

## Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.112.384.2.088.6 + 577.112.382.3.088.6

### Сравнительный анализ оптимальных условий функционирования штаммов-продуцентов с выраженной аспартазной активностью

© 2018 К.Г. ДЮКОВА\*, М.С. ИЗМАИЛЯН, М.А. КИНОСЯН, Т.С. ДАВИДЯН, В.Т. КОЧИКЯН

НПЦ «Армбиотехнология» Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, 0056, Армения

e-mail: karina\_dukova@yahoo.com\*

Поступила 16.10.2017 г.

Принята в печать 13.12.2017 г.

Приведены результаты исследований по разработке эффективной питательной среды для выращивания штаммов бактерий – продуцентов аспартазы. Предлагаемая нами среда на основе L-аспарагиновой кислоты обеспечивает быстрый рост культур с высокой аспартазной активностью. Оптимальная температура реакции аминирования фумарата составила  $40 \pm 3$  °С. Показано, что фермент подвергается резкой инактивации при температуре выше 50 °С. Значения энергии активации, рассчитанные для реакции с участием L-аспартазы из десяти штаммов бактерий (рН 8,5), варьируют в пределах 5,4–9,6 ккал/(мол·К), а величины температурного коэффициента колеблются в пределах 1,3–2,2. Выявлено пять штаммов – продуцентов аспартазы: *Rhizobium radiobacter* MDC-8794, *Pectobacterium carotovorum* MDC-8704, *P. carotovorum* MDC-8724, *P. carotovorum* MDC-8727 и *P. carotovorum* MDC-8758, которые в связи с их высокими активностью и термостабильностью могут представлять интерес для использования в качестве биокатализатора при производстве L-аспарагиновой кислоты. Осуществлена приблизительная оценка влияния снижения температуры реакции на сохранение удельной ферментативной активности аспартазы. Показано, что при этом, несмотря на замедление скорости реакции, можно добиться значительного увеличения стабильности биокатализатора.

**Ключевые слова:** аспартаза, L-аспарагиновая кислота, биотрансформация.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-1-24-34

Промышленное применение ферментов в качестве биологических катализаторов постоянно растет благодаря их уникальным каталитическим свойствам и эффективности действия. Аспартаза, широко используемая в настоящее время для производства L-аспарагиновой кислоты, является одним из самых ранних примеров такого успешного применения.

Аспартазная активность встречается преимущественно у бактерий. Существуют отдельные сообщения об обнаружении этой активности у некоторых растений и водных видов (микроорганизмов, моллюсков), однако основным источником аспартаза на сегодняшний день яв-

ляются все же бактерии. Аспартазная активность впервые была обнаружена у нескольких различных факультативных аэробов; впоследствии фермент был идентифицирован и очищен из различных видов бактерий, в том числе *Pseudomonas fluorescens*, *Hafnia alvei* (*Bacterium cadaveris*), *Escherichia coli*, *Erwinia aroidea* и др. В работе [1] было высказано предположение, что в естественных условиях функция аспартазы является главным образом деградационной, т.е. состоит в расщеплении аспарагиновой кислоты, высвобождении аммиака и продукции фумарата, который включается в цикл трикарбоновых кислот.

Список сокращений: БВК – белково-витаминный концентрат; ФК – фумаровая кислота.

Бактериальный фермент аспартаза (L-аспарат-аммиак-лиаза, КФ 4.3.1.1) катализирует обратимое дезаминирование L-аспарагиновой кислоты с образованием фумарата и иона аммония (рис. 1) с практически абсолютной специфичностью [2].

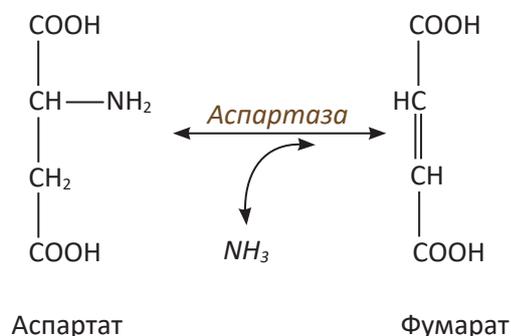


Рис. 1. Обратимое дезаминирование L-аспарагиновой кислоты, катализируемое аспартазой

Несмотря на многолетние исследования самого фермента и структурных аналогов субстрата, ученым не удалось выявить альтернативные L-аспарагиновой кислоте соединения, подвергающиеся воздействию аспартазы [3, 4]. Было показано, что добавление магния влияет на константу равновесия катализируемой аспартазой реакции дезаминирования, а присутствие определенных ионов двухвалентных металлов способствует стабильности фермента [5, 6].

