

УДК 577.112.384.2.088.6 + 577.112.382.3.088.6

Улучшение каталитических свойств штамма-продуцента аспартазы *Pectobacterium carotovorum* в процессе получения L-аспарагиновой кислоты

© 2020 К. Г. ДЮКОВА^{1,*}, М. С. ИЗМАИЛЯН¹, А. М. ПАЛОЯН¹, А. А. АМБАРЦУМЯН¹¹НПЦ «Армбиотехнология» Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, 0056 Армения

*e-mail: karina_dukova@yahoo.com

Поступила в редакцию 31.07.2019 г.

После доработки 27.10.2019 г.

Принята к публикации 17.11.2019 г.

В работе приведены результаты исследований по определению оптимальных параметров функционирования аспартазы и фумаразы бактериального штамма *P. carotovorum* MDC-8727 – продуцента аспартазы. Для обоих ферментов температурный оптимум находился в пределах 35–40 °С, а оптимальные значения pH – в области 8,5–9,0. При 50 °С термостабильность аспартазы была вдвое выше, чем фумаразы. Установлено, что термическая обработка биомассы клеток в культуральной жидкости при низких значениях pH приводит к частичной инактивации фумаразы. Термическая же обработка клеток при температуре 50 °С и pH 5,0 в течение 90 мин способствует полной инактивации фумаразы без ущерба для активности аспартазы.

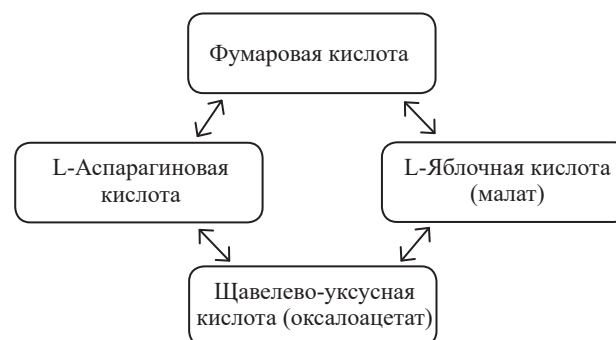
Ключевые слова: фумараза, аспартаза, L-аспарагиновая кислота, биотрансформация

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-30-35

Биокаталитическая трансформация фумаровой кислоты и аммиака с помощью аспарат-аммиак-лиазы (ЕС 4.3.1.1) является одним из первых, и на сегодняшний день основных, биотехнологических производственных способов получения L-аспарагиновой кислоты. Проведено большое количество исследований, в том числе и армянскими исследователями, в области биотехнологии получения аспарагиновой кислоты на основе аспартаз, выделенных из разных микроорганизмов [1, 4–12].

Штаммы с выраженной L-аспартазной активностью, используемые для синтеза L-аспарагиновой кислоты, в той или иной степени, являются также носителями фумаразы (фумарат гидратаза, ЕС 4.2.1.2). Поэтому, в реакциях превращения под действием микробных биокатализаторов, основанных на неочищенном ферментном препарате, из фумарата одновременно с L-аспарагиновой кислотой образуется по крайней мере один побочный продукт – L-яблочная кислота [1]. Несмотря на то, что L-яблочная кислота, согласно приведенной ниже схеме, принципиально способна превращаться в аспарат, образование яблочной кислоты предотвращают путем инактивации фумаразы [2, 3].

Штамм *Pectobacterium carotovorum* (MDC-8727) обладает высокой аспартазной активностью и является одним из наиболее перспективных для промышленного производства L-аспарагиновой кислоты с использованием как иммобилизованных, так и свободных клеток бактерии [12]. Технологическое применение указанного штамма в виде неочищенных целых клеток предпочтительнее, так как оно позволяет сделать процесс дешевым и менее трудоемким, а препарат достаточно стабильным с производительностью, удовлетворительной для промышленного применения.



Список сокращений: ОП – оптическая плотность.

