



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФУМАРАЗЫ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

К.Г. ДЮКОВА, М.С. ИЗМАИЛЯН, Г.П. АЛЕБЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
karina_dukova@yahoo.com

В работе определены кинетические параметры и установлены оптимальные условия функционирования фумаразы (EC 4.2.1.2.) бактериальных клеток *Pectobacterium carotovorum* в реакции гидратации фумарата с образованием яблочной кислоты. Согласно данным, полученным на основе кинетических исследований этой реакции, константа Михаэлиса (K_m) равна 7,01 мМ. Показано, что фумараза *P. carotovorum* проявляет максимальную активность в диапазоне температур 32-37°C и pH 7,5-9. Значение энергии активации реакции (EA) составляет 4,7 ккал/моль в интервале температур 14-37°C. При хранении ферментного препарата в течение 10 дней в 0,1 М растворе фумарата аммония при температуре 25°C фумараза теряет 55 % исходной активности.

Фумараза – *Pectobacterium carotovorum* – L-яблочная кислота

Որոշված են *Pectobacterium carotovorum* բակտերիալ բջիջների ֆումարազի (EC 4.2.1.2.) կինետիկական պարամետրերը և գործունեության օպտիմալ պայմանները ֆումարատից մալատ հիդրատացման ռեակցիայում: Համաձայն ստացված տվյալների, որոնք հիմնված են ռեակցիայի կինետիկական հետազոտությունների վրա, Միխաելիսի հաստատունը (K_m) հավասար է 7,01 մМ: Ցույց է տրված, որ *P. carotovorum*-ի ֆումարազը առավելագույն ակտիվություն ցուցադրում է pH 7,5-9 սահմաններում, և 32-37°C ջերմաստիճանային փիրայքում: Ակտիվացման էներգիայի արժեքը (EA) հավասար է 4,7 կկալ/մոլ 14-37°C ջերմաստիճանային փիրայքում: Ֆերմենտային պրեպարատը 10 օր 0,1 М ամոնիումի ֆումարատի լուծույթում 25°C ջերմաստիճանում պահպանելիս, ֆումարազը կորցնում է իր նախնական ակտիվության 55%-ը:

Ֆումարազ – *Pectobacterium carotovorum* – L-խնձորաթթու

We studied the kinetic parameters and optimum conditions for the functioning of the fumarase (EC 4.2.1.2.) of *Pectobacterium carotovorum* bacterial cells in the hydration of fumarate to form malate. According to data obtained by kinetic studies of this reaction, the Michaelis constant (K_m) is equal to 7.01 mM. It was shown, that fumarase of *P. carotovorum* exhibits maximal activity at pH 7.5-9 and at temperature of 32-37°C. The value of activation energy (EA) is 4.7 kkal/mol in the temperature range of 14-37°C. In storing the enzyme preparation for 10 days in a 0.1 M solution of ammonium fumarate at 25°C fumarase loses 55% of the initial activity.

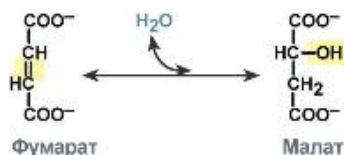
Fumarase – *Pectobacterium carotovorum* – L-malic acid

Штаммы - продуценты с выраженной L-аспартазной активностью, используемые для синтеза L-аспарагиновой кислоты, в той или иной степени являются также носителями фумаразы. Поэтому во всех случаях синтеза L-аспарагиновой

кислоты с применением микробных биокатализаторов, основанных на неочищенном ферментном препарате, одновременно с L-аспарагиновой кислотой, образуется по крайней мере один побочный продукт – L-яблочная кислота [11].

Бактериальный штамм *P. carotovorum* является одним из наиболее перспективных для промышленного производства аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты и аммиака. Однако для получения эффективного микробного биокатализатора из *P. carotovorum* как для синтеза L-аспарагиновой кислоты, так и ее солей, существует необходимость контроля фумаразной активности клеток и поиск возможности инактивации фумаразы с минимальным ущербом для аспартазной активности.

