

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 60, №1, 2007 Химический журнал Армении

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 601.2:577.151.02

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
L-АСПАРТАЗЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *Erwinia aroidea*

М. Г. АЛЕБЯН

Научно-исследовательский институт биотехнологии, Ереван

Поступило 14 XI 2006

Установлены оптимальные условия определения L-аспартат аммиак-лиазной (КФ 4.3.1.1) активности бактериальных клеток *Erwinia aroidea* (*Erwinia carotovora subsp. carotovora*) путем измерения скорости реакции дезаминирования L-аспарагиновой кислоты. Согласно данным, полученным на основе кинетических исследований этой реакции, оптимальное значение pH реакционной среды находится в диапазоне 8,5÷9,5 и практически не зависит от солеобразующего катиона (Na^+ , NH_4^+ , K^+). Показано, что наибольшая скорость дезаминирования наблюдается при использовании в качестве субстрата калиевой соли, константа Михаэлиса (K_m) которой равна 14,7 мМ. Значение энергии активации реакции E_a составляет 43,75 кДж/моль в интервале температур 14÷40°C. Предлагаемые оптимальные условия для определения ферментативной активности L-аспартат аммиак-лиазы клеток *E. aroidea* следующие: pH 8,5, температура 37 °C, концентрация L-аспарагиновой кислоты 150 мМ.

Рис. 3, библиограф. ссылок 9.

L-аспарагиновая кислота входит в число наиболее потребляемых белковых аминокислот. Согласно данным, приведенным в [1], из года в год ее производство имеет тенденцию значительного нарастания.

Биотехнологическое получение L-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты и аммиака является одним из первых производственных процессов конца двадцатого столетия, доказывающих плодотворность метода биотрансформации как нового направления [2]. Основными преимуществами данного метода получения L-аспарагиновой кислоты являются доступность биокатализатора (L-аспартат аммиак-

лиаза или L-аспартаза), умеренные цены на основные исходные продукты (фумаровая кислота и аммиак), простота, компактность и конструктивная гибкость производственных технологических линий, отсутствие необходимости больших капитальных вложений для организации производства, экономичность и рентабельность даже малотоннажного производства. Проведенные в Армении исследовательские работы в области биотехнологии получения L-аспарагиновой кислоты [3-6] в настоящее время могут служить необходимой основой для организации производства любой необходимой мощности.

Одним из необходимых звеньев для каждого производства является организация эффективного аналитического контроля. В производстве L-аспарагиновой кислоты на разных технологических стадиях важное место занимает контроль аспартазной активности катализатора. Нами установлены оптимальные условия определения активности L-аспартазы бактериальных клеток *E.aroidea* путем измерения скорости реакции дезаминирования L-аспарагиновой кислоты.

Условия эксперимента

Использованы следующие реактивы и препараты: L-аспарагиновая кислота производства «НИИ Биотехнологии» (РА, Ереван), фумаровая кислота, 25% водный аммиак, гидроксид калия, гидроксид натрия, сульфат магния – все реактивы марки “х.ч.”. Продуцент L-аспартазы – бактериальный штамм *E.aroidea* (ИНМИА №8724), любезно передан нашему институту академиком НАН РА Э.Г.Африкяном.

В качестве препарата L-аспартазы использована надосадочная жидкость (грубый ферментный экстракт), полученная 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°C в течение 16-18 ч согласно методике [7]. Биомассу считали пригодной для исследований, если селективность превращения фумарата в аспарат составляла не менее 95%.

Активность ферментного препарата L-аспартазы в реакции дезаминирования L-аспарагиновой кислоты измеряли в термостатируемой ячейке спектрофотометра “Perkin-Elmer” UV-Vis модель – 550S (USA) при температуре 37°C. Реакционная среда в 3,0 мл конечного объема содержала реагенты в следующих концентрациях: HEPES буфер – 50 мМ, субстрат (L-аспарагиновая кислота) – в интервале 1,25÷200 мМ, ферментный препарат в необходимом количестве, рН 5,5÷10,5. Температурную зависимость активности L-аспартазы измеряли в диапазоне 14÷54°C при концентрации L-аспарагиновой кислоты – 50 мМ. Начальную скорость реакции определяли по наклону касательной к кривой нарастания поглощения продукта – фумарата, образовавшегося в результате реакции дезаминирования L-аспарагиновой