Опубликованы многочисленные данные, характеризующие различные свойства аспартаз: кинетические характеристики, отношение к ингибиторам/активаторам, потребность в ионах металлов, оптимальные значения pH и температуры, субстратная специфичность, строение активного центра фермента, механизм действия аспартазы, механизм ее инактивации и т.д. [2–8]. Несмотря на большой объем работ, проделанных на протяжении около ста лет, недавние исследования выявили некоторые интересные и неожиданные аспекты функционирования этого достаточно хорошо охарактеризованного фермента. В частности, было показано, что нелинейная кинетика, которая наблюдается в аспартазной реакции при pH выше нейтрального значения, является результатом активности отдельного регуляторного участка, для которого субстрат – аспарагиновая кислота – может играть роль активатора. Удаление карбоксильной группы в определенных положениях приводит к повышению каталитической активности аспартазы. Было также показано, что аспарта-

за у некоторых организмов обладает неферментативной активностью: она проявляет себя как эффектор, который вносит свой вклад в активацию плазминогена, в результате чего образуется растворяющий сгустки плазмин [9–11].

Открытия последних лет, основанные на бурном развитии исследовательской базы, способствовали тщательному и всестороннему исследованию фермента из уже хорошо известных микроорганизмов и описанию его свойств. Одновременно с этим на сегодняшний день актуальным остается и поиск новых источников высокоактивных носителей аспартазы среди объектов ранее неизвестных, обладающих необычными и интересными свойствами, что, возможно, будет способствовать более точному определению роли и функции аспартазы в естественных условиях.

Цель данной работы – обнаружение новых активных культур – продуцентов аспартазы, определение оптимальных условий их функционирования и разработка эффективных методов сохранения их ферментативной активности в процессе использования.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы и источники фермента

В работе использованы следующие реактивы: L-аспарагиновая кислота производства НИИ биотехнологии (Республика Армения); фумаровая кислота, 25%-ный водный аммиак, гидроксид калия, гидроксид натрия, сульфат магния – все реактивы марки «х.ч.» (производства Армении и стран СНГ). Источником L-аспартазы служили десять штаммов бактерий из коллекции культур микроорганизмов Центра депонирования микробов НПЦ «Армбиотехнология» (табл. 1). Гидролизат БВК и другие гидролизаты получали в НПЦ «Армбиотехнология» путем кислотного гидролиза соответствующих сухих порошков в растворе 4 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в процессе автоклавирования в течение 2 ч при 1,5–2,0 атм с последующим выдерживанием в течение 18 ч.

### Среды

Для выращивания культур, продуцирующих аспартазу, использовали семь вариантов питательных сред (табл. 2).

Все среды готовили на водопроводной воде и стерилизовали при 1 атм в течение 30 мин. В качестве препарата L-аспартазы использовали надосадочную жидкость (грубый экстракт). Ее получали центрифугированием предварительно

## Список штаммов-продуцентов L-аспартазы

## List of aspartase-producing strains

Номер штамма*	Вид	Происхождение, регион
8704	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> )	Корнеплод моркови, Армения
8706	<i>P. carotovorum</i> ( <i>E. carotovora</i> )	То же
8720	То же	Плод томата, Армения
8724	»»»	То же
8727	»»»	»»»
8758	»»»	»»»
8794	<i>Rhizobium radiobacter</i> ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	Корень яблони, Армения
5116	<i>Diplococcus</i> sp.	Водоем (вода), Индия
4701	<i>Bacillus</i> sp.	То же
4702	То же	Водоем (ил), Индия

\*Номер штамма в коллекции MDC (здесь и в табл. 3, 4 и 5).

Таблица 2

## Состав питательных сред для выращивания продуцентов L-аспартазы (pH 7,2)

## Composition of nutrient media for growing of L-aspartase producers (pH 7.2)

Компонент среды	Состав семи вариантов среды, %						
	1	2	3	4	5	6	7
Гидролизат БВК	–	–	–	–	–	2,5	–
Гидролизат сои	–	–	–	–	–	–	2,5
Гидролизат рыбной муки	0,8	0,8	–	–	–	–	–
Дрожжевой экстракт	–	–	–	0,55	0,55	–	–
Пептон	–	–	–	–	1,8	–	–
Фумаровая кислота	–	0,9	–	–	–	0,9	0,9
L-asr	–	–	2	2	2	–	–
NaCl	0,4	0,4	–	–	–	–	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	0,05	0,05	0,05	–	–
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	–	–	0,05	0,05	0,05	–	–
FeSO <sub>4</sub>	–	–	0,001	–	–	–	–

обработанной ультразвуком клеточной суспензии (дезинтегратор Labsonic 2000 (B. Braun, Германия) в течение 5 мин при частоте 20 кГц и мощности 300 Вт), содержащей 1 г влажных клеток в 5 мл 0,1 М раствора фумарата аммония (pH 8,5). Культуры выращивали в жидкой питательной среде (см. табл. 2) при 30 °С в течение 16–18 ч в колбах объемом 500 мл, содержащих 100 мл питательной среды, на круговых качалках со скоростью вращения 200 об/мин согласно методике [12]. Препараты хранили в холодильнике при температуре –25 °С.