Фумараза (фумарат гидратаза) стереоспецифичный фермент, катализирует в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса) обратимую реакцию гидратации фумарата с образованием L-яблочной кислоты (схема 1)



Фумаразы принадлежат к семейству ферментов, утилизирующих фумарат в качестве как субстрата, так и продукта в путях его метаболизма. Фумараза класса 1, обнаруженная у прокариот, это термолabile и железозависимый фермент с молекулярной массой 120 кДа [8]. Фумараза класса 2, обнаруженная у млекопитающих (в сердце свиньи, печени крысы), у дрожжей и некоторых микроорганизмов – это термостабильный, железнезависимый фермент с молекулярной массой 200 кДа [8]. В отличие от фумараз млекопитающих, бактериальные фумаразы не столь широко изучены и представлены в литературе [5, 9].

Целью настоящей работы является изучение кинетических характеристик фумаразы бактериального штамма-продуцента аспартазы *P. carotovorum* для оценки степени участия фумаразы в процессе превращения фумарата в аспарат.

Материал и методика. Условия эксперимента, материалы и питательная среда.

В работе использованы следующие реактивы: фумаровая кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия, 25 %-ный водный аммиак – коммерчески доступные реактивы производства Армении и стран СНГ. Продуцент фумаразы – бактериальный штамм *Pectobacterium carotovorum* INMIA B-8727 (ранее известный как *Erwinia aroidea*) из коллекции микроорганизмов НППЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

В качестве препарата фумаразы использован ферментный экстракт, полученный центрифугированием предварительно обработанной ультразвуком клеточной суспензии, содержащей 1 г влажных клеток в 5 мл 0,1 М раствора фумарата аммония (pH=8,5). Культуру выращивали в жидкой питательной среде при 30°C в течение 16-18 ч согласно методике [1].

Определение активности и расчет кинетических параметров. Активность фумаразы измеряли в реакции гидратации фумарата по убыванию субстрата в реакционной среде следующего состава: 20 мМ субстрат (фумарат натрия), 20 мМ К, Na-фосфатный буфер, pH=8,5. Общий объем реакционной смеси составлял 2 мл, температура 37°C. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата (концентрация фермента в реакционной смеси – 20 мг/мл в пересчете на влажную биомассу клеток). Концентрацию фумаровой кислоты определяли спектрофотометрически по поглощению при 240 нм. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата в минуту в указанных условиях. Удельная активность отображала общую активность фумаразы на 1 г влажной биомассы, учитывая коэффициент молярной экстинкции фумаровой кислоты $\epsilon = 2440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Начальную скорость реакции определяли по наклону касательной к кривой убывания поглощения фумарата.

Расчеты кинетических параметров (K_M) и ($V_{\max}$) и их стандартные ошибки были проведены методом многомерного линейного регрессионного анализа [4], с использованием программы Gauss 4.0.

Определение стабильности фумаразы. Ферментный препарат клеток в растворе 0,1 М фумарата аммония хранили в термостате при температуре 25°C, периодически отбирая пробы на определение активности.

Определение температурного и pH оптимумов. Активность фермента измеряли при разных температурах в интервале от 14 °C до 57°C и при разных pH в интервале от 5,5 до 10,2, используя 100 мМ К,Na-фосфатный буфер с соответствующими значениями pH.

Для обработки экспериментальных результатов по изучению влияния температуры на исследуемую реакцию и расчета энергии активации (E_A) использовали нижеприведенную форму уравнения Аррениуса:

$$E_A = \frac{R \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \ln \frac{k_2}{k_1},$$

где: R – 1,987 кал/К° моль – универсальная газовая постоянная

Результаты и обсуждение. Зависимость скорости реакции гидратации фумарата натрия от концентрации субстрата.

Концентрационная зависимость скорости гидратации фумарата натрия изучена в диапазоне 2÷25 мМ. Как показано на рис. 1, график зависимости $[V]$ от $[S]$ имеет вид равнобочной гиперболы, что типично для ферментативных реакций. Полученный график зависимости в координатах Лайнуивера-Берка – ($1/v$ от $1/s$) имеет прямолинейный характер (рис. 2). Значения кинетических параметров (K_M) и ($V_{\max}$), рассчитанные методом многомерного линейного регрессионного анализа, равны $K_M = 7,01 \pm 0,77$ мМ и $V_{\max} = 338,6 \pm 1,5$ мкмоль/мин/г.