кислоты. Активность биоматериала A_x выражали в единицах μM (субстрата или продукта)/г(влажной биомассы) (ч. Коэффициент молярной экстинкции фумаровой кислоты принимали равным $\varepsilon_{412}=2530 \text{ M}^{-1}\text{хсм}^{-1}$. Расчеты проводились по компьютерной программе Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Зависимость активности L-аспартазы от pH реакционной среды при использовании различных солей L-аспарагиновой кислоты (солеобразующие катионы – Na^+ , K^+ , NH_4^+). На рис. 1 представлены кривые зависимости относительной скорости (%) накопления фумаровой кислоты – v_t от pH реакционной среды в диапазоне 5,5(10,5, при концентрации L-аспартата 50 мМ. Как видно из графиков, независимо от типа используемого солеобразующего катиона все кривые достаточно хорошо накладываются друг на друга, а наблюдаемые максимальные (оптимальные) скорости лежат в области pH 8,5(9,5. Отметим, что область pH выше 8,5 является оптимальной и для обратной реакции – синтеза L-аспарагиновой кислоты [5,8]. Сравнение скоростей накопления фумаровой кислоты при значении pH реакционной среды 8,5 показало, что наибольшая скорость наблюдается в случае аспартата калия. При использовании натриевой или аммониевой солей в качестве субстрата наблюдаемые скорости очень близки и составляют примерно 80% от соответствующего значения скорости реакции, полученного для калиевой соли.

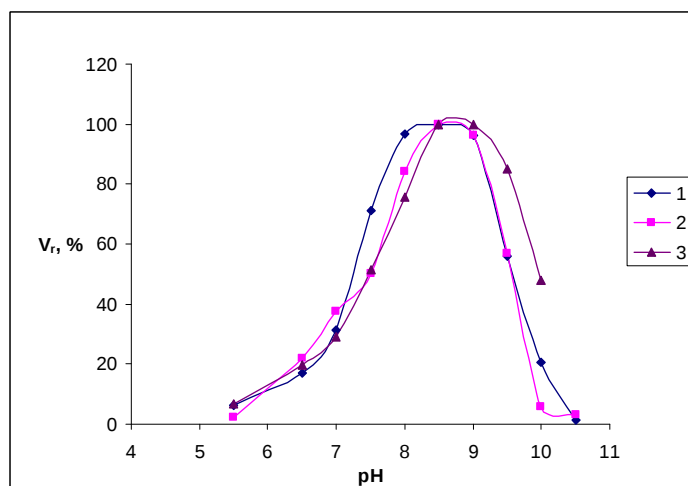


Рис. 1. Зависимость относительной скорости v_t (%) накопления фумаровой кислоты в реакции дезаминирования L-аспартата от значения pH реакционной среды: 1 – натриевая, 2 – калиевая и 3 – аммониевая соли, соответственно (остальные условия в тексте).

Зависимость скорости накопления фумаровой кислоты от концентрации L-аспартата калия ([L-AspK]). Концентрационная зависимость скорости накопления фумаровой кислоты изучена в диапазоне $[L-AspK] = 5(200 \text{ мМ})$. Как показано на рис. 2, график зависимости в координатах Лайнуивера-Бэрка имеет прямолинейный характер, а значение константы Михаэлиса – $K_m = 16,5 \text{ мМ}$. Прямолинейный характер наблюдается также при обработке данных в координатах Эдди-Хофста ($v = f(v/[L-AspK])$) и Ханеса-Вульфа ($[L-AspK]/v = f([L-AspK])$); полученные значения K_m равны 14,2 и 13,6 мМ соответственно. Среднее значение K_m составляет 14,7 мМ.

