



УДК 547.586.2

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ RHODOSPORIDIUM TORULOIDES, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В КЛЕТКАХ E. COLI

Бабич О.О., Солдатова Л.С., Разумникова И.С., Просеков А.Ю.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово,
e-mail: olich.43@rambel.ru

Оптимизированы параметры очистки рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы из клеток *E. coli*. Определены основные биохимические свойства рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Установлено, что фермент наиболее активен при pH 8,5. При этом он стабилен в широком диапазоне значений pH от 7,0 до 11,0. Температурный оптимум активности PAL составляет 50 °C. При 30 °C фермент сохраняет более 90 % активности после трех суток инкубации. Время полуинактивации фермента при 50 и 60 °C составляет 4,5 ч и 15 мин, соответственно. Рассчитаны кинетические константы для фермента: $V_{\max} = 3,97$ мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ и $K_m = 0,49$ мМ.

Ключевые слова: L-фенилаланин-аммоний-лиаза, рекомбинантный белок, очистка, выделение, активность, биохимические свойства, pH, температура, стабильность

ALLOCATION, CLEARING AND SOME PROPERTIES OF RECOMBINANT L-PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE RHODOSPORIDIUM TORULOIDES, EXPRESSED IN CELLS E. COLI

Babich O.O., Soldatova L.S., Razumnikova I.S., Prosekov A.Y.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Kemerovo, e-mail: olich.43@rambel.ru

Parameters of clearing recombinant L-phenylalanine-ammonia-lyase from cells *E. coli* are optimized. The exit of enzyme as a result of clearing makes about 60 %. The basic biochemical properties recombinant L-phenylalanine-ammonia-lyase are defined. It is established that enzyme is most active at pH 8,5. Thus it is stable in a wide range of values pH from 7,0 to 11,0. The temperature optimum of activity PAL makes 50 °C. At 30 °C enzyme keeps more 90 % of activity after three days of an incubation. Time of a semiinactivation of enzyme at 50 and 60 °C makes 4,5 hours and 15 minutes, accordingly. Kinetic constants for enzyme are calculated: $V_{\max} = 3,97$ mkmol·min⁻¹·mg⁻¹ and $K_m = 0,49$ mM.

Keywords: L-phenylalanine-ammonia-lyase, recombinant protein, clearing, allocation, activity, biochemical properties, pH, temperature, stability

L-фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL, КФ 4.3.1.5) катализирует реакцию обратимого дезаминирования аминокислоты L-фенилаланина до транс-коричной кислоты и аммиака [1, 2]. L-фенилаланин-аммоний-лиаза с помощью генно-инженерных манипуляций была экспрессирована в клетки *Escherichia coli* [3].

Фермент представляет интерес в качестве терапевтического средства для лечения фенилкетонурии, может быть использован как для прямой терапии фенилкетонурии, так и для производства полноценных продуктов питания, не содержащих фенилаланин [4, 5]. Кроме медицинского применения фермент может быть использован в биотехнологии для производства L-фенилаланина из транс-коричной кислоты [6, 7].

Целью работы являлось получение высокоочищенного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы и изучение его основных биохимических свойств.

Штамм-продуцент рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы получен в лаборатории Кемеровского технологического института пищевой промышленно-

сти. Конструкция экспрессионного вектора описана в работе [8, 9].

Получение рекомбинантного белка. Единичную колонию инокулировали в 50 мл среды LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола. Культуру выращивали в течение ночи при 37 °C. Ночную культуру переносили в 5 л среды LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола, и инкубировали на роторной качалке при 180 об./мин и 23 °C до достижения оптической плотности 0,7 при $\lambda = 590$, затем индуцировали экспрессию добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до 1 мМ и инкубировали клетки на роторной качалке при тех же условиях в течение 24 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4 °C в течение 15 мин при 5000×g. Биомассу хранили при температуре -70 °C в течение 2–4 недель, при этом активность L-фенилаланин-аммоний-лиазы существенно не снижалась.

Электрофорез клеточных лизатов и белков. Электрофорез клеточных лизатов и белков проводили с использованием диск-



электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих редуцирующих условиях по Лэммли.

Получение бесклеточного экстракта.

