

# Izolacija i kinetička karakterizacija fumaraze iz pekarskog kvasca

KUI – 8/2012  
Prispjelo 5. rujna, 2011.  
Prihvaćeno 16. siječnja, 2012.

Z. Findrik,\* E. Smailbegović, M. Prkačin i Đ. Vasić-Rački

Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,  
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb

U radu je opisan postupak pročišćavanja enzima fumaraze (fumarat-hidrataza, EC 4.2.1.2) iz pekarskog kvasca. Stanice kvasca su razbijane s pomoću tri metode: staklenim kuglicama, ultrazvukom te kombinacijom ovih dviju metoda. Frakcioniranje proteina provedeno je taloženjem s pomoću amonijeva sulfata, a fino pročišćavanje gel-filtracijskom kromatografijom na kolonama punjenim gelovima Sephadex G-50 i G-100. Primijenjenim tehnikama protein je pročišćen s ukupnim iskorištenjem od približno 25 %. Provedena je kinetička karakterizacija dobivenog enzima, te se pokazalo da su Michaelisove konstante za fumaru i L-jabučnu kiselinu 5,52 i 2,00 mmol dm<sup>-3</sup>. Biotransformacija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu katalizirana pročišćenom fumarazom provedena je u kotlastom reaktoru, gdje je postignuta ravnotežna konverzija 76,5 % fumarne kiseline. Razvijen je matematički model procesa koji je dobro opisao eksperimentalne podatke. Utvrđeno je da tijekom ovog eksperimenta dolazi do deaktivacije enzima. Brzina deaktivacije opisana je modelom reakcije prvoga reda. Procijenjena konstanta deaktivacije fumaraze iznosi 0,0031 min<sup>-1</sup>.

Ključne riječi: Fumaraza, pekarski kvasac, izolacija proteina

## Uvod

Jabučna kiselina je dikarboksilna kiselina, međuprodukt u ciklusu limunske kiseline, koja se upotrebljava u industriji, medicini, kozmetici i svakodnevnom životu.<sup>1</sup> Aditiv je u prehrambenim proizvodima: sredstvo za zakiseljavanje, podešavanje pH,<sup>2</sup> pojačavanje arome<sup>3</sup> te sprječavanje obezbojenja prehrambenih proizvoda.<sup>4</sup> Malat je sol jabučne kiseline i važan biljni metabolit prisutan u svim tipovima stanica<sup>5,6</sup> gdje se može akumulirati do koncentracija od 350 mmol dm<sup>-3</sup>. L-Jabučnu kiselinu i njezinu sol moguće je proizvesti na tri načina:<sup>7</sup> ekstrakcijom iz voćnog soka, kemijskom sintezom i enzimskom sintezom. Ekstrakcija iz voćnog soka nije učinkovita radi niskog udjela L-jabučne kiseline u njemu. Kemijska sinteza rezultira racemičnim produktom koji nema jednaka svojstva kao L-jabučna kiselina, te takav produkt nije pogodan za uporabu u medicini.<sup>8</sup> Enzimska sinteza je najpovoljnija jer rezultira enantiomerno čistim produktom. Može se provesti s pomoću pročišćenog enzima fumaraze ili cijelih stanica mikroorganizama koje sadrže ovaj enzim.<sup>9</sup> Cijele stanice sadrže i druge biokatalizatore, pa zbog toga mogu nastati eventualni nusprodukti metabolizma. S obzirom na to da je važnost L-jabučne kiseline kao produkta neupitna, u ovom je radu proučavana izolacija enzima fumaraze iz stanica pekarskog kvasca kao biokatalizatora za enzimsku sintezu. Pekarski kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, prirodan je izvor čitavog niza enzima;<sup>10</sup> jeftin je i dostupan te nije patogen, što olakšava rad s njim. Fumaraza katalizira ravnotežnu reakciju hidratacije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu, a enzim iz pekarskog

kvasca je pročišćen i karakteriziran 1992. godine u radu *Ke-ruchenka i koautora*.<sup>11</sup> Pokazano je da se ovaj enzim sastoji od četiri identične podjedinice čija je relativna molekulska masa oko 50 000, te mu je molekula vrlo slična fumarazi iz srca svinje.<sup>12</sup>

U ovom radu razvijena je, prema našim saznanjima, nova tehnika pročišćavanja fumaraze koja bi se mogla upotrebljavati za dobivanje veće količine ovog enzima.

## Eksperimentalni dio

### Kemikalije

U ovom radu upotrijebljene su sljedeće kemikalije: albumin iz govedeg seruma (Fluka), Comassie Brilliant Blue G 250 (Fluka), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), L-jabučna kiselina (Fluka), fumarina kiselina (Fluka), Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals), Sephadex G-100 (Sigma), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma) i svježi pekarski kvasac (Kvasac d. d.).

### Enzimski test za određivanje aktivnosti fumaraze

Aktivnost fumaraze određivana je spektrofotometrijskim testom prema modificiranoj Rackerovoj metodi.<sup>13</sup> Kao supstrat upotrijebljena je fumarina kiselina koncentracije 30 mmol dm<sup>-3</sup> otopljena u fosfatnom puferu koncentracije 50 mmol dm<sup>-3</sup>, pH = 6,8. Reakcija je započeta dodatkom enzima u otopinu supstrata, a praćena je spektrofotometrijski pri 300 nm. Mjerenja su provedena pri 30 °C u kvarcnoj kiveti obujma 1 cm<sup>3</sup>.

\* Autor za dopisivanje: dr. sc. Zvezdana Findrik, e-pošta: zfindrik@fkit.hr

### Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je u uzorcima nakon svakog koraka pročišćavanja enzima. Primijenjena je spektrofotometrijska metoda po Bradfordu.<sup>14</sup> Kao standard upotrijebljen je albumin iz goveđeg seruma. Mjerenja su provedena pri 595 nm. Proteini su bojani otopinom bojila Commaissie Brilliant Blue G250. Svaki radni dan napravljen je novi baždarni pravac.

