



УДК 579.6: 577.152.1

ОПТИМІЗАЦІЯ СИНТЕЗУ ТА РОЗРОБКА СХЕМИ ОЧИЩЕННЯ D-ЛАКТАТ : ЦИТОХРОМ С ОКСИДОРЕДУКТАЗИ РЕКОМБІНАНТНОГО ШТАМУ ДРІЖДЖІВ *OGATAEA (HANSENULA) POLYMORPHA* “tr6”

О. В. Смуток, М. І. Карковська, Т. М. Прокопів, М. В. Гончар

Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна
e-mail: smutok.oleg.2015@gmail.com

Здійснено оптимізацію умов синтезу D-лактат : цитохром с оксидоредуктази (КФ 1.1.2.4; DLDH) клітинами рекомбінантного штаму дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha* “tr6” (*gcr1 catX Δcyb2/DLD1*). Штам характеризується порушенням глюкозної катаболічної репресії, делецією гена *CYB2*, що кодує L-лактат : цитохром с оксидоредуктазу, та шестикратним надсинтезом DLDH. Проведено виділення й очищення цільового ферменту з використанням іонообмінної хроматографії. Оптимізовано склад культурального середовища й умов культивування дріжджів для отримання біомаси клітин із найвищою питомою активністю DLDH. Аналіз ростої біомаси штаму *O. polymorpha* “tr6” виявив, що клітини рекомбінантних дріжджів найкраще ростуть на середовищі з 1 % гліцеролом і 0,5 % рацематом лактату, водночас найвища питома активність DLDH і найнижча неспецифічна фериціанід-редуктазна активність спостерігаються під час вирощування клітин на середовищі з 1 % етанолом і 0,5 % рацематом лактату. Досліджено вплив деяких іонів дво-валентних металів на активність DLDH у пермеабілізованих клітинах *O. polymorpha* “tr6”. З’ясовано, що додаткове внесення в поживне середовище іонів Zn^{2+} помітно підвищує активність DLDH у безклітинних екстрактах дріжджів. Виділення мембранозв’язаного ферменту DLDH здійснювали з використанням методів фізичного руйнування клітин. Очищення DLDH проводили на іонообмінному сорбенті DEAE-Toyopearl 650M. Вихід ферменту після хроматографічного очищення становив майже 50 %. Найвища питома активність в окремих фракціях зі семикратним ступенем очищення сягала 1,1 Од·мг⁻¹. Досліджено деякі фізико-хімічні властивості очищеного препарату DLDH рекомбінантного штаму дріжджів *O. polymorpha* “tr6”.

Ключові слова: D-лактат : цитохром с оксидоредуктаза, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, синтез, виділення, рекомбінантні клітини

ВСТУП

D-лактат : цитохром с оксидоредуктаза (КФ 1.1.2.4; DLDH) – це ФАД⁺-залежний Zn^{2+} -вмісний гомодимерний ензим, який завдяки своїм унікальним каталітичним властивостям (абсолютна специфічність до D-енантіомеру лактату й непотрібність

екзогенного кофактора), має важливе науково-практичне значення. З фундаментальної точки зору, DLDH є зручною моделлю для досліджень молекулярного розпізнавання між білками редокс-партнерами – DLDH і цитохромом с та механізмів дегідрування D-лактату цинковмісним ферментом. У практичному аспекті DLDH може використовуватись як біоселективний каталітичний елемент біосенсорів і ензиматичних наборів для визначення D-енантіомеру молочної кислоти в біологічних рідинах і харчових продуктах.