Биомассу размораживали и ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 8,0). В суспензию добавляли ингибиторы протеаз. Клетки разрушали ультразвуком на установке MSE (Англия) при средней мощности и амплитуде, равной 4, используя средний шток. Озвучивали суспензию (по 20 мл) на льду 6 раз по 20 с с минутными интервалами для охлаждения. Гомогенат центрифугировали при 10000 об./мин в течение 30 мин (Eppendorf, Германия).

Фракционирование сульфатом аммония. В супернатант вносили сухой сульфат аммония (осч) до 25% от насыщения. После растворения соли экстракт выдерживали 15 мин на холоду. Осадок отделяли центрифугированием при 10000 об.жэ/мин в течение 30 мин. В супернатанте концентрацию соли доводили, добавляя сухой сульфат аммония, до 50% от насыщения. После 15-минутной инкубации на холоду повторно центрифугировали и полученный осадок ресуспендировали в 55%-м сульфате аммония для отмывки от ЭДТА, содержавшегося в ингибиторах, затем снова центрифугировали. После этого осадок растворяли в 150 мМ фосфатном буфере (рН 8,0) с 10 мМ имидазолом. Для удаления нерастворимого осадка препарат центрифугировали при 10000 об./мин в течение 20 мин.

Очистка на Ni²⁺-НТА агарозе. Препарат наносили на колонку с Ni²⁺-НТА агарозой (7 мл), уравновешенную 150 мМ фосфатным буфером (рН 8,0) с 10 мМ имидазолом. Работу проводили при +15 °С. Колонку промывали от несвязанного мате-

риала исходным буфером (3 объема колонки), затем – 150 мМ фосфатным буфером (рН 8,0) с 20 мМ имидазолом (3 объема колонки). PAL элюировали тем же буфером с увеличенной до 250 мМ концентрацией имидазола (3 объема). К образцу добавляли насыщенный раствор (NH₄)₂SO₄ до 0,4 М.

Гидрофобная хроматография. Гидрофобную хроматографию проводили на FPLC-хроматографе с детектором Pharmacia LKB – UV – М II при длине волны 280 нм (Pharmacia, Швеция), используя колонку 7×10 мм Protein PAK Glass HIC с фенил-TSK-5PW сорбентом (Nihon Waters Ltd., Япония). Использовалась комнатная температура (+18 – +22 °С). Образец после центрифугирования (15000 об./мин×15 мин) наносили на колонку, уравновешенную 50 мМ фосфатным буфером и 0,8 М (NH₄)₂SO₄ при рН 8,2. Скорость нанесения составляла 0,5 мл/мин, скорость промывки и элюции – 1 мл/мин. После нанесения образца колонку промывали тем же буфером в течение 10 мин. Элюировали PAL убывающим линейным градиентом (NH₄)₂SO₄ от 0,8 до 0 М в 50 мМ фосфатном буфере при рН 8,2. Объем градиента равен 35 мл.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при A₂₈₀.

Определение активности белка. Определение активности белка проводили на спектрофотометре «DU 800» (Beckman Coulter). Расчет делали в интервале времени от 2 до 7 мин. Активность рассчитывали по формуле из методики Sigma с использованием миллимолярного коэффициента экстинкции транс-коричной кислоты, равного 19,73, в соответствии с формулой (1):

$$\text{Активность (Ед / мл)} = \frac{(\Delta \text{ОП}_{270} / \text{мин Опыт} - \Delta \text{ОП}_{270} / \text{мин Контроль}) \cdot V_{\text{р.см}} \cdot f}{19,73 \cdot V_{\text{обр}}}, \quad (1)$$

$$\text{Удельная активность (Ед/мг белка)} = (\text{Ед/мл}) \cdot \frac{1}{C},$$

где $V_{\text{р.см}}$ – объем реакционной смеси (мл); f – коэффициент разбавления исходного раствора препарата PAL; 19,73 – коэффициент миллимолярной экстинкции транс-коричной кислоты при 270 нм; $V_{\text{обр}}$ – объем образца в мл; C – концентрация белка в исходном растворе (мг/мл).

За единицу активности принимали количество PAL, которое катализирует за минуту превращение 1 мкмоль L-фенилаланина в транс-коричную кислоту и NH₃ при рН 8,5 и температуре 30 °С.

Определение кинетических параметров (K_m и V_{max}) PAL. Кинетические констан-

ты PAL определяли методом начальных скоростей в стандартной реакционной смеси (1 мл) с 0,1 М Трис-НСI буфером (рН 8,5 ± 0,05). Температура определения составляла +30 °С. Концентрацию фенилаланина варьировали в диапазоне от 0,05 до 4 мМ.