### Određivanje koncentracije fumarne i L-jabučne kiseline kapljevinom kromatografijom visokog učinka

Koncentracije fumarne i L-jabučne kiseline određivane su kapljevinom kromatografijom visokog učinka<sup>15</sup> (HPLC) s UV-detektorom (Shimadzu, Japan), pri valnoj duljini od 210 nm, na koloni za organske kiseline proizvođača Merck: Lichrosorb 100, RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ). Mobilna faza bila je redistirana voda s dodatkom perklorne kiseline do pH 2,10 – 2,15. Standardne otopine jabučne i fumarne kiseline pripremljene su otapanjem određenih masa standarda u vodi.

### Opis postupaka izolacije fumaraze iz pekarskog kvasca

Izdvajanje enzima fumaraze iz stanice pekarskog kvasca provedeno je postupkom koji se sastojao od nekoliko koraka. Aktivnost enzima fumaraze iz pekarskog kvasca i koncentracija proteina u uzorcima određivani su spektrofotometrijski nakon svakog koraka.

#### Korak 1. Razbijanje stanica

Stanice pekarskog kvasca razbijene su na tri načina: s pomoću staklenih kuglica na homogenizatoru, ultrazvukom, te kombiniranim razbijanjem ultrazvukom i staklenim kuglicama. Za razbijanje stanica staklenim kuglicama na homogenizatoru upotrijebljeno je 2 i 10 g staklenih kuglica promjera 4 mm. Pripremljena suspenzija sadržavala je staklene kuglice, 2 g pekarskog kvasca i 10  $\text{cm}^3$  fosfatnog pufera pH 6,8. Stanice su razbijane 15, 30, 45, 60 i 70 minuta. Razbijanje stanica ultrazvukom provedeno je uređajem Sonoplus HD 3200 proizvođača Bandelin upotrebom ultrazvučne igle MS 73 koja je bila uronjena u suspenziju uzoraka pripremljenih suspendiranjem 8 g kvasca u 40  $\text{cm}^3$  fosfatnog pufera pH 6,8. Stanice su razbijane 10, 20, 30, 45, 60 i 70 minuta. Razbijanje stanica kombinacijom ultrazvuka i staklenih kuglica provedeno je na sljedeći način: ultrazvučna igla MS 73 uronjena je u suspenziju uzoraka pripremljenih suspendiranjem 8 g kvasca i 10 g staklenih kuglica promjera 4 mm u 40  $\text{cm}^3$  fosfatnog pufera pH 6,8. Stanice su razbijane 10, 30 i 60 minuta. Valja napomenuti da su sva razbijanja stanica provedena uz hlađenje u ledenoj kupelji kako bi se odvela toplina generirana tijekom postupka, koja može uzrokovati denaturaciju proteina.

#### Korak 2. Centrifugiranje

Razbijene stanice kvasca centrifugirane su 10 min pri 4 °C brzinom 4500 okretaja u minuti (Hettich Universal 320R). U ovom koraku izdvojene su kuglice i dio staničnog ostatka. Supernatant je još jednom centrifugiran 20 min pri 4 °C brzinom 14 000 okretaja u minuti (Hettich Universal 320R)

te je tim postupkom uklonjen višak proteina i dijelova stanica. U supernatantu se nalazila fumaraza te je on upotrijebljen u daljnjim koracima izdvajanja enzima.

#### Korak 3. Taloženje proteina amonijevim sulfatom

Poznato je da se dodatkom amonijeva sulfata do određene koncentracije u otopinu proteina proteini počinju taložiti jer se mijenja ionska jakost otopine, a time i topljivost proteina. S obzirom na to da te koncentracije za fumarazu iz pekarskog kvasca nisu navedene u literaturi, bilo ih je potrebno odrediti. Eksperimenti taloženja proteina provedeni su pri 0 – 4 °C. U otopinu proteina je polagano i uz miješanje dodavan amonijev sulfat u koncentracijama koje su 30, 40, 50, 60, 70, 80 i 90 % od koncentracije zasićenja (topljivosti),  $\gamma_{\text{sat}}$ , koja iznosi 514,72  $\text{g dm}^{-3}$ . Prvo taloženje provedeno je pri koncentraciji amonijeva sulfata koja iznosi 30 % od  $\gamma_{\text{sat}}$ . Nakon toga je dobivena suspenzija centrifugirana 25 minuta brzinom od 14 000 okretaja u minuti i pri 4 °C. U supernatantu i talogu je određena koncentracija proteina te aktivnost fumaraze. Dobiveni supernatant je upotrijebljen dalje u postupku taloženja proteina do 40 % od  $\gamma_{\text{sat}}$  te je postupak nastavljen do koncentracije koja je 90 % od  $\gamma_{\text{sat}}$  amonijeva sulfata. Na ovaj način dobiveno je područje koncentracije amonijeva sulfata u kojem se taloži fumaraza.

#### Korak 4. Gel-filtracijska kromatografija

Uzorci dobiveni taloženjem uz amonijev sulfat pročišćeni su gel-filtracijskom kromatografijom na kolonama punjenim gel-punilima Sephadex G-50 i Sephadex G-100. Postupak pročišćavanja uzoraka na gelu Sephadex G-50 obujma 65  $\text{cm}^3$  proveden je u koloni promjera 2,2 cm, visine 18 cm pri protoku eluenta od 0,67  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ . Kao eluent je upotrijebljen fosfatni pufer koncentracije 0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  i pH 6,8. Na vrh kolone je dodano 2 mL uzorka, a na izlazu kolone skupljane su frakcije od 5 mL. U uzorcima su određivani koncentracija proteina, aktivnost fumaraze i vodljivost. Frakcije u kojima su određene najveće aktivnosti fumaraze nakon gel-filtracijske kromatografije na gelu Sephadex G-50, uzete su za daljnje pročišćavanje u koloni punjenoj gelom Sephadex G-100. Na vrhu kolone dodano je 1 mL uzorka, a na izlazu kolone skupljane su frakcije od 0,5 mL. U svakoj od prikupljenih frakcija određena je aktivnost fumaraze i koncentracija proteina. Postupak pročišćavanja uzoraka na gelu Sephadex G-100 obujma 20  $\text{cm}^3$  proveden je na koloni promjera 1,2 cm, visine 20 cm pri protoku eluenta od 0,15  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ . Kao eluent je upotrijebljen fosfatni pufer koncentracije 0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  i pH 6,8.