D-лактат як аналіт став актуальним відносно недавно. З'ясувалося, що екзогенний D-лактат у підвищеній концентрації є токсичним для дітей і дорослих зі синдромом короткого кишківника і погіршує стан хворих на енцефалопатію, у зв'язку з чим виникає необхідність контролювати вміст D-лактату у ферментованих продуктах (як побічний продукт ферментації глюкози небажаною мікрофлорою). Крім того, D-лактат розглядається як потенційний маркер для оцінки тяжкості цукрового діабету, оскільки ця кислота накопичується в сироватці крові внаслідок посилення шунтового шляху метаболізму тріозофосфатів до метилгліоксалу та відновлення останнього до D-молочної кислоти. Водночас М.М. Крістофер [3] встановив, що підвищення концентрації D-лактату в сироватці крові зумовлюється кетоацидозом, а не гіперглікемією. Припускають, що метаболізм кетонів за участю цитохромів печінки може бути основним джерелом метилгліоксалу у хворих на цукровий діабет. У них удвічі вища концентрація D-лактату порівняно зі здоровими людьми, що становить 28 мкмоль·л⁻¹ і 13 мкмоль·л⁻¹, відповідно [5]. У хворих спостерігається також підвищена концентрація ферментів, залучених у метаболізм гліоксалу, – альдозоредуктази, гліоксалази I і гліоксалази II [10]. До ускладнень у хворих на цукровий діабет належать ретинопатії [14], нефропатії [2] і нейропатії [15], спричинені продуктами метаболізму метилгліоксалу. Клінічно D-лактат відіграє важливу роль у формуванні ускладнень у пацієнтів із цукровим діабетом [8], тому цей метаболіт може бути використаний як маркер стану хворих із цією патологією.

На сьогодні відомі два основних підходи для аналізу D-молочної кислоти – ензиматичний метод за використання стереоспецифічної бактерійної NAD⁺-залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) і стереоселективної хроматографії, яка дає змогу розділити два енантіомери у формі комплексів з іонами купруму. Описані методи на основі NAD⁺-залежної ЛДГ мають низку недоліків: неабсолютна селективність, необхідність використання екзогенного кофактора та додаткових піруват-зв'язувальних реагентів (гідазину або 2-аміно-2-метил-1,3-пропанодіолу) чи ферментів (глутамат-піруват трансамінази), що додатково підвищує вартість методів і ускладнює процедуру аналізу. Недоліками використання стереоселективної хроматографії є трудомісткість етапу підготовки і тривалість процедури проведення самої хроматографії. Саме тому пошук альтернативних ферментів, придатних для розробки нових швидких і простих підходів визначення D-молочної кислоти, є на сьогодні актуальним завданням. Окрім того, нещодавно нами була доведена можливість використання дріжджів-продуцентів DLDH під час конструювання біореактора для ефективного усунення токсичного D-лактату з біологічних рідин [6].

Мета роботи – оптимізація умов синтезу й опрацювання схеми виділення та очищення D-лактату: цитохром с оксидоредуктази, із клітин рекомбінантного штаму дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha* "tr6" (*gcr1 catX Δcyb2/DLD1*), що характеризується пошкодженою глюкозною катаболітною репресією, відсутністю L-лактату: цитохром с оксидоредуктазної активності й шестикратним надсинтезом DLDH [13].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мікроорганізми. У роботі використовували рекомбінантний штам дріжджів *Ogataea polymorpha* "tr6" (*gcr1 catX Δcyb2/DLD1*) – надпродуцент DLDH з делетованим геном *CYB2* [13].

Умови культивування. Вихідний штам зберігали на скосах із багатим агаризованим середовищем (YPD) (г·л⁻¹): глюкоза – 20 г, дріжджовий екстракт – 5 г, пептон – 10 г, агар – 20 г. Дріжджі вирощували до середини логарифмічної або до початку стаціонарної фази росту (залежно від умов експерименту) в колбах Ерленмейера на круговому шейкері (240 об·хв⁻¹) за 30 °С в середовищі Беркгольдера – СБ [12] такого складу: КН₂РO₄ – (0,5–1) г·л⁻¹; (NH₄)₂SO₄ – (3–3,5) г·л⁻¹; MgSO₄·7H₂O – (0,2–0,5) г·л⁻¹; СаCl₂ – 0,1 г·л⁻¹. До СБ додавали дріжджовий екстракт "Діфко" до кінцевої концентрації 0,5 %. Як джерело карбону й енергії використовували суміш 1 % глюкози та 0,5 % рацемату лактату, або 1 % EtOH та 0,5 % рацемату лактату. Для вивчення впливу іонів двовалентних металів на активність цільового ферменту в середовище додавали розчин 1 мМ ZnSO₄ або FeSO₄.