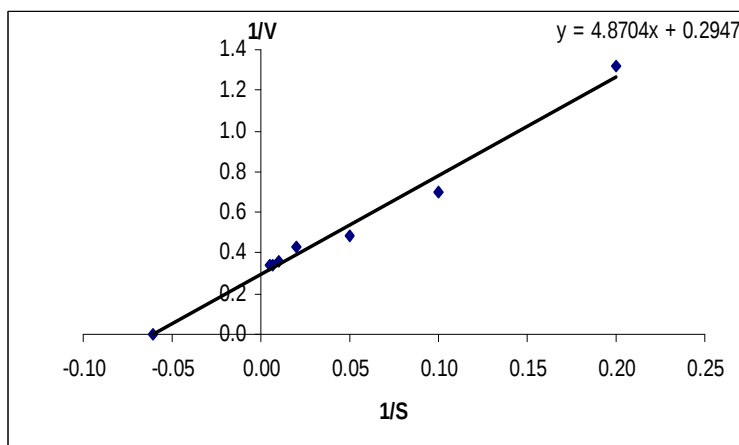


Рис. 2. Зависимость относительной скорости накопления фумаровой кислоты от концентрации аспартата калия в координатах Лайнуивера-Бэрка (остальные условия в тексте).

Влияние температуры на скорость реакции образования фумаровой кислоты из L-аспартата калия. Температурная зависимость скорости накопления фумаровой кислоты изучена в диапазоне температур 14(54°C при концентрации L-аспартата калия 50 мМ. Показано, что скорость накопления фумаровой кислоты экспоненциально возрастает до 40°C, а начиная с 44°C постепенно падает и при 54°C составляет 14% от максимального значения. На рис. 3 приведен график зависимости $\lg(v)$ от обратного значения абсолютной температуры – $1/T$. Как видно из рисунка, в интервале температур 14÷40°C (что соответствует $1/T$ (°K) = 0,00348÷0,00319) зависимость имеет прямолинейный характер, т.е. подчиняется уравнению Аррениуса. Рассчитанное из этого участка значение энергии активации реакции E_a составляет 43,75 кДж/моль.

Соотношение скоростей синтеза L-аспарагиновой кислоты и ее дезаминирования. Как было показано выше, дезаминирование L-аспарагиновой кислоты протекает с наибольшей скоростью при использовании субстрата в виде калиевой соли и при pH 8,5 и выше. Поэтому в данных опытах нами использована

калиевая соль L-аспарагиновой кислоты. Учитывая значение K_m для L-аспартата калия, равное 14,7 мМ, для поддержания псевдонулевого порядка реакции в течение проведения измерения в качестве стандартной нами была выбрана концентрация субстрата 150 мМ. При этом отметим, что в пределах измеряемых нарастаний оптической плотности реакционной среды (вследствие накопления фумарата) на одну единицу исходное количество субстрата убывает не более, чем на 1,7%. Для определения активности ферментного препарата в реакции синтеза L-аспарагиновой кислоты выбраны условия, обычно используемые для определения аспартазной активности штаммов-продуцентов (1 М раствор фумарата аммония со значением рН 8,5 в присутствии ионов магния в концентрации 1,0 мМ). В обоих случаях реакции проводили при температуре 37°C.

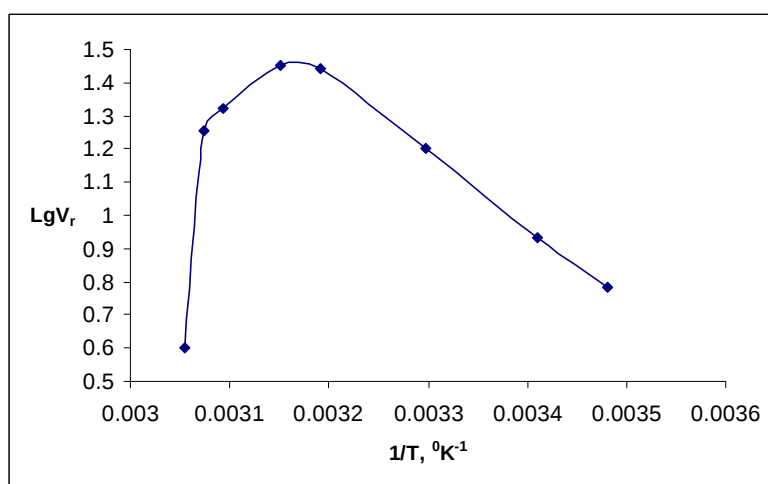


Рис. 3. Зависимость логарифма относительной скорости накопления фумаровой кислоты v_r в реакционной среде от обратного значения абсолютной температуры (остальные условия в тексте).