### Određivanje kinetike reakcije hidratacije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu

Kinetika reakcije je određena metodom početnih brzina reakcije. S obzirom na to da se radi o ravnotežnoj reakciji, određen je utjecaj koncentracije fumarne kiseline na početnu brzinu hidratacije fumarne kiseline te utjecaj koncentracije L-jabučne kiseline na početnu brzinu reakcije dehidratacije L-jabučne kiseline. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri Michaelis-Menteničina kinetičkog modela: maksimalne brzine reakcije ( $V_{m1}$  i  $V_{m2}$ ) te Michaelisove konstante za fumaranu i L-jabučnu kiselinu ( $K_m^{\text{fumarana}}$ ,  $K_m^{\text{jabučna}}$ ). Početna brzina reakcije određena je iz linearnearne promjene apsorbancije pri 300 nm.

## Hidratacija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u kotlastom reaktoru

Eksperiment hidratacije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu proveden je u staklenom kotlastom reaktoru radnog obujma 17 cm<sup>3</sup> pri 25 °C u fosfatnom puferu pH 6,8. Nulti uzorak je analiziran prije dodatka fumaraze i u njemu je određena početna koncentracija fumarne kiseline. Nakon toga je dodano 2 cm<sup>3</sup> pročišćene fumaraze i uzorkovanje je nastavljeno u pravilnim vremenskim razmacima. Reakcija je provodena sve dok nije došla u ravnotežno stanje. Uzorci iz reaktora od 100 μl (za analizu reaktanta i produkta) razrjeđivani su u redestiliranoj H<sub>2</sub>O (10 i 100 puta). Za mjerenje aktivnosti enzima u reaktoru uzimani su uzorci od 10 μl.

## Obrada podataka

Na temelju eksperimentalnih podataka dobivenih pri određivanju kinetike reakcije, koji su dobiveni u obliku ovisnosti aktivnosti enzima (ili početne reakcijske brzine) o koncentraciji supstrata (ispitivanje kinetike enzimi katalizirane reakcije), procijenjeni su kinetički parametri modela. Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijom primjenjujući simpleksnu metodu i metodu najmanjih kvadrata koje su sadržane u programskom paketu Scientist.<sup>16</sup> Rezultati dobiveni simulacijom s pomoću matematičkog modela uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih podataka i vrijednosti izračunatih s pomoću modela. Razlika između vrijednosti eksperimentalnih podataka i onih proračunatih s pomoću modela dana je kao suma kvadrata.

Matematički model procesa hidratacije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela. Reakcija biotransformacije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu je povratna, stoga model sadrži bilančne jednadžbe za hidrataciju fumarne kiseline i dehidrataciju L-jabučne kiseline. Kinetika je opisana Michaelis-Menteničinim izrazom. Osim kinetičkog modela (jed. 1 i 2), za matematički model procesa u kotlastom reaktoru postavljene su bilančne jednadžbe za fumaru kiselinu (jed. 3) i L-jabučnu kiselinu (jed. 4). Pretpostavljeno je da će tijekom eksperimenta u kotlastom reaktoru doći do deaktivacije enzima čija je brzina opisana kinetičkim modelom prvog reda (jed. 5). Konstanta deaktivacije procijenjena je na temelju eksperimentalnih podataka ovisnosti aktivnosti enzima o vremenu.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \gamma_{\text{fumaraza}} C_{\text{fumarina}}}{K_m^{\text{fumarina}} + C_{\text{fumarina}}} \quad (1)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \gamma_{\text{fumaraza}} C_{\text{jabučna}}}{K_m^{\text{jabučna}} + C_{\text{jabučna}}} \quad (2)$$

$$\frac{dc_{\text{fumarina}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (3)$$

$$\frac{dc_{\text{jabučna}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (4)$$

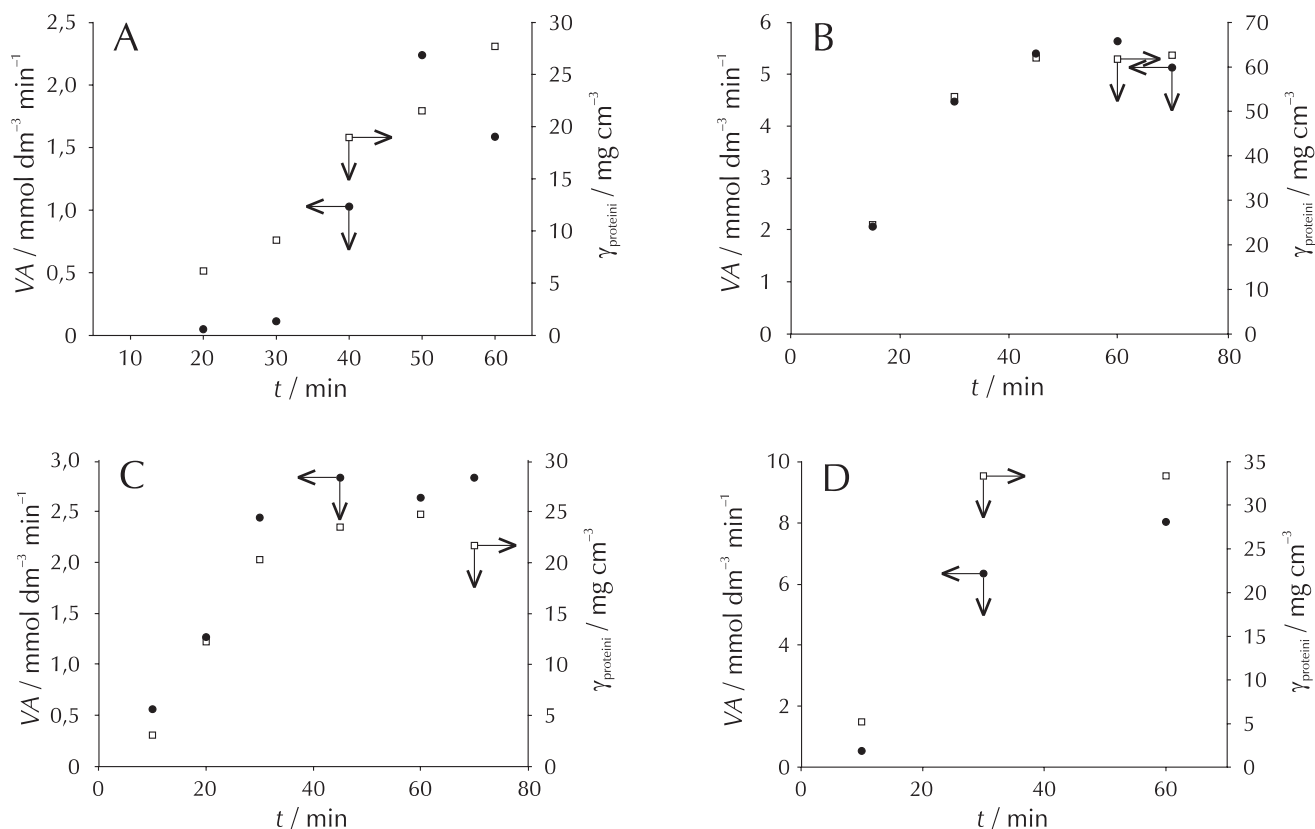
$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad (5)$$

