

УДК 577.152.4

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОЦИТРАТЛИАЗЫ ИЗ *MACROMONAS BIPUNCTATA*

© 2004 г. М.А.Климова, А.Т.Епринцев, М.И. Фалалеева

Воронежский государственный университет

Установлена высокая активность ключевого фермента глиоксилатного цикла – изоцитратлиазы – из одноклеточной бесцветной серобактерии *Macromonas bipunctata*. В ходе четырехстадийной очистки получены гомогенные ферментные препараты изоцитратлиазы с удельной активностью 1,698 Е/мг белка и степенью очистки 89,4 раза при культивировании бактерий на сукцинате и 2,0 Е/мг белка, степенью очистки 69,3 раза – на ацетате. Выявлены значительные отличия в физико-химических, кинетических и регуляторных свойствах изоцитратлиазы, что может свидетельствовать о функционировании различных изоформ фермента при культивировании *M. bipunctata* на средах, содержащих сукцинат или ацетат в качестве единственного источника углерода.

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм серобактерий рода *Macromonas*, характерной особенностью которых является накопление оксалатов кальция, до настоящего времени мало изучен. *M. bipunctata* хорошо культивируется на питательных средах, содержащих сукцинат или ацетат в качестве единственного источника углерода. Причем наряду с полным ЦТК функционирует глиоксилатный цикл [1]. При этом обнаружена субстратная индукция метаболических потоков. При утилизации сукцината в качестве единственного источника углерода выявлено увеличение интенсивности ЦТК, сопряженное с ростом активности ключевых ферментов. В условиях ацетатного питания у бактерии наблюдается повышение активности глиоксилатного цикла, о чем свидетельствует возрастание скорости малатсинтазной и изоцитратлиазной реакций. Исследование изоцитратлиазы (ИЦЛ, КФ 4.1.3.1.) из *M. bipunctata* представляет особый интерес. Микроорганизмы непосредственно контактируют с внешней средой, что сильно влияет на регуляторные механизмы, которые обуславливают большую гибкость метаболических процессов.

В связи с этим в нашей работе изучены структурно-функциональные особенности изоцитратлиазы из серобактерий *M. bipunctata*, культивируемых на сукцинате и ацетате.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили бактерии *Macromonas bipunctata* штамм Д-405. Для культивирования применяли PSS-среду [2] следующего состава

(г/л): пептон – 2,0; сукцинат натрия / ацетат натрия – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,03. После стерилизации вносили витамины и микроэлементы [3]. Суспензию клеток получали путём центрифугирования культуры при 8000 г в течение 15 мин. Клетки отмывали 0,05М трис-НСl буфером (рН 7,5). Гомогенат получали разрушением бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН — 2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 1 мин в ледяной бане. Супернатант получали после центрифугирования клеточного экстракта при 8000 г в течение 5 мин при 4° С.

Активность фермента измеряли спектрофотометрически при 324 нм в среде инкубирования следующего состава: 100мМ трис-НСl, рН – 7,5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5мМ; ЭДТА – 0,08мМ; изоцитратNa – 3мМ; дитиотрейтол- 5мМ; фенилгидразин солянокислый.

Молекулярную массу нативного белка определяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-150 [4]. Расчет молекулярной массы фермента проводили по формуле:

$$\lg M_r = 6,0404 - 0,8032(V_e/V_0)$$

Электрофорез нативной ИЦЛ проводили в полиакриламидном геле (8%) по методу Девиса [5]. Для специфического проявления использовали методику с модифицированным реагентом Шиффа, для универсального проявления на белок – методику с нитратом серебра [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получены гомогенные ферментные препараты ИЦЛ с удельной активностью $1,698 \pm 0,085$ Е/мг белка (степень очистки 89,4) и $2,0 \pm 0,06$ Е/мг белка,

Очистка изоцитратлиазы из *Magnetomonas bircinctata*, культивируемых на сукцинате

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	4,6	5,96±0,298	298,54±14,92	0,019±0,001	1,0	100
Супернатант	3,8	5,47±0,27	183,90±9,19	0,029±0,0015	1,52	91,8
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	3,0	3,35±0,17	83,6±4,2	0,040±0,002	2,1	56,2
ДЭАЭ-целлюлоза	2	0,523±0,026	0,308±0,015	1,698±0,085	89,6	8,8

Очистка изоцитратлиазы из *M. bircinctata*, культивируемых на ацетате

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	3,2	4,6±0,138	154,9±4,647	0,029±0,0008	1	100
Супернатант	2,7	3,3±0,099	98,0±2,94	0,033±0,0009	1,13	71,8
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2,0	1,94±0,058	57,2±1,716	0,034±0,001	1,17	42,2
ДЭАЭ-целлюлоза	2,0	0,468±0,014	0,233±0,007	2,0±0,06	69,3	10,2