Кинетические константы вычислялись при помощи программы SigmaPlot 8.0 методом аппроксимации нелинейной регрессии, представляющей совокупность экспериментальных данных, к уравнению Михаэлиса–Ментен в соответствии с формулой (2):

$$v = V_{\text{max}} \cdot \frac{s}{K_m + s}, \quad (2)$$

где v – скорость реакции; s – концентрация субстрата; V_{\max} – максимальная скорость; K_m – константа Михаэлиса.

Значения рассчитанных констант представлены как среднее \pm стандартная ошибка.

Графики строились с использованием программы SigmaPlot 8.0. На графиках ошибки представляют стандартную погрешность.

Каталитическую константу (число оборотов) PAL рассчитывали, принимая число активных центров за субъединицу, равную 1, по уравнению (3):

$$k_{cat} = V_{\max} / [E] \text{ (с}^{-1}\text{)}, \quad (3)$$

где $[E]$ – общая концентрация фермента в молях из расчета, что для PAL 1 мг белка соответствует 12.755 нмоль.

Конструкция используемого в работе экспрессионного вектора pET-28a содержит непосредственно за кодирующей последовательностью участок, кодирующий гексагистидиновую последовательность. Таким образом, в результате индуцируемой экспрессии клонированного в нем гена *pal* синтезировалась L-фенилаланин-аммоний-лиаза, содержащая дополнительную гексагистидиновую последовательность в С-концевой области полипептидной цепи, позволяющую осуществлять аффинную очистку белка на Ni-NTA носителе.

Ранее Calabrese с соавторами [10] разработали способ получения очищенного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Однако предложенная авторами схема очистки имеет ряд существенных недостатков. Так, использование таких компонентов, как NaCl и дитиотрейтол (ДТТ), не желательно, поскольку они подавляют активность PAL, что мешает контролировать ход очистки. Кроме того, получаемый препарат имеет более низкую удельную активность вследствие влияния ДТТ. В связи с этим в настоящей работе подобраны оптимальные условия для очистки рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы из клеток *E. coli*.

Разработанная схема очистки включает дробное осаждение сульфатом аммония и две хроматографические стадии: металлохелатную и гидрофобную.

Активные фракции объединяли и для анализа чистоты препарата использовали диск-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия. Результаты очистки представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Данные, представленные в табл. 1 и на рис. 1, свидетельствуют о том, что при гидрофобной хроматографии фермент элюируется двумя пиками. При этом 80% фермента элюируется в первой фракции с удельной активностью 3,3 Е/мг, а около 20% фермента с удельной активностью

2,2 Е/мг элюируется во второй фракции. Выход фермента в результате очистки составляет около 60%.

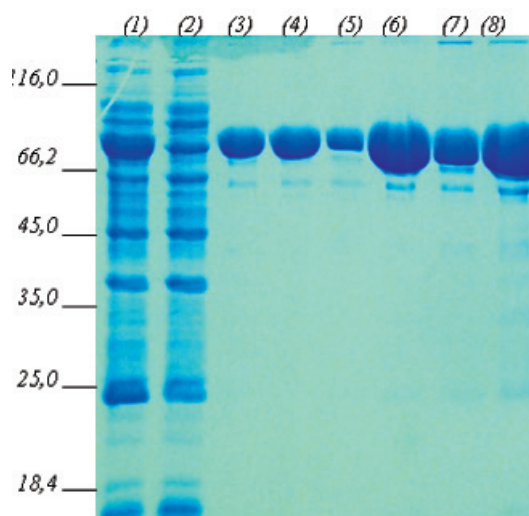


Рис. 1. Электрофоретический анализ очистки PAL (очистка №3):

1 – препарат перед нанесением на металлохелат после дробного высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (25% и 50% насыщения), нанесено 9,5 мкг белка; 2 – проскок после металлохелата; 3 и 8 – препарат после металлохелата (2,85 и 11,4 мкг белка, соответственно); 4 и 6 – объединенные фракции первого пика после фенил-сефарозы (3 и 9 мкг белка, соответственно); 5 и 7 – объединенные фракции второго пика после фенил-сефарозы (1,3 и 4,0 мкг белка, соответственно). Слева указаны маркеры молекулярных весов в кДа

Следующий этап исследования посвящен изучению активности очищенного фермента. Определение зависимости активности PAL от pH проводили в инкубационной смеси, содержащей 2 мМ L-фенилаланина в 0,1 М буферных растворах. В качестве буферных растворов использовали цитрат-НСl, ацетат-NaOH, KH_2PO_4 -NaOH, Трис-НСl, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH с pH от 2 до 12. Исползованные растворы и соответствующие им значения активности PAL представлены в табл. 2.