В зависимости от схемы технологического процесса синтеза L-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты и методов выделения и очистки конечного продукта, требования, предъявляемые к качеству используемого биокатализатора, разнятся. В технологической схеме (см. схему), в силу своеобразного круговорота фумаровой кислоты, которую использовали в качестве осадителя L-аспарагиновой кислоты, надосадочная жидкость, также содержащая фумаровую кислоту, возвращается на стадию биотрансформации, поэтому отпадает необходимость контроля фумаразной активности [4]. Однако, учитывая, что в ряде случаев целесообразно L-аспарагиновую кислоту выделять серной кислотой, возникает необходимость в полной инактивации фумаразы с минимальным ущербом для аспартазной активности.

Цель настоящей работы – определить для штамма *P. carotovorum* MDC-8727 оптимальные параметры функционирования двух ферментов – фумаразы и аспартазы – и исследовать возможность полной инактивации фумаразы с минимальным ущербом для аспартазной активности.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы и источники фермента

В работе использованы следующие реактивы: фумаровая кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия, 25%-ный водный аммиак (Армения, СНГ). Источником L-аспартазы и фумаратгидратазы служил бактериальный штамм *Pectobacterium carotovorum* MDC-8727 (ранее известный как *Erwinia aroidea*) из коллекции культур микроорганизмов Центра депонирования микробов НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

В качестве препаратов L-аспартазы и фумаратгидратазы использован ферментный экстракт, полученный центрифугированием предварительно обработанной ультразвуком клеточной суспензии, содержащей 1 г влажных клеток в 5 мл 0,1 М раствора фумарата аммония (рН 8,5). Культуру выращивали в жидкой питательной среде при 30 °С в течение 16–18 ч, согласно методике [10].

Определение фумаразной активности *P. carotovorum*

Активность фумаразы измеряли в реакции гидратации фумарата по убыванию субстрата; в термостатируемых пробирках после инкубации ферментного препарата в составе реакционной смеси в течение 10 мин при температуре 37 °С. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: фумаровая кислота – 0,5 М, ферментный препарат – 20 мг/мл, (рН 8,5 доводили 1М раство-

ром гидроокиси натрия). Концентрацию фумарата в реакционной смеси определяли спектрофотометрически (UV-VIS Perkin Elmer 340, США) при длине волны 240 нм после 2500-кратного разбавления образца дистиллированной водой. Коэффициент молярной экстинкции (ϵ) фумаровой кислоты принимали равным 2530 М⁻¹·см⁻¹. Активность (A) выражали в единицах мкмоль (субстрата или продукта)/(мг (влажной биомассы)·мин).

Определение аспартазной активности *P. carotovorum*

Активность аспартазы измеряли в реакции аминирования фумарата по убыванию субстрата; в термостатируемых пробирках после инкубации ферментного препарата в составе реакционной смеси в течение 10 мин при $T=37$ °С. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: фумаровая кислота – 0,5 М; MgSO₄·7H₂O – 10⁻³ М ферментный препарат – 20 мг/мл (рН 8,5 доводили раствором 25%-ного аммиака). Концентрацию фумарата в реакционной смеси определяли аналогично описанному в предыдущем абзаце.

Определение влияния температуры на аспартазную и фумаразную активность *P. carotovorum*

Зависимость активности аспартазы и фумаразы от температуры измеряли в диапазоне температур 6–65 °С.

Определение термостабильности аспартазы и фумаразы *P. carotovorum*

Термостабильность ферментов определяли путем инкубации 100 мкл раствора ферментного препарата при температуре от 35 до 60 °С в течение 60 мин. После чего пробы быстро охлаждали в ледяной бане, добавляли 900 мкл 0,5 М раствора фумарата натрия (аммония) рН 8,5 и измеряли остаточную активность ферментов при температуре 37 °С.

Влияние рН на активность аспартазы и фумаразы *P. carotovorum*

Активность ферментов измеряли при разных значениях рН от 5 до 11, используя в качестве субстрата 100 мМ раствора фумарата натрия (аммония) в трис-цитратном и К-, Na-фосфатном буфере с соответствующими значениями рН.