Визначення концентрації клітин. Біомасу клітин (у мг абсолютної маси на 1 мл суспензії) визначали за мутністю розведених суспензій способом їхнього фотометрування на фотоелектроколориметрі ФЕК–56М (540 нм, світлофільтр № 6, кювета з довжиною оптичного шляху 3 мм). Розрахунок коефіцієнта перерахунку для ФЕК–56М проводили за кривою гравіметричного калібрування. Розрахунок концентрації клітин проводили за формулою:

$$C = \frac{E \cdot n}{1,33},$$

де C – концентрація клітин; E – оптична густина за 540 нм; n – розведення вихідної суспензії; 1,33 – коефіцієнт перерахунку, визначений під час калібрування гравіметричним методом.

Отримання безклітинних екстрактів із клітин *O. polymorpha* "tr6". Для приготування суспензії клітин дріжджів біомасу промивали двічі водою та один раз 50 мМ фосфатним буфером (ФБ), рН 7,8 (до концентрації 90–100 мг·мл⁻¹). Суспензії клітин розливали у склянки для гомогенізації, вносили скляні кульки (діаметр 0,45–0,5 мм) у кількості 3/4 від об'єму суспензії та заморожували. Клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі по 2 хв за 1000 об·хв⁻¹ та 0 °С. Безклітинні екстракти (БЕ) відокремлювали від уламків клітин центрифугуванням (15 000 об·хв⁻¹, $r_{\text{сер}} = 8$ см, 30 хв, 4 °С). Осади промивали 50 мМ ФБ, рН 7,8, повторно руйнували і центрифугували. У БЕ визначали активність цільового ферменту і концентрацію загального білка.

Визначення концентрації білка. Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали методом Лоурі, який ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів реакції ароматичними амінокислотами з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [7]. Калібрувальним стандартом слугував альбумін сироватки крові бика.

Визначення активності DLDH. Активність DLDH визначали спектрофотометрично, за рівнем відновлення фериціаніду калію за наявності D-лактату як субстрату і $\lambda = 420$ нм [1].

Реакційна суміш такого складу: 0,03 М фосфатний буфер, рН 7,8; 0,016 М D-лактат; 0,83 мМ калію фериціаніду (K₃Fe(CN)₆); 0,02 мл екстракту. Питому масову

активність (ПА) розраховували за формулою (1), а питому об'ємну активність (ВА) – за формулою (2):

$$PA = \frac{\Delta E / \text{хв} \cdot V_p \cdot n}{\varepsilon_{\text{мм}} \cdot C_6 \cdot V_e}; \quad (1) \quad VA = \frac{\Delta E / \text{хв} \cdot V_p \cdot n}{\varepsilon_{\text{мм}} \cdot V_e}, \quad (2)$$

де $\Delta E / \text{хв}$ – зміна оптичної густини за $\lambda = 420 \text{ нм/хв}$; V_p – об'єм реакційної суміші, мл; n – первинне розведення екстракту; $\varepsilon_{\text{мм}}$ – мілімолярний коефіцієнт екстинкції калію фериціаніду, що дорівнює $1,04 \text{ мм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; V_e – об'єм екстракту, мл; C_6 – концентрація білка в екстракті, $\text{мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. У разі визначення ПА DLDH у пермеабілізованих клітинах замість концентрації білка використовували значення концентрації “тіней” клітин, яку визначали відповідно до методики “визначення концентрації клітин”.

Питому активність ферментів ($\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка) розраховували за формулою, враховуючи різницю між специфічною активністю (+ субстрат) і неспецифічною активністю (без субстрату):

$$A = A_{+\text{Lact}} - A_{-\text{Lact}}$$

За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, яка за стандартних умов визначення зумовлює окислення 1 мкмоль D-лактату за 1 хв.