## Rezultati i rasprava

### Izolacija i pročišćavanje fumaraze iz pekarskog kvasca

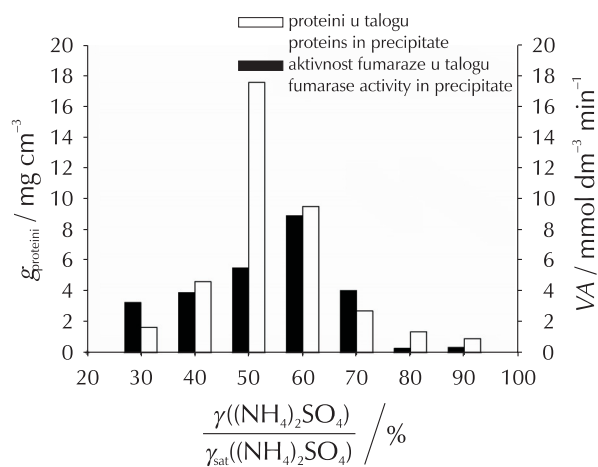
Cilj ovih istraživanja bio je pronaći minimalno vrijeme potrebno za razbijanje stanica pri kojem bi se dobila maksimalna volumna aktivnost fumaraze te odrediti koji je način razbijanja stanica najučinkovitiji. Slike 1A i B prikazuju utjecaj vremena razbijanja stanica staklenim kuglicama na aktivnost fumaraze i koncentraciju proteina u supernatantu nakon provedenog centrifugiranja. Rezultati prikazani na slici 1A su dobiveni upotrebom pet puta manje količine staklenih kuglica od onih prikazanih na slici 1B. Ovi rezultati pokazuju da je moguće dobiti oko 2,5 puta veću maksimalnu aktivnost fumaraze upotrebljavajući veću količinu kuglica. Maksimalna volumna aktivnost fumaraze u tom slučaju je iznosila oko 5,7 mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> nakon 60 minuta razbijanja (slika 1B). Utjecaj vremena razbijanja na aktivnost fumaraze i koncentraciju proteina u supernatantu, kada su stanice razbijane s pomoću ultrazvuka, može se vidjeti na slici 1C. Aktivnost fumaraze prati koncentracija proteina, te je nakon 30 min razbijanja ultrazvukom aktivnost gotovo jednaka onoj dobivenoj razbijanjem stanica 45, 60 i 70 minuta. Valja primijetiti da je ovdje maksimalna volumna aktivnost fumaraze oko 2,75 mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>, što je oko dva puta manje nego kada su stanice razbijane s pomoću veće mase staklenih kuglica (slika 1B). Koncentracija kvasca u oba slučaja je bila jednaka, osim što je obujam otopine bio veći zbog veličine ultrazvučne sonde. Na slici 1D su prikazani rezultati razbijanja stanica kombiniranim djelovanjem staklenih kuglica i ultrazvuka. Kako se vidi, ovdje je dobivena maksimalna aktivnost fumaraze oko 8,0 mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>, koja je oko 1,4 puta veća od aktivnosti enzima kada su stanice razbijane samo staklenim kuglicama i oko 2,9 puta veća kada su stanice razbijane samo ultrazvukom. Maksimalnu aktivnost fumaraze moguće je dobiti nakon 60 min razbijanja. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da je od primijenjenih, najučinkovitija metoda razbijanja stanica ona koja kombinira ultrazvuk i staklene kuglice, a razbijanje traje 60 min.

Nakon razbijanja stanica uzorci su centrifugirani. Ovako dobiveni supernatant je upotrijebljen u slijedećem koraku izdvajanja fumaraze iz stanica; taloženju s pomoću amonijeva sulfata. Proteini su taloženi pri različitim koncentracijama amonijeva sulfata u odnosu na koncentraciju zasićenja  $\gamma_{\text{sat}}$  te su dobiveni rezultati prikazani na slici 2. Oni pokazuju da je značajnija aktivnost fumaraze u talogu određena pri koncentraciji amonijeva sulfata između 40 i 70 % u odnosu na  $\gamma_{\text{sat}}$  koja iznosi 514,72 g dm<sup>-3</sup>. Iz toga slijedi da je prvo potrebno provesti taloženje proteina do 40 % od koncentracije zasićenja amonijevim sulfatom, a zatim se dobiveni talog odbacuje jer u njemu gotovo nema enzima fumaraze. Supernatant se dalje upotrebljava za taloženje proteina s amonijevim sulfatom do 70 % u odnosu na  $\gamma_{\text{sat}}$ . Prema dobivenim rezultatima proteini koji pokazuju aktivnost fumaraze uglavnom se nalaze u ovako dobivenom talogu. Preostali supernatant nije se upotrebljavao za izdvajanje i pročišćavanje fumaraze. Talog s fumarazom se upotrebljava u daljnjim koracima pročišćavanja. U literaturi je opisano da se fumaraza iz srca svinje taloži pri koncentraciji amonijeva sulfata koja je između 40 i 65 %  $\gamma_{\text{sat}}$ <sup>17</sup> no podaci za fumarazu iz pekarskog kvasca nisu dostupni.