Зависимость активности PAL от pH (рис. 2) имеет четкий максимум при pH 8,5. Изменение pH уже на 0,5 единицы от максимума в любую сторону приводит к заметному снижению активности (от 10 до 20%), а при pH 7,0 в К, Na-фосфатном буфере она составляет 47% от максимальной. Активность PAL при pH 8,0 в Трис-НСl буфере выпадает из кривой, что предположительно может объясняться ингибирующим действием на фермент хлорид-иона. Из этих данных также можно заключить, что фосфатный буфер благоприятен для активности PAL, несмотря на более высокую величину ионной силы.

Таблица 1

Результаты очистки рекомбинантной PAL по оптимизированной схеме

Стадия очистки	Экстракт	Осаждение сульфатом аммония (25–50%)	Ni-NTA-сефароза	Гидрофобная хроматография	Гидрофобная хроматография, «хвост»
Удельная активность, Е/мг	0,276	0,822	2,217	3,316	2,228
Активность, Е/мл	2,57	16,60	11,64	12,80	4,10
Белок, мг/мл	9,30	20,20	5,25	3,90	1,80
Объем, мл	110,0	16,5	20,0	13,7	10,5
Суммарная активность, Е	282,7	273,9	232,8	175,4	43,1
Суммарный белок, мг	1023,0	333,0	105,0	52,9	19,3
Выход, %	100	97	85	58	14

Таблица 2

Зависимость активности PAL от pH

pH	0,1 М буфер в инкубационной смеси	Активность, % от максимальной величины
2,0	цитрат-НCl	0,00
3,0	цитрат-NaOH	0,00
4,0	Ацетат-NaOH	0,00
5,0	Ацетат-NaOH	2,65
6,0	KH ₂ PO ₄ -NaOH	16,14
7,0	KH ₂ PO ₄ -NaOH	47,03
7,5	KH ₂ PO ₄ -NaOH	75,09
8,0	Трис-НCl	78,59
8,2	KH ₂ PO ₄ -NaOH	96,23
8,5	Трис-НCl	100,00
9,0	Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	89,23
10,0	Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	64,36
11,0	Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	9,75
12,0	Na ₂ HPO ₄ -NaOH	0,00

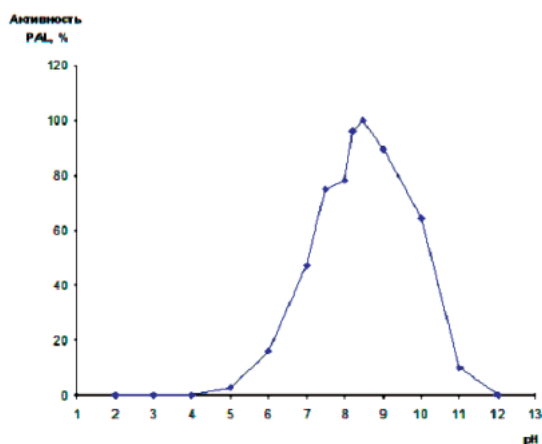


Рис. 2. Зависимость активности PAL от pH (в % от максимальной активности)

Для определения стабильности очищенного препарата PAL его разбавляли в 50 раз в таких же буферах с pH от 3 до 12 и концентрацией 0,1 М. Концентрация белка в пробах составляла 0,2 мг/мл. Образцы инкубировали при +30 °С в течение 10 мин. Затем отбирали аликвоты и вносили их в инкубационную смесь для определения активности в стандартных оптимальных условиях при pH 8,5.

Данные экспериментов представлены в табл. 3. Для построения графика зависимости стабильности фермента от pH (рис. 3) использовали среднее арифметическое значение активности при соответствующем значении pH, выраженной в процентах от активности PAL после 10 мин инкубации при pH 8,5.