Влияние рН на стабильность аспартазы и фумаразы *P. carotovorum* при повышенной температуре

Один грамм влажной биомассы клеток суспендировали в 10 мл супернатанта культурального бульона с фиксированным рН в пределах

от 5 до 11. Необходимого значения рН добивались добавлением уксусной кислоты, или 6 н. NaOH. Полученные клеточные суспензии подвергали термообработке, выдерживая при температуре 50 °С в течение 1 ч, затем быстро охлаждали в ледяной бане. Из обработанных таким образом клеток готовили ферментный препарат, после чего измеряли остаточную аспартазную и фумаразную активность, как описано выше. Активность необработанных клеток принимали за 100%.

Влияние продолжительности термической обработки при рН 5 на активность фумаразы и аспартазы *P. carotovorum*

Кислотность супернатанта культурального бульона доводили до значения рН 5 концентрированной уксусной кислотой, после чего суспендировали в нем 1 г влажной биомассы клеток. Полученную суспензию выдерживали в течение разных промежутков времени от 0,5 до 2,5 ч при температуре 50 °С, после чего быстро охлаждали в ледяной бане и измеряли остаточную аспартазную и фумаразную активность.

Представленные в работе данные являются средними значениями не менее трех измерений в каждой точке. Среднее отклонение не превышает 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый штамм-продуцент аспартазы *P. carotovorum* MDC-8727, согласно литературным данным, является носителем также и фумаразы. На рис. 1 приведены кинетические кривые расхода фумарата при участии штамма-продуцента аспартазы *P. carotovorum*.

Для подбора оптимальных условий подавления фумаразной активности нами исследованы некоторые физико-химические характеристики обоих ферментов, бактериального штамма *P. carotovorum*, а также проведены дополнительные эксперименты по определению стабильности ферментов в процессе инактивации.

Исследовано влияние рН на активность обоих ферментов. Как следует из рис. 2, максимумы активности аспартазы и фумаразы *P. carotovorum* близки и находятся в пределах значений рН 8,5–9,0. При рН ≤ 5 активность обоих ферментов минимальна.

На рис. 3 показана зависимость активности обоих ферментов от температуры, а также их термостабильность. Очевидно, что температурные оптимумы активности обоих ферментов достаточно близки и находятся в пределах

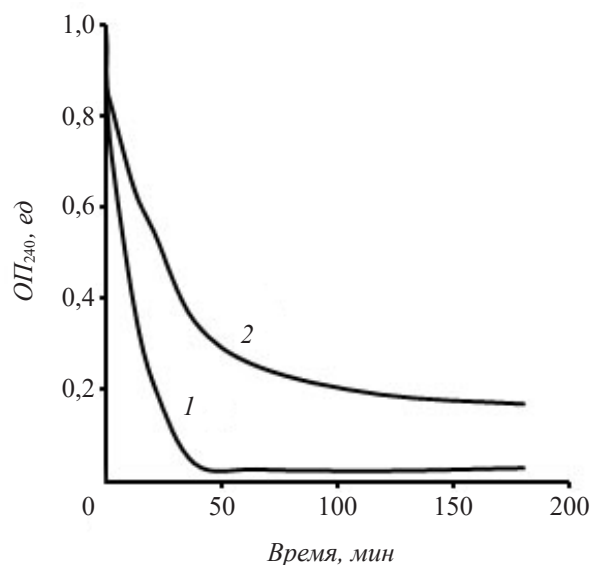


Рис. 1. Кинетические кривые расхода фумаровой кислоты *P. carotovorum*: 1 – в реакции ферментативного аминирования фумарата под действием аспартазы, 2 – в реакции гидратации фумарата под действием фумаразы

Fig. 1. Kinetic curves of fumaric acid consumption by *P. carotovorum*: 1 – in the reaction of enzymatic amination of fumarate, under the influence of aspartase, 2 – in the reaction of hydration of fumarate, under the influence of fumarase

35–40 °С. С повышением температуры аспартаза все еще проявляет высокую активность. Так, при 50 °С активность аспартазы находится на уровне 85% от максимальной при оптимальной температуре, тогда как активность фумаразы около – 30%. Исследование термостабильности