Slika 1 – Razbijanje stanica pekarskog kvasca: A) staklenim kuglicama ( $10 \text{ cm}^3$  fosfatnog pufera, 2 g kvasca, 2 g staklenih kuglica promjera 4 mm); B) s pomoću veće mase staklenih kuglica ( $10 \text{ cm}^3$  fosfatnog pufera, 2 g kvasca, 10 g staklenih kuglica promjera 4 mm); C) s pomoću ultrazvuka ( $40 \text{ cm}^3$  fosfatnog pufera, 8 g kvasca, 62 % amplitude); D) kombinacijom ultrazvuka i staklenih kuglica ( $40 \text{ cm}^3$  fosfatnog pufera, 8 g kvasca, 10 g staklenih kuglica promjera 4 mm, 62 % amplitude). Utjecaj vremena razbijanja na volumnu aktivnost fumaraze te koncentraciju proteina. • – volumna aktivnost fumaraze, □ – koncentracija proteina.

Fig. 1 – Baker's yeast cell disruption: A) by glass beads ( $10 \text{ cm}^3$  of phosphate buffer, 2 g of yeast, 2 g of glass beads – diameter 4 mm); B) by higher amount of glass beads ( $10 \text{ cm}^3$  of phosphate buffer, 2 g of yeast, 10 g of glass beads – diameter 4 mm); C) by ultrasound ( $40 \text{ cm}^3$  of phosphate buffer, 8 g of yeast, 62 % of amplitude); D) by the combination of ultrasound and glass beads ( $40 \text{ cm}^3$  of phosphate buffer, 8 g of yeast, 10 g of glass beads – diameter 4 mm, 62 % of amplitude). The influence of disruption time on fumarase volume activity and protein concentration. • – volume activity of fumarase, □ – protein concentration.



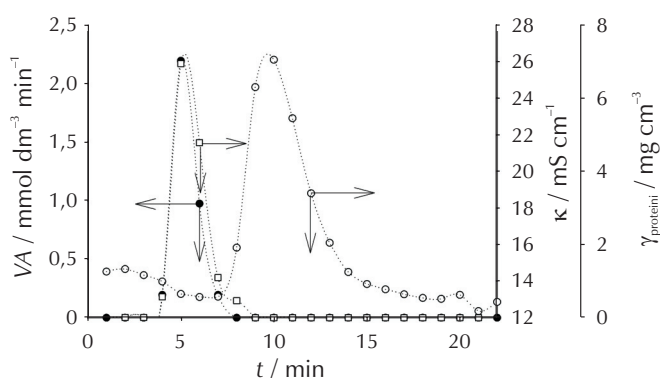
Slika 2 – Taloženje proteina s amonijevim sulfatom (2 g kvasca, 2 g staklenih kuglica promjera 2 mm,  $10 \text{ cm}^3$  fosfatnog pufera pH 6,8)

Fig. 2 – Protein precipitation by ammonium sulphate (2 g of yeast, 2 g of glass beads with diameter 2 mm,  $10 \text{ cm}^3$  of phosphate buffer pH 6.8)

Nakon što je fumaraza iz uzorka izdvojena taloženjem, soli i niskomolekulski proteini mogu se izdvojiti gel-filtracijskom kromatografijom u koloni napunjenoj gelom Sephadex G-50. Propuštanjem uzorka proteina kroz kolonu prikupljaju se frakcije od 5 ml te su rezultati dobiveni njihovom analizom prikazani na slici 3. Iz prikazanih krivulja vidi se da krivulja proteina prati krivulju aktivnosti fumaraze. Također se vidi krivulja soli dobivena mjerenjem vodljivosti u uzorcima, koja je razdvojena od krivulje proteina. Frakcije koje su imale visoku aktivnost fumaraze spojene su (u prikazanom primjeru na slici 3 su to bili uzorci 5 i 6), te su primijenjene u daljnjem postupku pročišćavanja. Ovdje valja naglasiti da je kapacitet upotrijebljene kolone relativno mali (obujam dodanog uzorka bio je  $2 \text{ cm}^3$ ), pa je postupak pročišćavanja fumaraze gel-filtracijom s pomoću ove kolone potrebno ponoviti u nekoliko navrata.

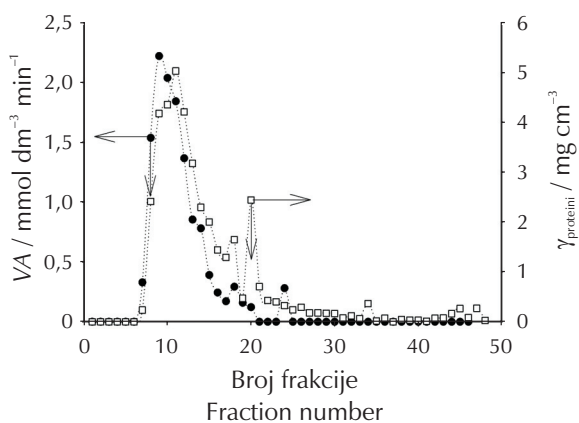
Kolona napunjena gelom Sephadex G-100 upotrijebljena je kako bi se razdvojili proteini različitih molekularnih masa, odnosno kako bi se fumaraza pročitila od prisutnih proteina različite molekularne mase. Nakon dodavanja uzorka na kolonu prikupljane su frakcije koje su analizirane. Rezultati

prikazani na slici 4 prikazuju koncentraciju proteina i aktivnost fumaraze u različitim frakcijama. Značajnija aktivnost enzima fumaraze određena je u frakcijama sedam do sedamnaest. Iz rezultata dobivenih za koncentraciju proteina u različitim frakcijama mogu se vidjeti i drugi pikovi, koji pripadaju proteinima koji imaju znatno manju aktivnost fumaraze (npr. frakcije 18 – 20 i frakcija 24). Kapacitet ove kolone je također relativno mali (obujam dodanog uzorka je bio 1 cm<sup>3</sup>), pa je postupak pročišćavanja proteina s pomoću kolone ovog kapaciteta nešto dugotrajniji. Početni uzorak je potrebno razdvojiti u više malih uzoraka (ovisno o koncentraciji proteina u uzorku) kako ne bi došlo do zasićenja kolone.