## Определение аспартазной активности

Активность L-аспартазы в реакции аминирования фумарата измеряли в термостатируемых пробирках (объем 3 мл) после инкубации ферментного препарата в составе реакционной смеси в течение 10 мин при температуре 37 °С. Реакционная смесь (конечный объем 1,0 мл) содержала следующие компоненты: фумаровая кислота – 1 М; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 10<sup>-3</sup> М; ферментный препарат – 20 мг/мл; pH 8,5.

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 ( $\epsilon$ ) фумаровой кислоты при максимуме поглощения (240 нм) экстраполировали на  $\epsilon_{412} = 2530 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Активность  $A$  выражали в количестве мкмоль субстрата или продукта на 1 мг влажной биомассы в 1 мин (мкмоль/(мг мин)).

Для определения оптимальной температуры действия аспартаз измеряли активность препаратов в диапазоне температур 6–65 °С.

Производили также расчет температурного коэффициента  $\gamma$ , показывающего увеличение скорости реакции при повышении температуры реакционной среды на 10 °С (правило Вант-Гоффа).

### Определения термостабильности аспартаз

Термостабильность ферментного препарата (объем пробы 100 мкл) определяли путем его инкубации при различной температуре от 35 до 60 °С в течение 60 мин при pH 8,5. Затем пробы быстро охлаждали в ледяной бане, добавляли 900 мкл 1 М раствора фумарата аммония (pH 8,5) и измеряли остаточную активность аспартазы при температуре 37 °С.

### Оценка влияния температуры на активность аспараз на основе их функциональных характеристик

Для оценки основных функциональных свойств ферментов в зависимости от температуры на базе полученных экспериментальных данных использовали нижеприведенные формы уравнения Аррениуса:

экспоненциальная форма

$$k = S \cdot e^{-E_a/RT};$$

логарифмические формы

$$\ln k = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln S,$$

$$\lg k = -\frac{E_a}{2.303R} \cdot \frac{1}{T} + \lg S,$$

$$\lg \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.303R} \cdot \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2},$$

где  $k$  – константа скорости реакции,  $S$  – предэкспоненциальный множитель,  $E_a$  – энергия актива-

ции реакции,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура.

Расчеты проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Excel. Представленные в работе данные являются средними не менее трех измерений для каждого значения температуры (среднее отклонение  $\leq 5\%$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью оптимизации состава среды для биосинтеза L-аспартазы были протестированы одна синтетическая, две полусинтетические и четыре полноценные среды с различным набором добавок. Результаты, характеризующие общий выход биомассы и удельную активность клеточных экстрактов в зависимости от состава питательной среды, приведены в табл. 3 и 4. Данные этих таблиц показывают, что исследованные бактерии обнаруживают более высокую аспартазную активность при выращивании на среде 2 на основе гидролизата рыбной муки с добавлением фумаровой кислоты, чем без нее на среде 1 (см. табл. 4). Эти микроорганизмы были способны к росту на аспарагиновой кислоте в качестве единственного источника углерода и азота. На синтетической среде 3, содержащей L-asp в качестве единственного источника углерода и азота, наблюдается сравнительно медленный рост культур и низкая удельная активность (см. табл. 3 и 4). Введение в нее дрожжевого экстракта (среда 4) способствует увеличению как ферментативной активности, так и биомассы клеток. Добавление пептона в среду с дрожжевым экстрактом приводит к резкому повышению аспартазной активности и выхода биомассы (среда 5). При содержании в среде 2,5% гидролизата БВК или сои (среды 6 и 7, соответственно) наблюдается повышенное накопление биомассы микроорганизмов и интенсивная продукция аспартазной активности. Самая высокая ферментативная активность наблюдается у всех штаммов при выращивании на среде 5, содержащей L-аспарагиновую кислоту и обогащенной дрожжевым экстрактом и пептоном (см. табл. 4). Хороший рост продуцентов аспартазы и сравнительно высокая активность наблюдаются также на полноценных средах 2, 6 и 7 (см. табл. 3 и 4). Для дальнейшей работы нами была отобрана среда 5 как обеспечивающая максимальные рост бактерий и продукцию аспартазы.

Для выявления наиболее перспективного штамма-продуцента аспартазы в первую очередь необходимо было исследовать функциональные

**Общий выход биомассы штаммов бактерий – продуцентов L-аспартазы на различных средах****Total biomass yield of bacteria strains producing L-aspartase on various media**

Номер штамма	Выход биомассы (г) на семи вариантах среды						
	1	2	3	4	5	6	7
5116	1,06	1,47	0,66	1,04	1,29	0,75	1,05
4701	0,22	0,30	0,29	0,48	0,55	0,83	1,24
4702	0,24	0,33	0,27	0,44	0,55	0,28	0,33
8794	0,39	0,54	0,45	0,65	0,80	0,97	0,67
8704	0,47	0,66	0,43	0,64	0,80	1,00	1,17
8706	0,29	0,40	0,27	0,40	0,50	0,63	0,50
8720	0,63	0,87	0,73	1,13	1,40	2,62	2,32
8724	0,40	0,57	0,52	0,78	0,97	0,60	0,73
8727	0,38	0,53	0,48	0,71	0,88	0,93	0,80
8758	0,36	0,53	0,45	0,69	0,86	0,85	0,77

Примечание: состав сред (1–7) по табл. 2.