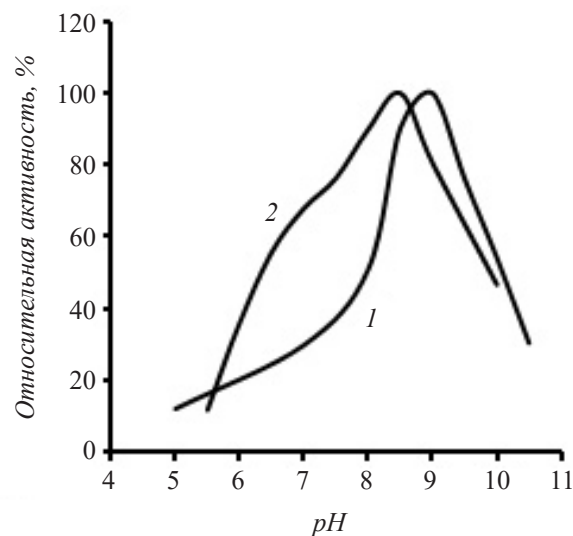


Рис. 2. Влияние рН на активность аспартазы (1), фумаразы (2) *P. carotovorum*

Fig. 2. The effect of pH on the activity of aspartase (1), fumarase (2) of *P. carotovorum*

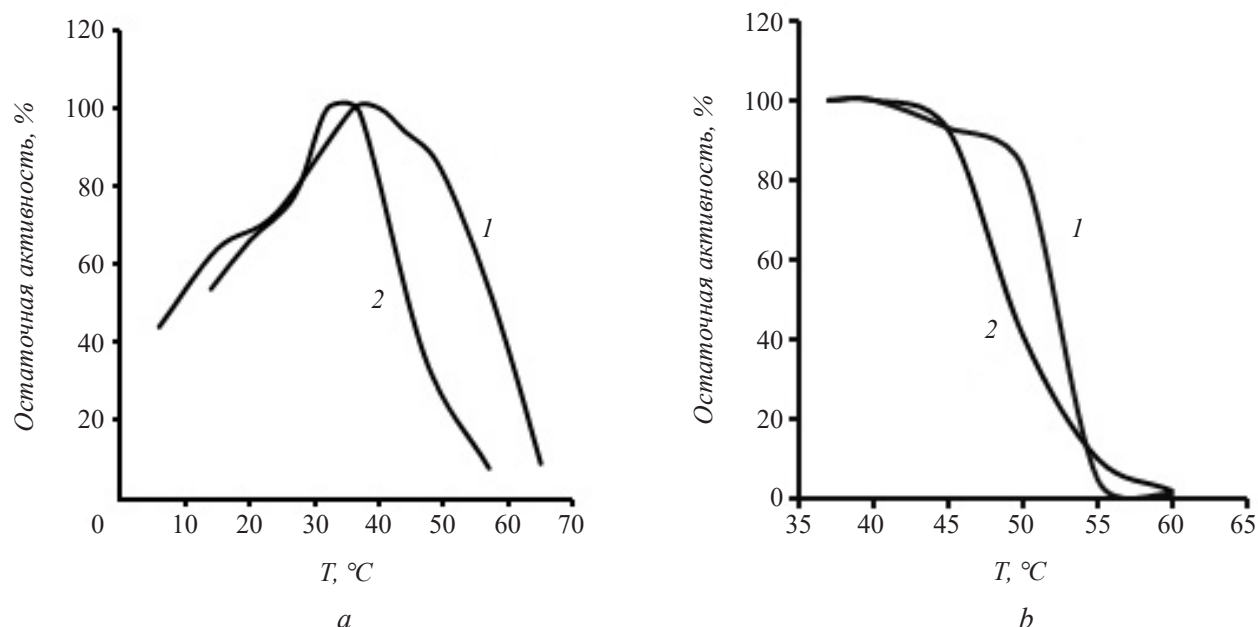


Рис. 3. Влияние температуры на активность (а) и термостабильность (б) аспартазы (1) и фумаразы (2) *P. carotovorum*

Fig. 3. The effect of temperature (a) on the activity and thermostability (b) of fumarase and aspartase of *P. carotovorum*. 1 – fumarase; 2 – aspartase

ферментов показало, что остаточная активность аспартазы после инкубирования в течение 0,5 ч при 50 °С вдвое выше фумаразной. Эта существенная разница в термостабильности была использована как основной фактор в процессе оптимизации условий подавления фумаразной активности.