Slika 3 – Koncentracija proteina, aktivnosti fumaraze i vodljivosti u frakcijama nakon razdvajanja gel-filtracijom u koloni punjenoj gelom Sephadex G-50. ● – volumna aktivnost fumaraze, □ – koncentracija proteina, ○ – vodljivost.

Fig. 3 – Protein concentration, fumarase activity and conductivity of fractions separated by gel filtration on a column filled with Sephadex G-50. ● – volume activity of fumarase, □ – protein concentration, ○ – conductivity.



Slika 4 – Koncentracija proteina i aktivnosti fumaraze u frakcijama nakon razdvajanja gel-filtracijom u koloni punjenoj Sephadex G-100 gelom. ● – volumna aktivnost fumaraze, □ – koncentracija proteina.

Fig. 4 – Protein concentration and fumarase activity in fractions separated by gel filtration on a column filled with Sephadex G-100. ● – volume activity of fumarase, □ – protein concentration.

U tablici 1 prikazani su rezultati izolacije i pročišćavanja fumaraze iz pekarskog kvasca po svakom pojedinom koraku. Pri tome valja napomenuti da je odabran samo jedan

cjeloviti eksperiment. Tablica prikazuje kako se mijenjala aktivnost fumaraze te koncentracija proteina u uzorcima dobivenih nakon različitih koraka postupka izdvajanja i pročišćavanja ovog enzima. Ovdje treba naglasiti da su u svakom idućem koraku pročišćavanja primijenjene samo frakcije s visokom aktivnosti fumaraze. Iako navedena metoda nije selektivna na proteine različite molekulske mase, upravo odabirom samo frakcija s visokom aktivnošću proteina fumaraze smanjuje se ukupna količina proteina u uzorku, a kao posljedica povećava se specifična aktivnost fumaraze. Navedeni su podaci primijenjeni za proračun iskorištenja postupka izolacije fumaraze te za računanje stupnja pročišćavanja enzima. Iskorištenje svakog koraka je izračunato dijeljenjem ukupne aktivnosti fumaraze u pojedinom koraku s ukupnom aktivnošću u prvom koraku. Stupanj pročišćavanja enzima je izračunat dijeljenjem specifične aktivnosti enzima u pojedinom koraku sa specifičnom aktivnošću enzima u prvom koraku. Konačno iskorištenje u procesu pročišćavanja bilo je oko 25 %, što je u usporedbi sa 71 % dobivenih u radu *Keruchenka i sur.*<sup>11</sup> znatno manje. Ovi su autori primijenili selektivnije metode, te su imali manje gubitke tijekom izolacije. Stupanj pročišćavanja fumaraze na kraju procesa bio je 74 puta. Najviše fumaraze izgubljeno je u posljednjem koraku (gel-filtracijska kromatografija u koloni punjenoj gelom Sephadex G-100). Razlog tomu je najvjerojatnije što se ovaj korak provodi nekoliko dana, te u uzorcima stajanjem u hladnjaku fumaraza gubi aktivnost. S obzirom na to da je gel-punilo Sephadex G-100 selektivno za molarne mase do 100 000 g mol<sup>-1</sup>, može se očekivati da su u uzorku fumaraze još i proteini veće molekulske mase poput alkoholdehidrogenaze, koja se na ovaj način nije mogla ukloniti.

### Kinetička karakterizacija enzima

Kinetički parametri procijenjeni su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka i prikazani su u tablici 2. Kinetički parametri ukazuju na veći afinitet enzima prema L-jabučnoj kiselini u odnosu na fumarnu kiselinu ( $K_m^{\text{jabučna}} < K_m^{\text{fumarna}}$ ) te ukazuju na veću reakcijsku brzinu u smjeru nastajanja L-jabučne kiseline ( $V_{m1} > V_{m2}$ ). To također upućuje na položaj ravnoteže reakcije koji je više pomaknut u smjeru nastajanja produkta. Ako usporedimo kinetičke parametre fumaraze iz pekarskog kvasca i srca svinje, može se zaključiti da se radi o enzimima sličnih afiniteta prema fumarnoj i L-jabučnoj kiselini.<sup>9</sup>

### Biotransformacija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u kotlastom reaktoru

Izoliran i pročišćen enzim upotrijebljen je kao biokatalizator pri biotransformaciji fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u kotlastom reaktoru. Rezultati su prikazani na slici 5A. Tijekom eksperimenta je nezavisnim mjerenjima s pomoću enzimskog testa (opisanog u eksperimentalnom dijelu – poglavlje *Enzimski test za određivanje aktivnosti fumaraze*) praćena aktivnost fumaraze. Pokazalo se da aktivnost opada tijekom provođenja eksperimenta (slika 5B). Iz prikazane je ovisnosti procijenjena konstanta deaktivacije fumaraze,  $k_d$ , primjenjujući jed. 5, te ona iznosi  $0,0031 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$ . Razvijeni matematički model (jednadžbe 1–5) s procijenjenim kinetičkim parametrima (tablica 2) dobro opisuje eksperimentalne podatke.

T a b l i c a 1 – Prikaz ukupnih rezultata pročišćavanja fumaraze iz pekarskog kvasca

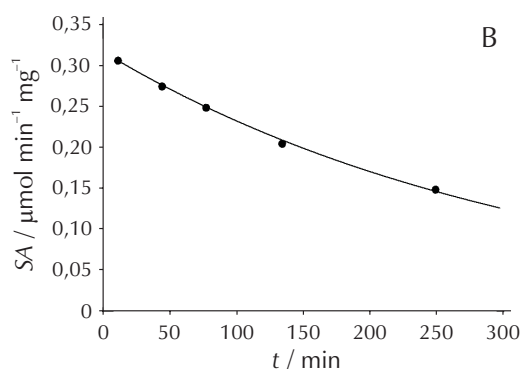
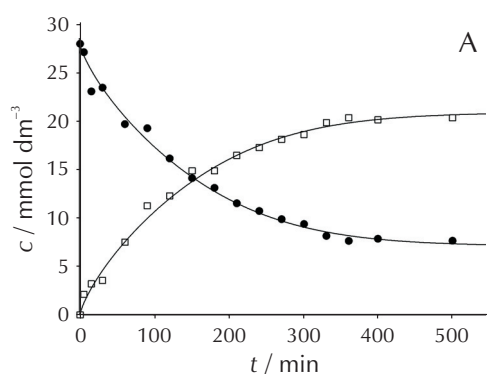
T a b l e 1 – Results of the fumarase purification procedure