Определение активности ферментного препарата в описанных реакциях с использованием метода начальных скоростей показало, что при 37°C соотношение $A_c/A_d = 1,914$, где A_c – активность ферментного препарата в реакции синтеза L-аспарагиновой кислоты, а A_d – дезаминирования.

Для определения дезаминирующей активности L-аспартазы клеток *E.coli* в литературе в качестве оптимального значения рН приводится 7,0, а в качестве субстрата рекомендуется 100 мМ раствор аспартата натрия [9]. Полученные нами данные свидетельствуют, что для определения L-аспартазной активности бактериальных клеток *E.aroidea* приведенные в литературе условия не являются оптимальными. Как нами показано, независимо от типа катиона, используемого для приготовления субстрата, оптимальные значения рН реакции дезаминирования L-аспарагиновой кислоты находятся в диапазоне 8,5÷9,5, а наблюдаемая активность

при рН 7,0 приблизительно в три раза ниже значений, наблюдаемых при 8,5÷9,5. Следовательно, при проведении измерений в диапазоне рН 8,5÷9,5 чувствительность метода повышается почти в три раза. Использование калиевой соли дополнительно повышает чувствительность еще на 20-25%.

Как показывают результаты измерений зависимости скорости дезаминирования от концентрации L-аспартата, среднее значение K_m составляет $\sim 15,0$ мМ, что, по крайней мере, на порядок выше значений, приведенных для L-аспартазы клеток *E.coli* [9]. Рекомендуемая нами концентрация L-аспартата калия – 150 мМ, соответствует $\sim 10K_m$. При использовании этой концентрации, очевидно, чувствительность метода снижается на 10%, но, с другой стороны, требования к качеству L-аспарагиновой кислоты (в смысле содержания фумаровой кислоты в качестве примеси) более умеренны.

Чаще всего в литературе для количественной характеристики аспартазной активности биокатализаторов, биомассы или ферментных препаратов в технологических целях используется каталитическая активность материала в реакции аминирования фумаровой кислоты. Однако определение активности данным способом подразумевает обязательную процедуру отбора проб, основано на регистрации исчерпания фумарата и требует большого количества катализатора. Метод мало приемлем, если катализатор, наряду с аспартазной, обладает также значительной фумаразной активностью. В то же время обратимость обсуждаемой реакции дает возможность измерять аспартазную активность реакцией дезаминирования, по накоплению фумарата. При этом отпадает необходимость отбора проб (реакцию можно проводить прямо в кювете спектрофотометра), а необходимое количество биокатализатора в 50-100 раз меньше, чем требуется при реакции аминирования. Определенный нами коэффициент $A_c/A_d = 1,914$ для бактериальных клеток *E.aroidea* позволяет полученный результат легко переводить в принятые в литературе единицы, отражающие реакцию аминирования.

Результаты исследования температурной зависимости скорости реакции дезаминирования свидетельствуют, что в интервале 14÷40°C (что соответствует 287,15(313,15 К) полученный нами график в координатах уравнения Аррениуса имеет линейный характер, а значение энергии активации реакции составляет $E_a = 10,46$ ккал/моль. Следовательно, измерив дезаминирующую активность L-аспартазы в данном температурном интервале и используя известное уравнение

$$\lg \frac{v_1}{v_2} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right),$$

где v_1 – скорость при температуре $T_1 = 310,15$ К, $R = 1,987$ ккал/К·моль, $E_a = 10,46$ ккал/моль), можно рассчитать активность изучаемого ферментного препарата для стандартной температуры, равной 37°C (310,15 К). Проведение такого расчета

особенно полезно, в частности, в тех случаях, когда спектрофотометр не снабжен термостатируемой кюветой и измерения проводятся при комнатной температуре.

Автор благодарит м.н.с. Измаилян М.С., д.х.н. Алебяна Г.П., к.б.н. Амбарцумяна А.А. за консультации и оказанную помощь при выполнении работы.

Работа выполнена в рамках гранта ANSEF N 05-NS-biotech-0831-446.