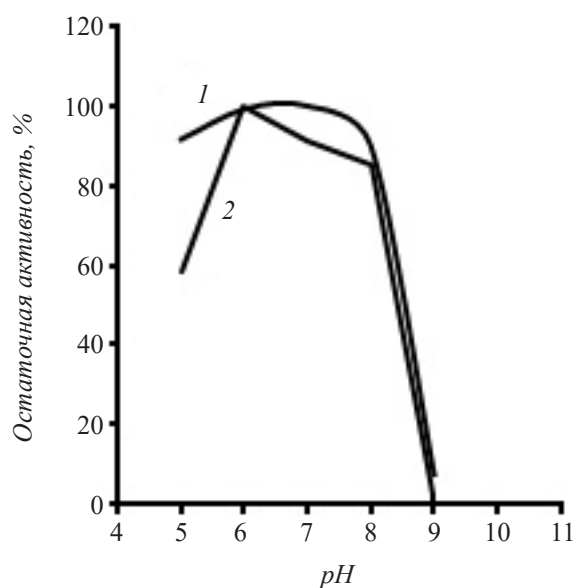


Рис. 4. Влияние pH на стабильность при повышенной температуре: 1 – аспартазы, 2 – фумаразы *P. carotovorum*

Fig. 4. The effect of pH on the stability of at high temperature: 1 – aspartase, 2 – fumarase of *P. carotovorum*

Определено влияние pH на стабильность ферментов *P. carotovorum* при повышенной температуре. Изменение остаточной активности ферментов после выдержки в течение 1 ч при температуре 50 °С и различных значениях pH 5,0–9,0 показано на рис. 4. Исходя из приведенных графиков очевидно, что фумараза подвергается частичной инактивации только при низких значениях pH: при pH 5,0 фумаразная активность клеток снижается до значения 58,3% с сохранением 91,6% аспартазной активности, в диапазоне pH 6,0–9,0 влияние термообработки на оба фермента одинаковое (кривые практически совпадают).

Для максимального устранения фумаразной активности, в следующем эксперименте проводили оптимизацию процесса термообработки при низком значении pH=5 и определяли влияние длительности термической обработки (0,5–2,5 ч) на активность обоих ферментов (табл. 1).

Как видно из табл. 1, кратковременная обработка в течение 0,5 ч не влияет ни на фумаразную, ни на аспартазную активности, увеличение длительности обработки до 1,0 ч приводит к снижению фумаразной активности на ~40%, а до 1,5 ч – на ~95% без существенного ущерба аспартазной активности. Термообработка в течение 2 ч и выше необратимо инактивирует как фумаразу, так и аспартазу.

В результате проведенных исследований нами определены оптимальные параметры функционирования двух ферментов аспартазы и фумаразы

Влияние длительности термической обработки при pH 5 на активность аспартазы и фумаразы *P. carotovorum*Effect of heat treatment duration at pH 5 on activity of *P. carotovorum* aspartase and fumarases

Фермент	Продолжительность обработки, ч					
	Контроль	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Фумараза	100,0	98,2	58,7	5,7	0,0	0,0
Аспартаза	100,0	99,3	99,2	98,2	1,9	0,0

Примечание: Контроль – без термической обработки.