	$\gamma_{\text{proteini}}$	VA	SA	V	Ukupna aktivnost	Ukupni proteini	Stupanj pročišćavanja	Iskorištenje
	$\frac{\gamma_{\text{proteini}}}{\gamma_{\text{proteini}}}$	$\frac{\text{mmol dm}^{-3}}{\text{min}^{-1}}$	$\frac{\mu\text{mol mg}^{-1}}{\text{min}^{-1}}$	$\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^3}$	Total activity	Total proteins	Purification degree	Yield
	$\text{g dm}^{-3}$	$\text{min}^{-1}$	$\text{min}^{-1}$		$\mu\text{mol min}^{-1}$	mg	–	–
uzorak nakon razbijanja stanica ultrazvukom i dva centrifugiranja sample after ultrasound cell disruption and two centrifugations	11,05	4,23	0,38	26,00	109,87	287,30		
supernatant nakon taloženja proteina s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 % od konc. zasićenja) supernatant after precipitation of proteins by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30 % of saturation conc.)	7,50	4,30	0,57	25,50	109,65	191,25	1,50	1,00
istaloženo iz supernatanta (iz prethodnog taloženja) s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 % od konc. zasićenja) precipitated from supernatant (from the previous step) by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 % of saturation concentration)	25,13	20,98	0,83	4,30	90,20	108,06	2,18	0,82
frakcije 4–7 nakon gel-filtracije Sephadexom G50 fractions 4–7 after gel filtration by Sephadex G50	1,69	5,10	3,02	18,00	91,76	30,42	7,89	0,83
frakcije 8–16 nakon gel-filtracije Sephadexom G100 fractions 8–16 after gel filtration by Sephadex G100	0,48	13,66	28,28	2,00	27,32	0,97	73,96	0,25

T a b l i c a 2 – Kinetički parametri izolirane fumaraze

T a b l e 2 – Kinetic parameters of the isolated fumarase

Parametar / Parameter	Jedinica / Unit	Vrijednost / Value
$V_{m1}$	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	$0,338 \pm 0,005$
$V_{m2}$	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	$0,103 \pm 0,005$
$K_m^{\text{fumarana}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$5,520 \pm 0,230$
$K_m^{\text{jabučna}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$2,000 \pm 0,460$



Slika 5 – A) Biotransformacija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u kotlastom reaktoru (fosfatni pufer pH 6,8,  $T = 30^\circ\text{C}$ ,  $V_{\text{reaktor}} = 17 \text{ cm}^3$ ,  $VA_{\text{reaktor}} = 0,188 \mu\text{mol min}^{-1} \text{dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{fumaraza}} = 0,557 \text{ mg cm}^{-3}$ ); • – koncentracija fumarne kiseline, □ – koncentracija L-jabučne kiseline, linija – simulacija matematičkim modelom. B) Promjena aktivnosti enzima tijekom eksperimenta; • – aktivnost fumaraze, linija – simulacija matematičkim modelom.

Fig. 5 – A) Biotransformation of fumaric acid into L-malic acid in the batch reactor (phosphate buffer pH 6.8,  $T = 30^\circ\text{C}$ ,  $V_{\text{reaktor}} = 17 \text{ cm}^3$ ,  $VA_{\text{reaktor}} = 0.188 \mu\text{mol min}^{-1} \text{dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{fumaraza}} = 0.557 \text{ mg cm}^{-3}$ ); • – fumaric acid concentration, □ – L-malic acid concentration, line – mathematical model simulation. B) The change of the fumarase activity during the experiment; • – fumarase activity, line – mathematical model simulation.

## Zaključci

Od primijenjenih metoda razbijanja stanica pekarskog kvasca najučinkovitijim se pokazalo razbijanje stanica kombinacijom ultrazvuka i staklenih kuglica, pri čemu je dobivena najviša volumna aktivnost fumaraze oko 8,0 mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>.

Selektivno je moguće istaložiti fumarazu dodatkom amonijeva sulfata u koncentraciji između 40 i 70 % od  $\gamma_{\text{sat}}$  amonijeva sulfata.

Gel-filtracijom razdvojeni su proteini fumaraze od ostatka otopine uz najveći gubitak proteina u koloni punjenoj gelom Sephadex G-100 radi malog kapaciteta kolone.

Ukupno iskorištenje izolacijskog postupka je oko 25 % zbog dugotrajnosti provedbe i dugog čuvanja uzoraka pri 4 °C.

Ovim postupkom je pripremljena dovoljna količina fumaraze za biotransformaciju fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u kotlastom reaktoru, gdje je postignuta 74 %-tna konverzija fumarne te za njezinu kinetičku karakterizaciju. Razvijeni matematički model je dobro opisao eksperimentalne podatke.

Opisanim se postupkom izolacije i pročišćavanja enzima može dobiti dovoljna količina biokatalizatora za laboratorijsku upotrebu.

## ZAHVALA

Autori rada zahvaljuju Hrvatskoj zakladi za znanost (projekt uspostavne potpore – Održivi bioseparacijski procesi) te Ministarstvu znanosti obrazovanja i športa (projekt Biokatalizatori i biotransformacije – 125-1252086-2793) na financiranju ovog rada.