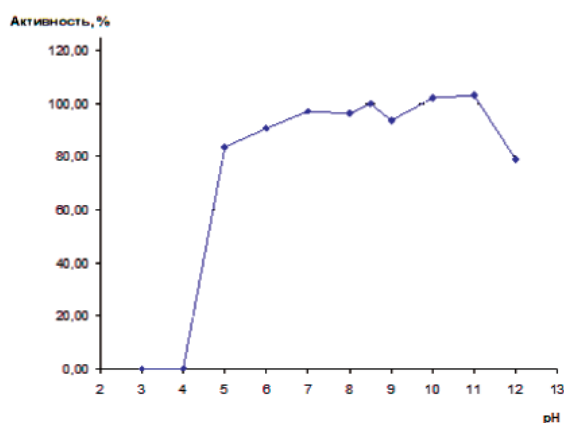


Рис. 3. Стабильность препарата PAL при различных значениях pH

Из рис. 3 следует, что PAL наиболее стабильна при pH 7,0 и более щелочных значениях вплоть до pH 11,0. При pH 11,0 даже происходит некоторое увеличение активности. По-видимому, это объясняется тем, что ингибирование PAL ДТТ является обратимым и происходит быстрее при pH 11,0.

Кроме того, в кислой среде (рН ниже 7,0) белок быстро и необратимо инактивируется. Например, при рН 5 сохраняется 83% активности, а при рН 4 PAL уже полностью инактивируется после 10-минутной инкубации при 30 °С.

Таблица 3
рН-стабильность PAL

Буфер, 0,1 М	рН	Активность, % от рН 8,5
Цитрат-NaOH	3,0	0,1
Ацетат-NaOH	4,0	0,1
Ацетат-NaOH	5,0	83,5
КН ₂ РО ₄ -NaOH	6,0	90,6
КН ₂ РО ₄ -NaOH	7,0	97,1
Трис-HCl	8,0	96,2
Трис-HCl	8,5	100,0
Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	9,0	93,6
Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	10,0	102,0
Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	11,0	103,0
Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	12,0	78,8

Зависимость активности PAL от температуры определяли в стандартной реакционной смеси, которую предварительно выдерживали 10 мин при температуре реакции. Измерения проводили на спектрофотометре с термостатом, поддерживающим нужную температуру с точностью ±0,1 °С. Реакцию инициировали ферментом (10,1 мг/мл), предварительно разбавленным в 50 раз 0,1 М Трис-HCl буфером с рН 8,5. Чтобы не выходить за пределы линейности метода, объем фермента, вносимого в реакцию, варьировали в соответствии с табл. 3. Для расчета удельной активности фермента использовали линейный участок кинетической кривой. При построении графика (рис. 4) использовали средние арифметические значения полученных удельных активностей.

Как следует из рис. 4, температурный оптимум реакции наблюдается при температуре 50 °С. Активность PAL уменьшается более чем в два раза при 60 °С, причем такое снижение активности не может быть вызвано необратимой денатурацией фермента. Так, было показано, что при данной температуре фермент теряет 50% активности за 15 мин, тогда как время реакции в данной серии экспериментов составляет 4 мин. Данный факт также подтверждается тем, что во время реакции не наблюдается

значительных отклонений от линейности, как, очевидно, должно быть при денатурации белка в кювете.

Активность,
Е/мг белка

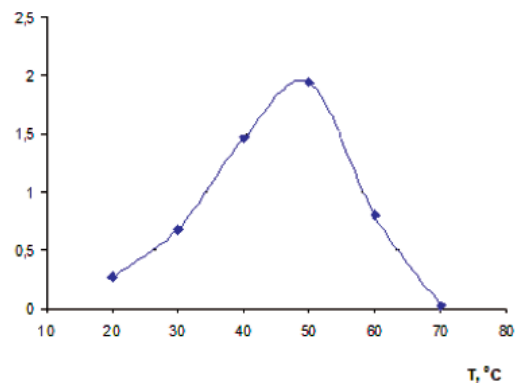


Рис. 4. Зависимость активности PAL от температуры

Для исследования термостабильности фермент (10,1 мг/мл) разбавляли в 50 раз 0,1 М Трис-HCl буфером с рН 8,5. Раствор фермента (0,2 мг/мл) помещали в эппендорфы и инкубировали в термостатах «Термит» (ДНК-технологии, Россия) при указанных ниже температурах ±0,1 °С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, в которых немедленно определяли активность PAL в стандартной инкубационной смеси при 30 °С.