**Удельная активность L-аспартазы у исследуемых штаммов-продуцентов на семи различных средах****Specific activity of L-aspartase in studied producing strains on seven various media**

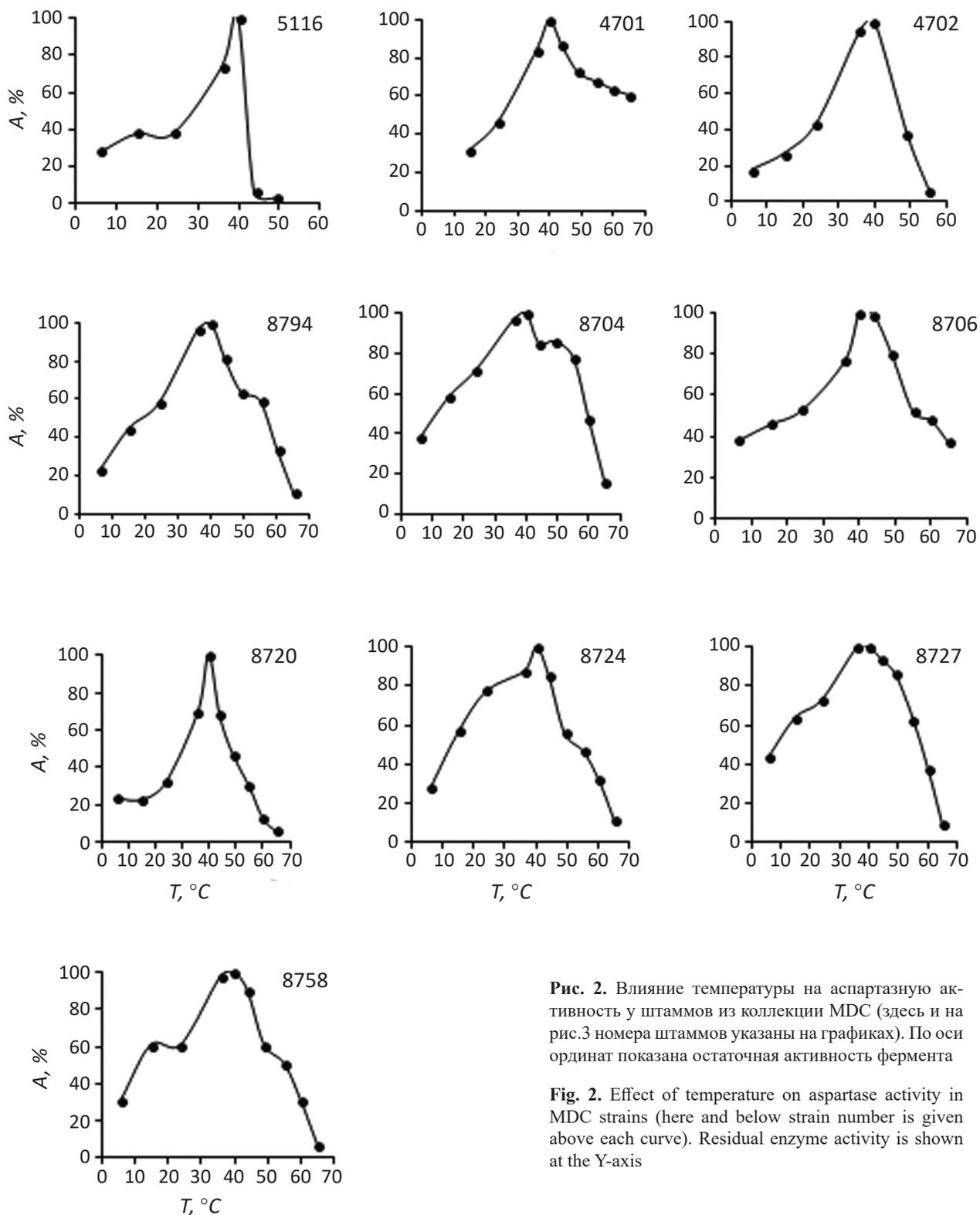
Номер штамма	Удельная активность на семи вариантах среды, мкмоль/(мг·мин)						
	1	2	3	4	5	6	7
5116	0,09	0,20	0,07	0,25	0,45	0,37	0,16
4701	0,25	0,56	0,20	0,65	1,14	0,11	0,18
4702	0,15	0,34	0,12	0,23	0,40	0,06	0,09
8794	0,73	1,64	0,59	2,25	3,92	1,87	2,80
8704	0,90	2,00	0,72	1,61	2,82	1,71	1,57
8706	0,58	1,30	0,47	0,61	1,06	0,36	0,68
8720	0,08	0,18	0,06	0,22	0,39	0,29	0,27
8724	0,83	1,85	0,66	1,34	2,34	1,49	0,96
8727	0,76	1,69	0,60	1,91	3,45	1,55	2,88
8758	0,88	1,95	0,69	1,82	3,20	2,50	2,76

Примечание: состав сред (1–7) по табл. 2.