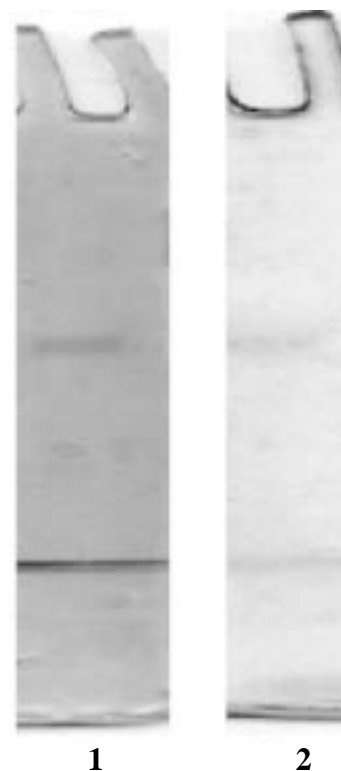
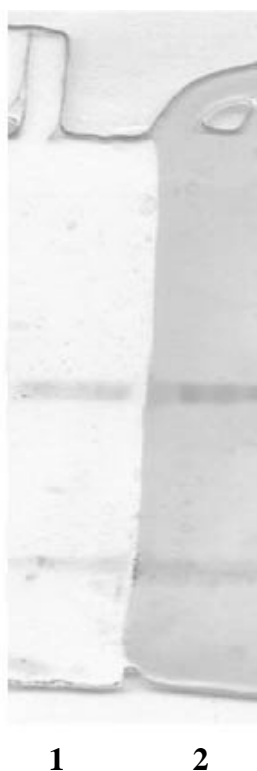


Рис.1. Электрофореграмма ИЦЛ из *M. bircinctata*, культивируемых на сукцинате: 1-специфическое проявление; 2-окрашивание нитратом серебра.

Рис.2. Электрофореграмма изоцитратлиазы из *M. bircinctata*, культивируемых на ацетате: 1-окрашивание нитратом серебра; 2- специфическое проявление.

степенью очистки 69,3 из *M. bipunctata* штамм Д-405 при выращивании на сукцинате и ацетате соответственно (табл. 1,2).

Молекулярная масса очищенной ИЦЛ, определенная методом гель-фильтрации, составляет $150 \pm 3,6$ кДа при росте бактерий на сукцинате и $160 \pm 4,8$ кДа – на ацетате. Проведенный электрофоретический анализ очищенных препаратов показывает, что в геле с помощью универсального красителя проявляется одна белковая полоса с величиной Rf 0,57 и 0,47 при культивировании бактерий на сукцинате и ацетате соответственно, свидетельствующая о гомогенности ИЦЛ из данного микроорганизма (рис. 1,2).

На полученных препаратах фермента исследованы некоторые каталитические свойства изоцитратлиазы. Величина Km по изоцитрату, определенная методом Лайнуивера-Берка, составляет $0,105 \pm 0,008$ мМ при росте культуры на сукцинате и $0,795 \pm 0,024$ мМ – на ацетате. Более высокое сродство фермента к изоцитрату при культивировании бактерий на сукцинате можно объяснить конкуренцией за субстрат в условиях интенсификации работы ЦТК. рН оптимум отличается незначительно, тогда как температурный оптимум при росте на сукцинате составляет 58°C , а при росте на уксусной кислоте – 35°C .

Также изучено влияние различных интермедиатов и ионов металлов на активность ИЦЛ и выявлено, что сукцинат, оксалат и малат являются ингибиторами фермента, ионы магния и кобальта активаторами (Ka по Mg^{2+} составляет $1,06 \pm 0,03$ и $5,25 \pm 0,26$ мМ, Ka по Co^{2+} – $4,17 \pm 0,12$ и $5,55 \pm 0,28$ мМ в условиях ацетатного и сукцинатного питания со-

ответственно), а ионы марганца ингибируют фермент при росте на ацетате ($K_i = 2,05 \pm 0,06$ мМ) и оказывают активирующее действие при выращивании на сукцинате ($K_a = 5,0 \pm 0,25$ мМ).

Т.о., получение в электрофоретически гомогенном состоянии изоцитратлиазы позволило исследовать ее основные физико-химические и кинетические характеристики, свидетельствующие, что у органотрофных бактерий *M. bipunctata* в глиоксилатном цикле функционируют различные изоформы данного фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грабович М.Ю. Особенности углеродного метаболизма у бесцветных серобактерий *Macromonas bipunctata* / М.Ю. Грабович, Г.А. Дубинина, В.В. Чурикова и др. // Микробиология. – 1993. – Т.62, №3. – С. 421-429.
2. Hylemon P.B. The methods of cultivation / P.B. Hylemon, J.S. Wells, J. Bowdre et al. // Intern. J. System. Bacteriol. – 1973. – V. 23, № 1. – P. 20.
3. Pfennig N. Uber das vitamin B12 – bedurfuis phototropher Schwefelbakterien / N. Pfennig, K.D. Lippert // Arch. Microbiol. – 1966. – V.55. – P.245.
4. Детерман Г. Гель-хроматография / Г. Детерман. – М.: Мир, 1970. – 173с.
5. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Нередкий. – М.: Мир, 1982. – 446с.
6. Reeves H.S. Determination of isocitratelase activity in polyacrylamide gels / H.S. Reeves, M.J. Volk // Anal. Biochem. – 1972. – V.48, № 2. – P.437-441.