. 3 Ed. New York : Springer, 2006. V. 1. chapter 3.2. P. 756–765.
4. Алебян Г.П., Амбарцумян А.А., Папоян А.О., Алебян М.Г., Григорян А.А., Дюкова К.Г., Сагиян А.С. // Биотехнология. 2008. № 1. С. 29–45.
5. Marienhagen J., Eggeling L. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 24. P. 7457–7462.
6. Kim S.H., Schneider B.L., Reitzer L. // J. Bacteriol. 2010. V. 192. № 20. P. 5304–5311.
7. Marienhagen J., Kennerknecht N., Sahm H., Eggeling L. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 22. P. 7639–7646.
8. Yoneyama H., Hori H., Lim S.J., Murata T., Ando T., Isogai E., Katsumata R. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. V. 75. № 5. P. 930–938.
9. Патент США. 1992. № 5124257.
10. Гайбакаян Л.Д., Аветисова Г.Е., Азизян А.Г., Амбарцумян А.А., Давтян М.А. // Биотехнология. 2003. № 1. С. 44–48.
11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 438 с.
12. McGilvrey D., Umbarger H.E. // J. Bacteriol. 1974. V. 120. № 2. P. 715–723.
13. Амбарцумян А.А., Безирджян Х.О. // Биохимия. 1994. Т. 59. № 9. С. 1378–1384.
14. Peterson G.L. // J. Methods Enzymol. 1983. V. 91. P. 95–119.
15. Badet B., Roise D., Walsh C.T. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 22. P. 5188–5194.
16. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М. 1965. 327 с.
17. Segal H.L., Beattie D.S., Hopper S. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. № 6. P. 1914–1920.

## Regulation of Key Enzymes of L-Alanine Biosynthesis by *Brevibacterium flavum* Producer Strains

L. O. Melkonyan, G. E. Avetisova, A. A. Ambartsumyan, A. Kh. Chakhalyan, and A. S. Sagiyan

NPO Armbiotekhnologiya, National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, 0056 Armenia

e-mail: arm\_biotech@yahoo.com, arthambardzumyan@gmail.com

Received August 7, 2012

**Abstract**—The mechanisms of L-alanine overproduction by *Brevibacterium flavum* producer strains were studied. It was shown that  $\beta$ -Cl-L-alanine is an inhibitor of some key enzymes involved in the synthesis of L-alanine, including alanine transaminase and valine–pyruvate transaminase. Two highly active *B. flavum* GL1 and GL18 producer strains, which are resistant to the inhibitory effect of  $\beta$ -Cl-L-alanine, were obtained using a parental *B. flavum* AA5 producer strain, characterized by a reduced activity of alanine racemase ( $\geq 98\%$ ). It was demonstrated that the increased L-alanine synthesis efficiency observed in the producer strains developed in this work is associated with the absence of inhibition of alanine transaminase by the end product of the biosynthesis reaction, as well as with the effect of derepression of both alanine transaminase and valine–pyruvate transaminase synthesis by the studied compound.