характеристики аспартаз, такие как оптимальная температура действия, термостабильность, энергия активации и температурный коэффициент. Влияние температуры на скорость аспартазной реакции было изучено в диапазоне 6–65 °С при концентрации субстрата фумарата аммония 1 М и ионов магния  $10^{-3}$  М. Как видно из приведенных графиков (рис. 2), у всех аспартаз скорость ферментативной реакции экспоненциально возраста-

ет до значений температуры 40 °С, затем постепенно понижается вследствие тепловой инактивации и при 65 °С составляет в среднем 7–11 % от максимального значения. У двух аспартаз отрезок кривой, отображающий снижение активности реакции в диапазоне высоких температур, более пологий, что свидетельствует о более низкой скорости инактивации данных ферментов при высоких температурах. Остаточная активность при 65 °С

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ



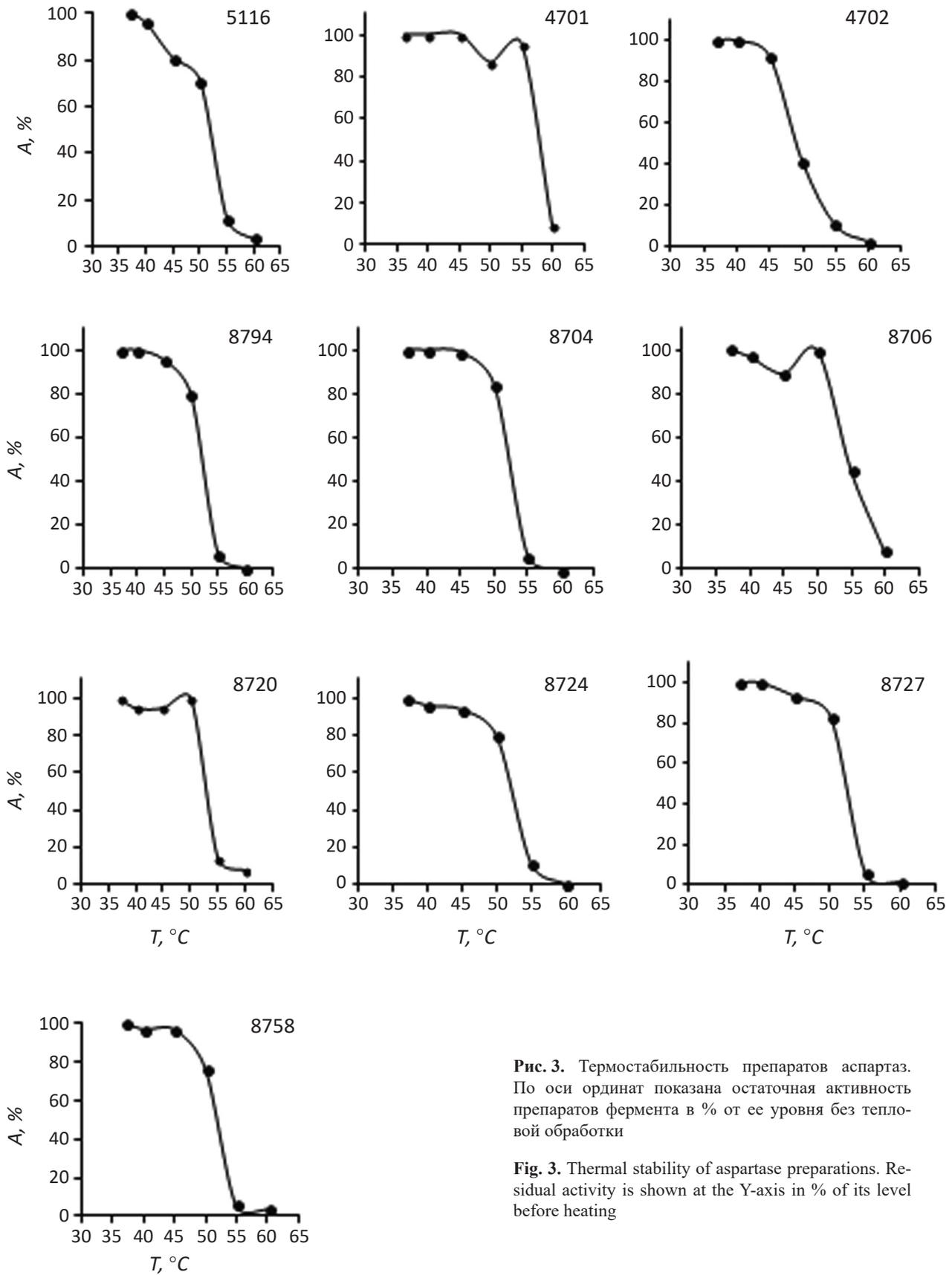
**Рис. 2.** Влияние температуры на аспартазную активность у штаммов из коллекции МДС (здесь и на рис.3 номера штаммов указаны на графиках). По оси ординат показана остаточная активность фермента

**Fig. 2.** Effect of temperature on aspartase activity in MDC strains (here and below strain number is given above each curve). Residual enzyme activity is shown at the Y-axis

составляет 61% от максимального значения для *Bacillus* sp. MDC-4701 и 37% для *P. carotovorum* MDC-8706 (см. рис. 2).