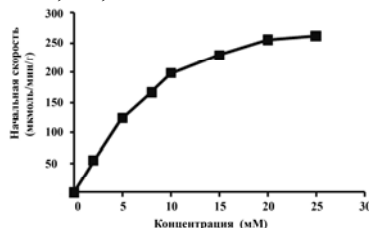


Рис. 1. Кривая зависимости начальной скорости реакции гидратации фумарата от концентрации субстрата (концентрация фермента в реакционной смеси – 20 мг/мл в пересчете на влажную биомассу клеток).

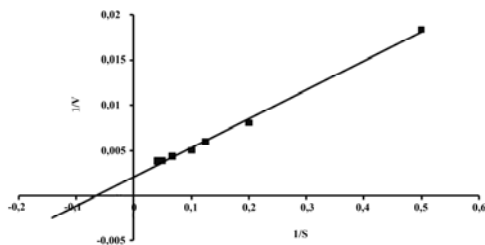


Рис.2. Зависимость начальной скорости реакции гидратации фумарата от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка

Влияние температуры на скорость реакции гидратации фумарата. Температурная зависимость скорости потребления фумарата была изучена в диапазоне температур 14÷57⁰С.

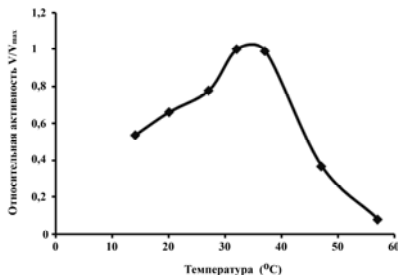


Рис.3. Зависимость активности фумаразы *P. carotovorum* от температуры.

Как видно из приведенного графика (рис.3), скорость расхода фумарата экспоненциально возрастает до 32⁰С, а начиная с 37⁰С, вследствие тепловой инактивации, постепенно падает и при 57⁰С составляет 7,8 % от максимального значения. На рис. 4 она представлена в аррениусовских координатах; приведен график зависимости логарифма начальной скорости реакции – lg (v) от обратного значения абсолютной температуры 1/T. Как видно из рис. 3, в интервале температур 14÷37⁰С (что соответствует 1/T (К⁻¹) = 0,003333÷0,00303) зависимость имеет практически прямолинейный характер, т.е. подчиняется уравнению Аррениуса, а линейность нарушается выше 37⁰С.

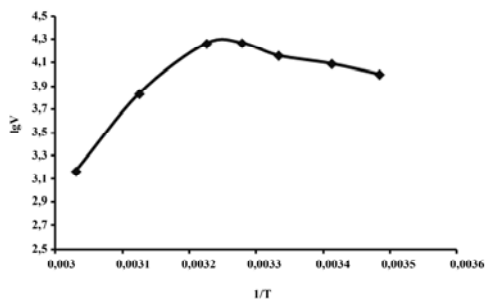
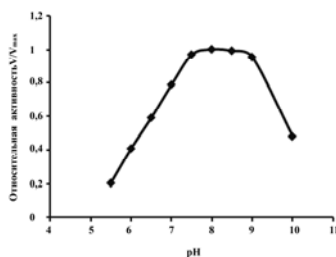


Рис.4. Зависимость логарифма начальной скорости расхода фумарата в реакционной среде от обратного значения абсолютной температуры для фумаразы *P. carotovorum* при pH 8,5.

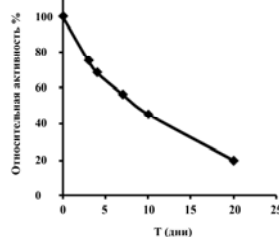
Расчитанное из прямолинейного участка графика значение энергии активации реакции E_A составляет 4686,8 кал/моль, что очень близко значению энергии активации, характерной для очищенного фермента $E_A = 4990$ кал/моль (из сердца свиньи), приведенного в литературе [3].

Влияние pH на скорость реакции гидратации фумарата. Изучение зависимости скорости реакции потребления фумарата натрия от pH в реакции гидратации фумарата при участии фумаразы *P. carotovorum* показало (рис. 5), что кривая зависимости не имеет отчетливо выраженного максимума. В интервале pH (5,5÷7,5) скорость реакции интенсивно возрастает, затем в интервале pH (7,5÷9) выходит на плато с незначительными колебаниями в значениях и, далее, при pH от 9 к 10,2 наблюдается резкое падение скорости реакции.