Визначення активності алкогольоксидази (АО). Активність АО визначали за кількістю продукованого пероксиду водню за 1 хв у перерахунку на 1 мг вологої маси пермеабілізованих клітин. Пероксид водню аналізували фотометрично за утворенням кольорового продукту пероксидазного окислення *o*-діанізідину [4].

Підготовка сорбенту DEAE–Toyorearl 650M. Іонообмінну целюлозу DEAE–Toyorearl 650M (TSK–GEL, Японія) промивали 0,5 M HCl (у об'ємному співвідношенні 1:15), далі dH_2O , опісля промивали 0,5 M NaOH, у такому ж співвідношенні. Сорбент зрівноважували 25 mM ФБ, pH 7,8 (у об'ємному співвідношенні 1:15). Підготований сорбент зберігали за $+4^\circ\text{C}$.

Статистичний аналіз експериментальних даних. Досліди проводили у трьох повторях. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (M) і стандартну похибку (m). Розрахунок статистичних показників і побудову графіків проводили за допомогою програми OriginPro 8,5. Вказані параметри та статистичні показники наведено в рисунках і таблицях.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Оптимізація синтезу D-лактат : цитохром с оксидоредуктази рекомбінантного штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* “tr6”. Стереоселективний до D-лактату флавоцитохром термотолерантних метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* кодується геном *DLD1*. На попередніх етапах досліджень було сконструйовано дріжджовий надпродуцент D-лактат : цитохром с оксидоредуктази (DLDH) *Ogataea polymorpha* “tr6” (*gcr1 catX Δcyb2/DLD1*). Конструювання штаму проводилось у два етапи. Для позбавлення специфічної L-лактат : цитохром с оксидоредуктазної активності було проведено делецію гена *CYB2* у батьківському штамі *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), що характеризується порушенням глюкозної катаболітної репресії та відсутністю каталазної активності. Пізніше гомологічний ген *DLD1* у складі плазмиди для мультикопійної інтеграції було надекспресовано в штамі *Δcyb2* під контролем сильного конститутивного промотора гена *AOX*. Одержаний рекомбінантний штам характеризувався шестикратним надсинтезом DLDH, порівняно з вихідним штамом [13].

Оптимізацію складу поживного середовища для максимального синтезу DLDH рекомбінантним штамом *O. polymorpha* "tr6" проводили з урахуванням оптимальних умов індукції промотора гена AOX у вихідному реципієнтному штамі *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*). У цього штаму пошкоджена катаболітна репресія, внаслідок чого у середовищі з глюкозою спостерігається конститутивний синтез DLDH під контролем промотора AOX. Окрім того, відомо, що максимальна експресія AOX для цього штаму відбувається на середовищі з концентрацією дріжджового екстракту від 0,2 % [4]. З урахуванням цього факту в середовище Беркгольдера із вмістом дріжджового екстракту 0,5 % вносили різні джерела карбону й енергії.

Окрім глюкози, як джерело карбону та енергії було використано етанол і гліцерол (рис. 1).

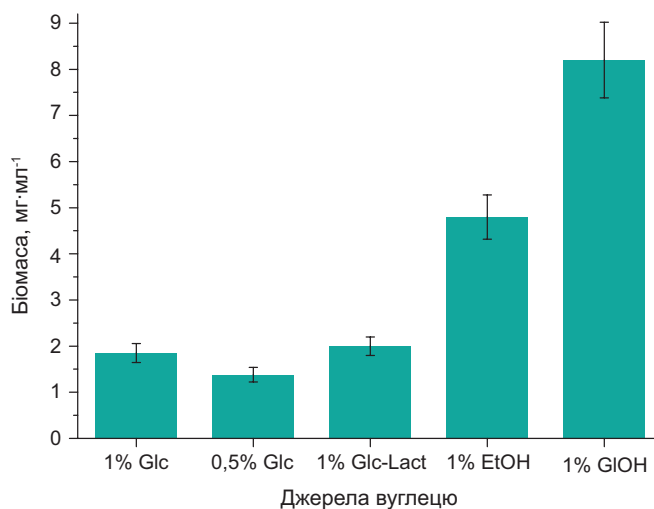


Рис. 1. Ріст клітин штаму *O. polymorpha* "tr6", під час вирощування на різних джерелах карбону за 30 °C з додаванням 0,5% рацемату лактату. Скорочення: Glc – глюкоза; Lact – рацемат лактату; EtOH – етанол; GIOH – гліцерол