Результаты изучения термостабильности представлены графически на рис. 3. (активность фермента без тепловой обработки принята за 100%).

Таким образом, было установлено, что ферментные препараты всех клеточных экстрактов за исключением двух подвергаются резкой инактивации в результате 60 мин инкубации при температуре, превышающей 50 °С. Остаточная активность уже при 55 °С в среднем составляет 6–13% от



**Рис. 3.** Термостабильность препаратов аспартаз. По оси ординат показана остаточная активность препаратов фермента в % от ее уровня без тепловой обработки

**Fig. 3.** Thermal stability of aspartase preparations. Residual activity is shown at the Y-axis in % of its level before heating

максимального значения. В то же время, аспартаза штамма *Bacillus* sp. MDC-4701 стабильна и при 55 °С и резко инактивируется в промежутке между 55–60 °С. В случае же аспартазы *P. carotovorum* MDC-8706 остаточная активность ферментного препарата при 55 °С сохраняется на уровне 45%.

Было так же установлено (см. рис. 2 и 3), что оптимальная температура реакции аминирования фумарата аспартазой составляет 40±3 °С, что совпадает с температурой, при которой аспартаза наиболее термостабильна. На практике, как известно, оптимальной для достижения максимальной скорости реакции считается температура 37 °С.

На рис. 4 приведены графики зависимости логарифма начальной скорости реакции аминирования фумарата –  $\lg(V_r)$  – от обратного значения абсолютной температуры –  $1/T$ . Как видно, в интервале температур 6–40 °С по Цельсию (что на рис. 4 при использовании °К соответствует  $1/T = 0,003584229–0,003195$ ) полученные зависимости имеют прямолинейный характер, т. е. подчиняются уравнению Аррениуса. Рассчитанное в этом температурном интервале значение энергии активации реакции аминирования фумарата  $E_a$  для аспартаз из исследуемых штаммов приведено в

Таблица 5

**Энергия активации ( $E_a$ ), рассчитанная для температурного интервала 6–40 °С, и температурный коэффициент ( $\gamma$ ) в интервале 27–37 °С реакции аминирования фумарата с участием штаммов бактерий – продуцентов аспартазы**

**Activation energy ( $E_a$ ) for temperature interval 6–40 °С and temperature coefficient,  $\gamma$ , in the 27–37 °С interval of reaction of fumarate amination by aspartase-producing bacteria strains**

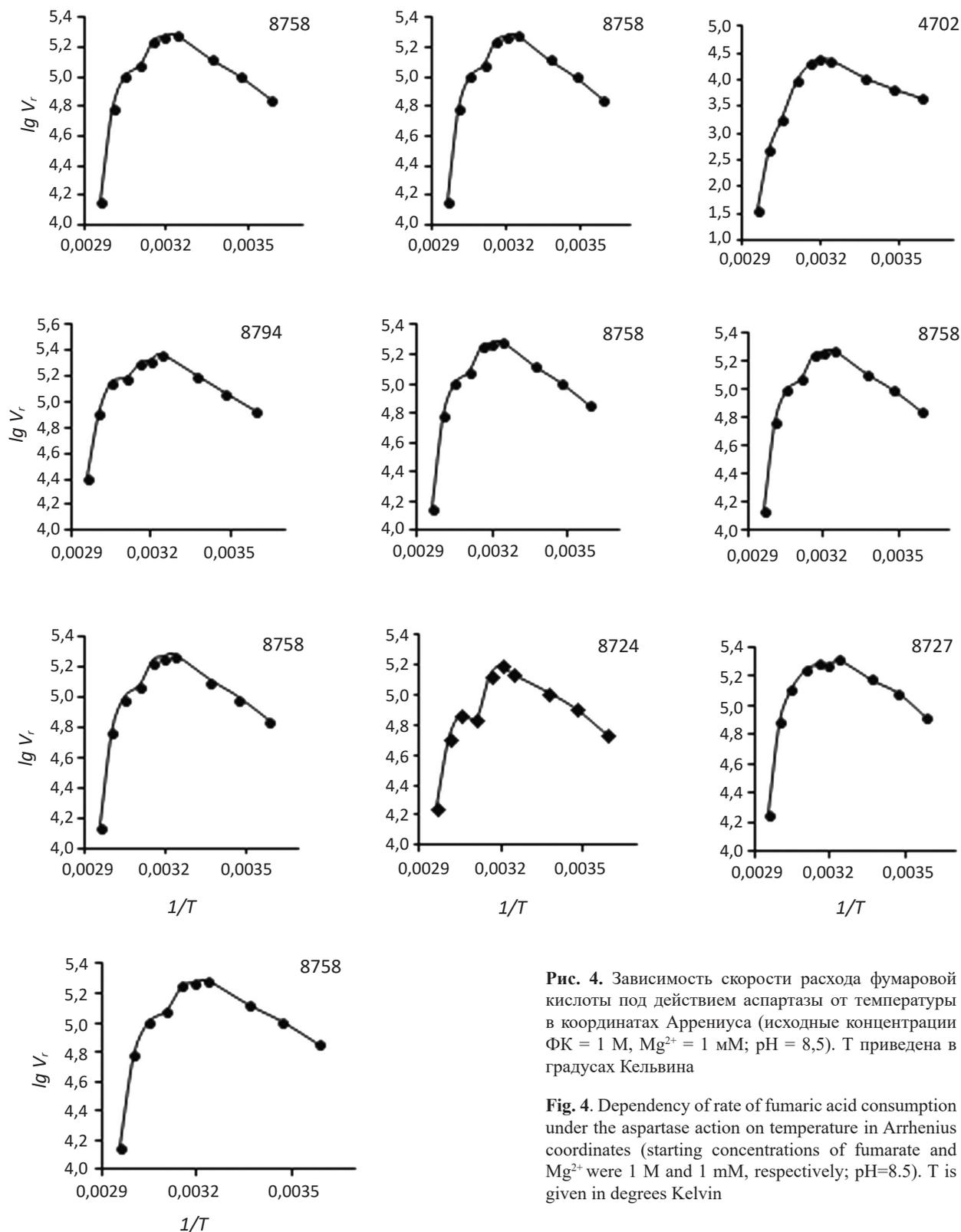
Номер штамма	$E_a$ , ккал/(моль·К)	$\gamma$
5116	9,352	1,95
4701	8,164	1,82
4702	9,560	2,16
8794	5,524	1,36
8704	5,364	1,35
8706	7,686	1,64
8720	9,399	1,94
8724	5,301	1,33
8727	5,414	1,37
8758	5,445	1,27