Стабильность PAL исследовали при температурах 30, 50 и 60 °С. Как оказалось, фермент обладает высокой устойчивостью вплоть до температуры 50 °С. Данные, полученные в ходе эксперимента, показали, что при 30 °С после трех суток инкубации в препарате сохраняется не менее 91% от исходной активности, при 50 °С время полуинактивации составляет 4,5 ч, при 60 °С фермент быстро теряет активность. Время полуинактивации составляет 15 мин. Ренатурация выражена слабее, чем при 50 °С.

Кинетические параметры фермента, очищенного по разработанной схеме, рассчитанные на основании метода начальных скоростей, представлены в табл. 4. Концентрация белка в реакционной смеси составляла 1,33 мкг/мл.

Таким образом, в настоящей работе подобраны оптимальные условия очистки препарата L-фенилаланин-аммонийлиазы. Схема очистки включает дробное осаждение сульфатом аммония и две хроматографические стадии: металлохелатную и гидрофобную. Выход фермента в результате очистки по разработанной схеме составляет около 60%. Исследованы биохимические свойства рекомбинантной



L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Фермент наиболее активен при pH 8,5. При этом он стабилен в широком диапазоне значений pH от 7,0 до 11,0. Температурный оптимум активности PAL составляет 50 °С. При 30 °С фермент сохраняет более 90% активности после трех суток инкубации. Время полуинаktivации фермента при 50 и 60 °С составляет 4,5 ч и 15 мин соответственно. Определены кинетические константы для фермента: $V_{\max} = 3,97 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ и $K_m = 0,49 \text{ мМ}$.

Таблица 4
Зависимость активности PAL от концентрации L-фенилаланина в реакционной смеси

Концентрация L-фенилаланина, мМ	Специфическая активность PAL, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		
0,05	0,3961	0,4304	0,4266
0,10	0,6361	0,7161	0,6894
0,20	1,1732	1,2532	1,1922
0,40	1,7141	1,8664	1,6950
0,80	2,3312	2,5826	2,4416
2,00	3,1730	3,1692	3,2491
4,00	3,5896	3,7033	3,3911

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», государственный контракт №16.740.11.0239.

Список литературы

1. Cochrane F.C. The Arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms / F.C. Cochrane, L.B. Davin, N.G. Lewis // *Phytochemistry*. – 2004. – №65. – P. 1557–1564.

2. Amrhein N. Superinduction of phenylalanine ammonia-lyase in gherkin hypocotyls caused by the inhibitor L-α-amynooxy-β-phenylpropionic acid / N. Amrhein, J. Gerhardt // *Biochim Biophys Acta*. – 1979. – №583. – P. 434–442.

3. Breathnach, R. Organizational and expression of eucaryotic split genes coding for proteins // *Ann Rev Biochem*. – 1981. – №50. – P. 149–183.

4. A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase / C.N. Sarkissian, Z. Shao, F. Blain, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – №96. – P. 2339–2344.

5. Levy H.L. Phenylketonuria: Old disease, new approach to treatment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – №2. – P. 1811–1813.

6. Hanley W.B. Hypotyrosinemia in phenylketonuria / W.B. Hanley, A.W. Lee, A.J. Hanley // *Molec. Genet. Metab*. – 2000. – №69. – P. 286–294.

7. Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine-ammonia-lyase activity / S. Yamada, K. Kabe, N. Izuo, et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1981. – №42. – P. 773–778.

8. Бабич О.О. Особенности экспрессии гена L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides* в клетках *E. coli* / О.О. Бабич, И.С. Разумникова, А.Ю. Просеков // Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности: сборник трудов Десятой Международной научно-практической конференции. – СПб., 2010. – С. 27–28.

9. Особенности получения L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides* в клетках *E. coli* / О.О. Бабич, А.Ю. Просеков // Научно-практические аспекты развития современной техники и технологий в условиях курса на инновации: сборник трудов I Всероссийской научно-практической (заочной) конференции. – М.: Издательско-полиграфический комплекс НИИРРР, 2010. – С. 6–8.

10. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis / J.C. Calabrese, D.B. Jordan, A. Boodhoo, et al. // *Biochemistry*. – 2004. – №43. – P. 11403–11416.

Рецензенты

Майоров А.А., д.т.н., директор ГНУ «Сибирский НИИ сыроделия Сибирского отделения Россельхозакадемии», г. Барнаул;

Кондратенко Е.П., д.с.-х.н., профессор кафедры «ТХ и ПСХП» ФГОУ ВПО «Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт», г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 24.06.2011.