***Erwinia Aroidea* ԲԱՎՏԵՐԻԱԼ ԲՋԻՋՆԵՐԻ L-ԱՍՊԱՐՏԱԶԱՅԻՆ ԱՎՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ՕՊՏԻՄԻԶԱՑՈՒՄ**

Մ. Ղ. ՀԱԼԵԲՅԱՆ

L-ասպարազինաթթվի դեզամինացման ռեակցիայի արագության չափման կիրառմամբ որոշված են *E. aroidea* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) բջիջների L-ասպարտատ ամոնիակ-լիազային (EC 4.3.1.1) ակտիվության հայտածման օպտիմալ պայմանները: Տվյալ ռեակցիայի կինետիկական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ռեակցիոն միջավայրի օպտիմալ pH-ի արժեքը գտնվում է 8,5-9,5 սահմաններում և փաստացիորեն կախված չէ աղ առաջացնող կատիոնի տեսակից (Na^+ , NH_4^+ , K^+): Ցույց է տրված, որ դեզամինացման առավելագույն արագությունը դիտվում է, երբ որպես սուբստրատ օգտագործվում է L-ասպարազինաթթվի կալիումական աղը, որի համար որոշված Միխաելիսի հաստատունը (K_m) հավասար է 14,7 մՄ: Ռեակցիայի ակտիվացման էներգիան (E_a) ջերմաստիճանի 14-40°C սահմաններում հավասար է 43,75 կՋ/մոլ: *E. aroidea* բակտերիալ բջիջների L-ասպարտատ ամոնիակ-լիազային ակտիվության որոշման օպտիմալ պայմանները հետևյալն են՝ pH 8,5, ջերմաստիճանը՝ 37°C, L-ասպարազինաթթվի կոնցենտրացիան՝ 150 մՄ:

OPTIMIZATION OF CONDITIONS IN ESTIMATION OF *Erwinia aroidea* L-ASPARTASE ACTIVITY

M. Gh. HALEBYAN

The optimal conditions of L-aspartate ammonia-lyase (EC 4.3.1.1) activity of *E. aroidea* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) bacterial cells have been estimated, by measuring the reaction rate of L-aspartic acid desamination. According to the reaction kinetic data the optimal pH value of the reaction medium was within the range of 8.5÷9.5, and practically was not dependent upon salt-forming cation (Na^+ , NH_4^+ , K^+). It was shown that the maximum desamination rate was observed when potassium salt was used as a substrate (Michaelis constant – $K_m = 14.7 \text{ mM}$). The value of the reaction activation energy (E_a) was equal to 43.75 kJ/mol within 14÷40°C. The proposed optimal conditions for measuring the enzymatic activity of L-aspartate ammonia-lyase of *E. aroidea* bacterial cells are as follows: pH – 8.5, temperature – 37°C, L-aspartic acid concentration – 150 mM.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ikeda M. // Adv. Biochem. Eng. Biotech., 2003, v.79, p.1.
- [2] Edited by Aida K., Chibata I., Nakayama K., Takinami K., Yamada H. Biotechnology of Amino Acid Production. Amsterdam, Elsevier Sci. Publ., 1986, p.340.
- [3] Арзуманов Е.Н., Тозалакян П.В. Получение аминокислот методом биотрансформации за рубежом: Микробиологическая промышленность. Обзор. информ., М., ВНИИСЭНИТИ, 1988, вып. 2, 26с.
- [4] Абелян В.А. Автореф. дисс. "Разработка и применение перспективных методов микробиологического катализа для получения физиологически активных соединений" докт. биол. наук, Институт микробиологии НАН РА, Абовян, 1995.
- [5] Абелян В.А. Получение и применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов. Ереван, Изд. АН Арм. ССР, 1989, с.391.
- [6] Алебян Г.П., Кочаров С.Л., Мелконян А.Б., Измаилян М.С. // Ж. прикладной химии Армении, 1999, №1-2, с.66.
- [7] Алебян Г.П., Тозалакян П.В., Габриелян Ф.К., Мелконян А.Б., Бабаханян А.В. // Биол. ж. Армении, 1997, т. 50, №3-4, с. 234.
- [8] Алебян Г.П., Мелконян А.Б., Измаилян М.С. // Биотехнология, 1999, №3, с.73.
- [9] Kong X., Li Z., Gou X., Zhu S., Zhang H., Wang X. // J. Biol. Chem., 2002, v.277, №27, p.24289.