## Popis simbola

### List of symbols

- $c$  – množinska koncentracija, mmol dm<sup>-3</sup>  
– molar concentration, mmol dm<sup>-3</sup>
- $K_m$  – Michaelisova konstanta, mmol dm<sup>-3</sup>  
– Michaelis constant, mmol dm<sup>-3</sup>
- $k_d$  – konstanta deaktivacije enzima, min<sup>-1</sup>  
– enzyme deactivation constant, min<sup>-1</sup>
- $r$  – brzina reakcije, mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>  
– reaction rate, mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>
- $SA$  – specifična aktivnost,  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$   
– specific activity,  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$
- $t$  – vrijeme, min  
– time, min
- $V$  – obujam, dm<sup>3</sup>, cm<sup>3</sup>  
– volume, dm<sup>3</sup>, cm<sup>3</sup>
- $V_m$  – maksimalna brzina reakcije,  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$   
– maximal reaction rate,  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
- $VA$  – volumna aktivnost,  $\mu\text{mol cm}^{-3} \text{min}^{-1}$ , mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>  
– volume activity,  $\mu\text{mol cm}^{-3} \text{min}^{-1}$ , mmol dm<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>
- $X$  – konverzija, 1, %  
– conversion, 1, %
- $\gamma$  – masena koncentracija, mg cm<sup>-3</sup>  
– mass concentration, mg cm<sup>-3</sup>

- $\gamma_{\text{sat}}$  – masena koncentracija zasićenja (topljivost), g dm<sup>-3</sup>  
– saturation mass concentration (solubility), g dm<sup>-3</sup>
- $\kappa$  – vodljivost, mS cm<sup>-1</sup>  
– conductivity, mS cm<sup>-1</sup>

## Literatura

### References

1. I. Chibata, T. Tosa, I. Takata, Continuous production of L-malic acid by immobilized cells, *Trends Biotechnol.* **1** (1983) 9–11.
2. E. Bressler, O. Pines, I. Goldberg, S. Braun, Conversion of fumaric acid to L-malic by sol-gel immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a supported liquid membrane bioreactor, *Biotechnol. Prog.* **18** (2002) 445–450.
3. R. M. Zelle, E. de Hulster, W. A. van Winden, P. de Waard, C. Dijkema, A. A. Winkler, J.-M. A. Geertman, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, A. J. A. van Maris, Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export, *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (2008) 2766–2777.
4. J. A. Guerrero-Beltrán, B. G. Swanson, G. V. Barbosa-Cánovas, Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid, *LWT – Food Sci. Technol.* **38** (2005) 625–630.
5. E. Martinoia, D. Rentsch, Malate compartment – responses to a complex metabolism, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45** (1994) 447–467.
6. A. R. Fernie, E. Martinoia, Malate. Jack of all trades or master of a few?, *Phytochemistry* **70** (2009) 828–832.
7. A. Vrsalović Presečki, B. Zelić, Đ. Vasić-Rački, Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells, *Enzyme Microb. Technol.* **41** (2007) 605–612.
8. I. Goldberg, J. S. Rokem, O. Pines, Organic acids: old metabolites, new themes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81** (2006) 1601–1611.
9. A. Vrsalović Presečki, B. Zelić, Đ. Vasić-Rački, Modelling of continuous L-malic acid production by porcine heart fumarase and fumarase in yeast cells, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **23** (4) (2009) 519–525.
10. P. D'arrigo, G. Pedrocchi-Fantoni, S. Servi, Old and new synthetic capacities of Baker's yeast, *Adv. Appl. Microbiol.* **44** (1997) 81–123.
11. J. S. Keruchenko, I. D. Keruchenko, K. L. Gladilin, V. N. Zaitsev, N. Y. Chirgadze, Purification, characterization and preliminary X-ray study of fumarase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* **1122** (1992) 85–92.
12. S. A. Woods, J. S. Miles, J. R. Guest, Sequence homologies between arginosuccinase, aspartase and fumarase – a family of structurally related enzymes, *FEMS Microbiol. Lett.* **51** (1988) 181–186.
13. L. Kanarek, R. L. Hill, The preparation and characterization of fumarase from swine heart muscle, *J. Biol. Chem.* **239** (1964) 4202–4206.
14. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.
15. H. Z. Lian, L. Mao, X. L. Ye, J. Miao, Simultaneous determination of oxalic, fumaric, maleic and succinic acids in tartaric and malic acids for pharmaceutical use by ion-suppression reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Pharm Biomed. Anal.* **19** (1999) 621–625.
16. Scientist handbook, Micromath®, Salt Lake City, 1986–1995.
17. S. Beeckmans, L. Kanarek, A new purification procedure for fumarase based of affinity chromatography, *Eur. J. Biochem.* **78** (1977) 437–444.

## SUMMARY

### Isolation and Kinetic Characterization of Fumarase from Baker's Yeast

Z. Findrik,\* E. Smailbegović, M. Prkačin, and Đ. Vasić-Rački

Isolation and purification of fumarase (fumarate hydratase EC 4.2.1.2) from baker's yeast was carried out. Yeast cells were disrupted by three methods: glass beads, ultrasound, and the combination of these two methods. Cell disruption methods were compared in their efficiency in Fig. 1. Protein fractionation was carried out by precipitation with ammonium sulphate. The concentrations of ammonium sulphate necessary for fumarase precipitation were found experimentally and are presented in Fig. 2. After precipitation, fumarase samples were purified by gel filtration chromatography on columns filled with Sephadex G50 and Sephadex G100. Examples of the elution curve of one protein suspension sample on both columns are presented in Fig. 3 and Fig. 4. Only the samples having high fumarase activity were used in the next purifying step. Table 1 presents the collective results of the fumarase purification procedure. The techniques used enabled purification of fumarase with a yield of 25 %. The purified enzyme was employed in the hydration of fumaric acid to L-malic acid. Kinetic constants of fumarase were estimated and are presented in Table 2. They were determined from the experimental data measured by the initial reaction rate method. The hydration of fumaric acid to L-malic acid was carried out in a batch reactor and the results are presented in Fig. 5. The kinetic model was developed on the basis of kinetic data and reaction scheme, as presented by equations 1 and 2. It was combined with the mass balances in the batch reactor presented by equations 3 and 4. Considering that fumarase deactivation occurs, it was proposed that the activity loss could be described by a first-order kinetic model (equation 5). Fumarase activity was followed during the batch experiment by the enzyme assay and it was found that activity decay occurs. Deactivation constant was estimated from the independent experimental results and found to be  $0.0031 \text{ min}^{-1}$ .

University of Zagreb,  
Faculty of Chemical Engineering and Technology,  
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Croatia

Received September 5, 2011  
Accepted January 16, 2012