бактериального штамма *P. carotovorum* MDC-8727 – продуцента аспартазы. Как температурный, так и pH-оптимум обоих ферментов близки и находятся в пределах 35–40 °C и 8,5–9,0 соответственно. При температуре 50 °C термостабильность аспартазы вдвое выше фумаразной. Исходя из этого, были подобраны условия инактивации фумаразы. Установлено, что термическая обработка биомассы клеток в культуральной жидкости при низких значениях pH способствует частичной инактивации фумаразы. Термическая обработка клеток при pH 5 в течение 90 мин способствует полной инактивации фумаразы без ущерба для аспартазной активности. В отличие от данных некоторых литературных источников [2], подобранные условия инактивации фумаразы *P. carotovorum* MDC-8727 не требуют ни длительной жесткой термообработки, ни введения в раствор L-аспарагиновой кислоты в качестве протектора аспартазы, что является их несомненным преимуществом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takamatsu S., Umemura I., Yamamoto K., et al. Production of L-alanine from ammonium fumarate using two-immobilized microorganisms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1982, 15(3), 147–152.
2. Chibata I., Tosa T., Sato T. Improvement of production of L-aspartic acid using immobilized microbial cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1984, 20, 291–295.
3. Vrsalovich Presecki A., Zelic B., Vacic-Racki D. Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized bakers yeast cells. *Enzyme Microbial Technol.*, 2007, 41, 605–661. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.05.007
4. Алебян Г.П., Мелконян А.Б., Измаилян М.С. Новая технологическая схема получения аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты биотрансформацией с улучшенными экологическими характеристиками. *Биотехнология*, 1999, 3, 73–80.
5. Абебян В.А. Получение и применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов. Ереван: Изд-во АН Арм ССР, 1989, 6–391.
6. Алебян Г.П., Кочаров С.Л., Мелконян А.Б., Измаилян М.С. Усовершенствованная технология получения L-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты методом биотрансформации. *Журн. прикл. хим. Армении*, 1999, 1–2, 66–72.
7. Арзуманов Е.Н., Тозалакян П.В., Мелконян А.Б. и др. Способ получения L-аспарагиновой кислоты. Авт. Свид. СССР 1552650; С12Р13/20.1989.
8. Арзуманов Е.Н., Алебян Г.П., Тозалакян П.В. и др. Способ получения L-аспарагиновой кислоты. Авт. свид. СССР 1559716; С12Р13/20, С12Н11/04. 1989
9. Арзуманов Е.Н., Тозалакян П.В., Антонян А.П. и др. Способ получения L-аспарагиновой кислоты. Авт. Свид. СССР 1192366; С12Р13/20.
10. Алебян Г.П., Тозалакян П.В., Габриелян Ф.К. и др. Влияние поверхностно-активного вещества БА-420 на проявление аспартазной активности клеток *Erwinia aroidea*. *Биол. журн. Армении*, 1997, 50(3–4), 234–240.
11. Szymanska G., Sobierajski B and Chmiel A. Immobilized cells of recombinant *Escherichia coli* strain for continuous production of L-aspartic acid. *Polish J. Microbiol.*, 2011, 60(2), 105–112.
12. Дюкова К.Г., Измаилян М.С., Киносян М.А. и др. Сравнительный анализ оптимальных условий функционирования штаммов-продуцентов с выраженной аспартазной активностью. *Биотехнология*, 2018, 1, 24–34. doi: 10.21519/0234-2758-201834-1-24-34

Improvement of catalytic properties of the strain producing aspartase *Pectobacterium carotovorum* in the process of obtaining L-aspartic acid

K. G. DYUKOVA^{1,*}, M. S. IZMAILYAN¹, A. M. PALOYAN¹, A. A. HAMBARTSUMYAN¹

¹*SRC Armbiotechnology, National Academy of Sciences of Republic of Armenia, Yerevan, 0056 Armenia*

**e-mail*: karina_dukova@yahoo.com

Received July 31, 2019

Revised October 27, 2019

Accepted November 17, 2019

The paper presents the results of studies to determine the optimal functioning parameters of aspartase and fumarase of the bacterial strain *P. carotovorum* MDC-8727, an aspartase producer. The temperature and pH optima of both enzymes are close and are in the range of T (35–40 °C) and pH (8.5–9.0). At a temperature of 50 °C, the thermal stability of aspartase is twice higher than that of fumarase. It was found that thermal treatment of cell biomass in the culture broth at low pH values contributed to the partial inactivation of fumarase. A similar treatment of cells at temperature of 50 °C and pH 5 for 90 minutes contributed to the complete inactivation of fumarase without harming the aspartase activity.

Key words: fumarase, aspartase, L-aspartic acid, biotransformation

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-30-35