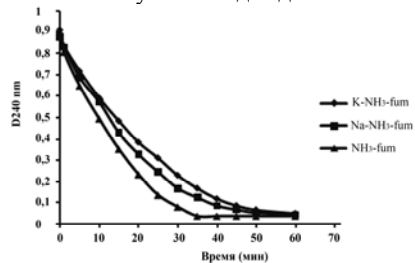
Рис.5. Зависимость активности фумаразы *P. carotovorum* от pH.

Таким образом, при оптимальном для аспартазы pH 8,5 [2] фумараза *P. carotovorum* также проявляет максимальную активность, что будет создавать определенные трудности при использовании этого штамма в качестве катализатора в биотрансформационном процессе получения L-аспарагиновой кислоты и ее солей. При сравнении, для фумараз, выделенных из разных источников, приведенные в литературе кривые зависимости скорости реакции потребления фумарата натрия от pH, имеют ярко выраженные максимумы в диапазоне pH 6,5÷7,5 [8, 10].

Определение стабильности фумаразы *P. carotovorum*. Нами была исследована стабильность фумаразы *P. carotovorum* при хранении в 0,1 М растворе фумарата аммония при температуре 25⁰.

Рис.6. Изменение активности фумаразы *P. carotovorum* при хранении в растворе 0,1 М фумарата аммония при температуре 25⁰С.

На рис. 6 показана кривая зависимости относительной активности фумаразы от времени. Как видно, фермент теряет 55% от исходной активности на 10-й день хранения. Для сравнения коммерческая фумараза из сердца свиньи при хранении в аналогичных условиях теряла 60 % исходной активности в течение первых трех суток хранения [7]. На рис. 7 приведены кривые потребления фумарата в виде 1 М растворов натрий-аммониевой, калий-аммониевой и аммониевой солей в реакции, катализируемой *P. carotovorum* в оптимальных условиях для действия аспартазы (pH 8,5; T-37⁰).

Рис.7. Кинетическая кривая расхода субстрата в реакции ферментативного аминирования фумарата под действием аспартазы *P. carotovorum*.

На основании полученных нами результатов можно сказать, что фумараза при оптимальных условиях для эксплуатации штамма-продуцента аспартазы *P. carotovorum* вносит свой вклад в потребление фумаровой кислоты, а представленные кривые являются результатом суммарного действия двух ферментов. Из фумарата одновременно с L-аспарагиновой кислотой образуется еще один побочный продукт – L-яблочная кислота. Содержание яблочной кислоты в конечном продукте реакции составляет ~ 5%. Несмотря на то, что L-яблочная кислота принципиально способна превращаться в аспартат, возможность образования яблочной кислоты необходимо предотвратить путем инактивации фумаразы [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Алевян Г. П., Тозалакян П. В., Габриелян Ф. К., Мелконян А. Б., Бабаханян А. В. Влияние поверхностно-активного вещества БА-420 на проявление аспартазной активности клеток *Erwinia aroidea*. Биолог. журн. Армении, 50, 3-4, 234-240, 1997.
2. Алевян М.Г. Оптимизация условий определения активности L-аспартазы бактериальных клеток *Erwinia aroidea*. Химич. журн. Армении, 60, 1, 144-151, 2007.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., Мир, 1966.
4. Корнши-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, 1979.
5. Bock R., Alberty R. Studies of the enzyme fumarase. 1. Kinetics and equilibrium. J. Am. Chem. Soc., 75, 1921-1925, 1953.
6. Chibata I., Tosa T., Sato T. Improvement of production of L-aspartic acid using immobilized microbial cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 291-295, 1984.
7. Chui-Tein Chen, Shui-Chyr Duh, Kung-Tsung Wang. Facile synthesis of L-malic acid by a consecutive enzymatic reaction. Biotechnology letters, 16, 4, p. 355-358, 1994.
8. Genda T., Watabe S., Ozaki Hy. Purification and characterization of fumarase from *Corynebacterium glutamicum*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 5, 1102-1109, 2006.
9. Koboyashi K., Tuboi S. End group analysis of the cytosolic and mitochondrial fumarases from rat liver. J. Biochem., 94, 707-713, 1983.
10. Presecki A.V., Zelic B., Vasic-Rascki D. Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells. Enzyme and microbial technology., 41, 605-612, 2007.
11. Takamatsu S., Umemura I., Yamamoto K., Sato T., Chibata I. Production of L-alanine from ammonium fumarate using two-immobilized microorganisms. Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 15, 3, 147-152, 1982.

Поступила 15.01.2013