Fig. 1. Growth of *O. polymorpha* "tr6" cells at cultivation with various carbon sources at 30 °C and addition of 0.5% racemic lactate. Abbreviations: Glc – glucose; Lact – racemic lactate; EtOH – ethanol; GIOH – glycerol

Аналіз росту біомаси штаму "tr6" виявив, що клітини дріжджів найкраще ростуть на середовищі з 1% GIOH і 0,5% рацематом лактату, досягаючи значення біомаси 8,2 мг·мл⁻¹. Удвічі нижчою є концентрація клітин у разі використання 1% EtOH з 0,5% рацематом лактату. На середовищі з концентраціями глюкози 1,0 і 0,5%, з чи без додовання рацемату лактату накопичення біомаси було в 4 рази нижчим, ніж на середовищі з 1% гліцеролом.

Наступним кроком було виявлення середовища, на якому спостерігали найвищу питому активність DLDH і найнижчу неспецифічну фериціанідредуктазну активність. Для цього було проведено пермеабілізацію попередньо відмитих клітин і отримано "тіні" клітин, у яких визначали специфічну та неспецифічну активності ферменту (рис. 2).

Найнижчу неспецифічну фериціанідредуктазну активність спостерігали у "тінях" клітин, вирощених на середовищі з 1% EtOH і 0,5% рацематом лактату, а специфічна D-лактатдегідрогеназна активність була тільки в 1,1 разу нижчою, порівняно

з клітинами, вирощеними на середовищі з 0,5–1% Glc (рис. 2). Саме тому середовище, яке містило 1% EtOH і 0,5% рацемат лактату, було обрано як оптимальне для вирощування клітин штаму для виділення ферменту.

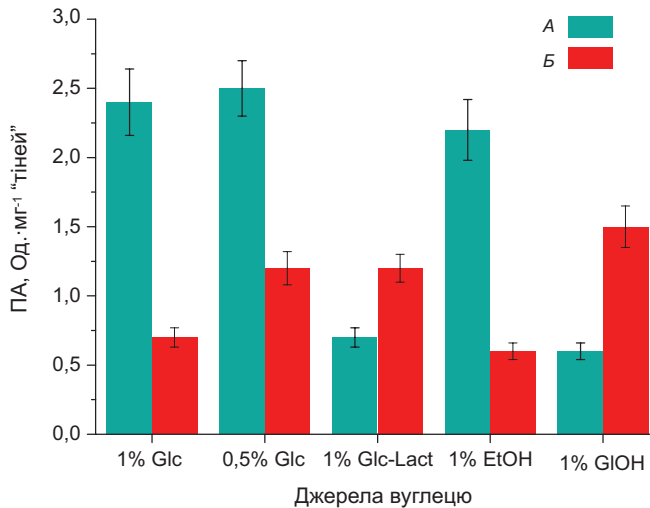


Рис. 2. D-лактатзалежна (А) та неспецифічна (Б) фериціанідредуктазна активності пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* "tr6" під час вирощування на різних джерелах карбону з додаванням 0,5% рацемату лактату. Скорочення: Glc – глюкоза; Lact – рацемат лактату; EtOH – етанол; GIOH – гліцерол

Fig. 2. D-lactate-specific (A) and non-specific (B) ferricyanide reductase activity of permeabilized *O. polymorpha* "tr6" cells at cultivation on different carbon sources, supplemented with 0.5% racemic lactate. Abbreviations: Glc – glucose; Lact – racemate of lactate; EtOH – ethanol; GIOH – glycerol