табл. 5; там же указаны значения коэффициента  $\gamma$ , показывающего увеличение скорости реакции при повышении температуры на 10 °С [13].

Как видно из приведенной таблицы, наибольшее значение энергии активации наблюдается для реакции, катализируемой L-аспартазой следующих штаммов бактерий: *Diplococcus* sp. MDC-5116, *Bacillus* sp. MDC-4702 и *P. carotovorum* MDC-8720. У этих штаммов наблюдается также наивысшее значение температурного коэффициента  $\gamma$  (1,94–2,16). В других случаях значения энергии активации значительно ниже, а температурные коэффициенты колеблются в пределах 1,3–1,8. Сравнительный анализ показал, что значения энергии активации реакции аминирования фумарата, полученные в данной работе, частью совпадают с рассчитанными на основании литературных данных (5,4 ккал/(моль·К), 7,4 и 8,3 ккал/(моль·К) [14–16]), а частью – несколько превышают эти значения (например, ~9,4 ккал/(моль·К)). Несмотря на превышение, все значения энергии активации находятся в пределах, характерных для процессов, лимитируемых диффузией, хотя специально проведенный опыт показал, что скорость данной реакции не зависит от условий перемешивания.

Как и следовало ожидать, уровень энергии активации, равный 5,4 ккал/(моль·К), ниже, чем значения, характеризующие многие другие ферментативные реакции, и значительно ниже уровня, присущего чисто химическим реакциям [17]. Низкое значение энергии активации реакции аминирования фумарата определяет и низкое значение температурного коэффициента реакции; однако при этом в наших экспериментах наблюдалась высокая скорость реакции. Это наблюдение касается аспартаз следующих пяти штаммов-продуцентов: *Rhizobium radiobacter* MDC-8794, *Pectobacterium carotovorum* MDC-8704, *P. carotovorum* MDC-8724, *P. carotovorum* MDC-8727, *P. carotovorum* MDC-8758, которые в связи с этим могут представлять определенный интерес при использовании в качестве биокатализатора в производстве L-аспарагиновой кислоты.

Полученные значения энергии активации и теплового коэффициента позволили, в частности, установить связь между температурой инкубации и стабильностью фермента. Температурный фактор, как мы предполагаем, в данном случае может служить инструментом для регулирования соотношения скорости реакции аминирования фумарата и падения активности аспартазы, что немаловажно при использовании вышеперечисленных



**Рис. 4.** Зависимость скорости расхода фумаровой кислоты под действием аспартазы от температуры в координатах Аррениуса (исходные концентрации ФК = 1 М,  $Mg^{2+}$  = 1 мМ; рН = 8,5). Т приведена в градусах Кельвина

**Fig. 4.** Dependency of rate of fumaric acid consumption under the aspartase action on temperature in Arrhenius coordinates (starting concentrations of fumarate and  $Mg^{2+}$  were 1 M and 1 mM, respectively; pH=8.5). T is given in degrees Kelvin

штаммов-производителей в производстве. Энергия активации в 5,4 ккал/(моль·К) сочетается с низким температурным коэффициентом ферментативной реакции (~1,33). Следовательно, проведение аминирования фумарата при сравнительно низкой температуре реакционной среды, напри-

мер при 17 °С вместо 37 °С, приведет к снижению скорости реакции в ~1,8 раз. Учитывая, что значение энергии активации фермента по крайней мере на порядок выше величины энергии его термической инактивации, теоретически указанное снижение температуры на 20 °С может привести

к увеличению стабильности фермента в 100 раз. Приведенный материал свидетельствует о том, что если реакцию синтеза L-аспарагиновой кислоты проводить при температуре, близкой к комнатной, то, несмотря на замедление скорости реакции, можно ожидать значительной стабилизации биокатализатора.

## ЛИТЕРАТУРА

- Halpern Y.S, Umbarger H.E. Conversion of ammonia to amino groups in *Escherichia coli*. *Biochem.*, 1960, 80, 285–288.
- Woolf B. Some enzymes in *E. Coli communis* which act on fumaric acid. *Biochem. J.*, 1929, 23, 472–482.
- Virtanen A.L. Elifolk N. Aspartase. *Methods Enzimol.*, 1955, 2, 386–390
- Flzone C.J., Karsten W.E., Conley J.D., Viola R.E. L-aspartase from *Escherichia coli*: substrate specificity and the role of divalent metal ions. *Biochem.*, 1988, 27, 9089–9093.
- Karsten W.E., Viola R.E. Kinetic studies of L-aspartase from *Escherichia coli*: pH-dependent activity changes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, 287(1), 60–67.
- Crow V.L. Properties of alanine dehydrogenase and aspartase from *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1987, 1885–1982.
- Takamatsu S., Yamashita K. Optimization of l-aspartic acid production using immobilized *Escherichia coli* cells without regard to decay of aspartic activity. *J. Engin. Japan*. 1984, 17(4), 406–409.
- Viola R.E. L-aspartase: New tricks from an old enzyme. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biology*, 1998, 74, 295–341.
- Wang L. Kong X. Zhang H. Wang X., Zhang J. Enhancement of the activity of L-aspartase from *Escherichia coli* by directed evolution. *Biochemical and biophysical reserch communications*, 2000, 276, 346–349.
- Kong X., Li Z., Gou X. et al. A monometric L-aspartase obtained by *in vitro* selection. *J. Biological Chem.*, 2002, 277(27), 24289–24293.
- Sjostrom I., Grondahl H., Falk G., et al. Purification and characterization of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Seguece determination reveals identity with aspartase. *Biochim. Biophys. Acta Bio Membr.*, 1997, 1324, 182–190.
- 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.
- Stearn A.E. Kinetics of biological reactions with special reference to enzymatic processes. *Adv. Enzimol.*, 1949, 9, 25–74.
- Алебян Г.П., Кочаров С.Л., Мелконян А.Б., Измаилян М.С. Журн. приклад. хим. Армении, 1999, 1–2, 66–62.
- Абебян В.А. Получение и применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов. Ереван: Изд-во АН Арм. ССР, 1989.
- Jandel A.S., Husted H., Wandrey C. Continuous production of L-alanine from fumarate in a two-stage membrane reactor. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1982, 15, 59–63.
- Бреслер С.Е. Введение в молекулярную биологию. М.: Наука, 1966.

## Comparative Analysis of Optimal Conditions for Functioning of Producing Strains with Pronounced Aspartic Activity

K.G. DYUKOVA\*, M.S. IZMAILYAN, M.A. KINOSYAN, T. S. DAVIDYAN, and V.T. KOCHIKYAN

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

*e-mail: karina\_dukova@yahoo.com\**

Received 16.10.2017

Accepted 13.12.2017

**Abstract**—The work presents the results of the design of an effective nutrient medium for growing strains of aspartase-producing bacteria. The suggested medium based on L-aspartic acid provides a rapid culture growth with high aspartic activity. The optimal temperature of the reaction of fumarate amination was determined to be  $40 \pm 3$  °C, and it was shown that the enzyme undergoes a sharp inactivation at temperature over 50 °C. The activation energy values calculated for the reaction catalyzed by L-aspartase for 10 bacteria strains (at pH 8.5) were in the diapason 5.4–9.6 Kcal/(mol·K), and the temperature coefficients ranged

from 1.3 to 2.2. Five aspartase producers that were identified as *Rhizobium radiobacter* MDC-8794, *Pectobacterium carotavorum* MDC-8704, *Pectobacterium carotavorum* MDC-8724, *Pectobacterium carotavorum* MDC-8727, and *Pectobacterium carotavorum* MDC-8758, may represent a specific interest when used as biocatalysts in the production of L-aspartic acid due to their enhanced activity and thermal stability. The effect of a decrease in the reaction temperature on the preservation of the specific enzymatic activity of aspartase was roughly estimated. It was shown that, in spite of the slowing down the reaction rate, a significant positive effect in the stability of the biocatalyst can be achieved.

*Key words:* aspartase, biotransformation, L-aspartic acid.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-1-24-34