Досліджено також вплив хелатора ЕДТА і деяких двовалентних металів на активність DLDH у пермеабілізованих клітинах *O. polymorpha* "tr6" (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив преінкубації пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* "tr6" з металами або хелатуючим агентом ЕДТА (у концентраціях 1 мМ) на активність DLDH і неспецифічну фериціанідредуктазну активність

Table 1. Impact of preincubation of permeabilized *O. polymorpha* "tr6" cells with metals or EDTA as a chelating agent (at concentrations of 1 mM) on DLDH activity and non-specific ferricyanide reductase activity

	Контроль	ЕДТА	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Zn ²⁺ + Fe ²⁺
Специфічна активність DLDH, Од.·мг ⁻¹	1,9	1,5	2,5	2,3	0 (Інгіб.)	3	0,87
Неспецифічна активність, Од.·мг ⁻¹	1,7	1,4	2	1,3	0 (Інгіб.)	1,3	–

Як видно з табл. 1, хелатуючий агент ЕДТА на 23 % знижує активність DLDH в пермеабілізованих клітинах дріжджів, порівняно з контролем. Водночас іони Mg²⁺, Fe²⁺ та Zn²⁺ позитивно впливають на активність DLDH, підвищуючи її щодо контролю на 32, 21 та 58 %, відповідно. Проте поєднання іонів Zn²⁺ та Fe²⁺ не виявляє очікуваного кумулятивного ефекту, а навпаки, знижує активність DLDH у пермеабілізованих клітинах на 55 %, причини чого незрозумілі.

З огляду на значний активуючий ефект іонів Zn^{2+} та Fe^{2+} на активність DLDH, було проведено експеримент із додатковим внесенням цих металів (у кінцевій концентрації 1 мМ) у поживне середовище для нарощення культури *O. polymorpha* "tr6" (рис. 3).

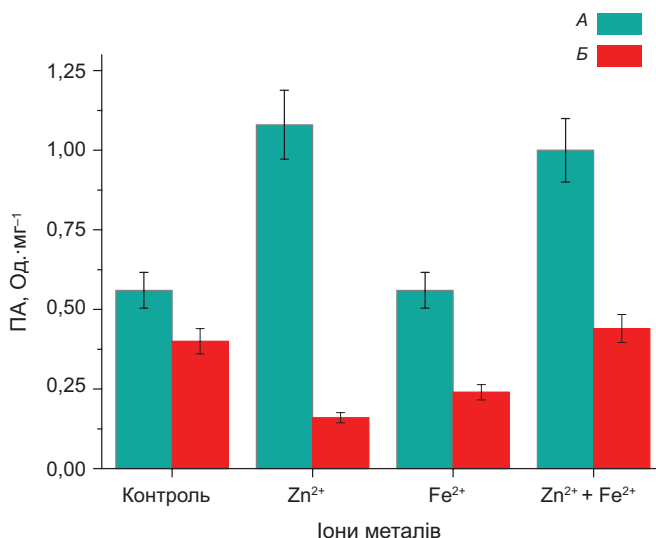


Рис. 3. D-лактатзалежна (А) та неспецифічна фериціанідредуктазна (Б) активності у безклітинних екстрактах дріжджів *O. polymorpha* "tr6" під час вирощування за наявності в середовищі деяких двовалентних металів (кінцева концентрація 1 мМ)

Fig. 3. D-lactate-specific (A) and non-specific ferricyanide reductase (B) activities in the cell-free *O. polymorpha* "tr6" yeast extracts at growth in the presence of some bivalent metals (at final concentration 1 mM)

Із рис. 3 видно позитивний вплив на специфічну DLDH-активність під час вирощування клітин дріжджів *O. polymorpha* "tr6" із додатковим внесенням у поживне середовище Zn^{2+} та Fe^{2+} . Проте у разі використання обох металів, окрім специфічної DLDH активності, значно підвищувалася неспецифічна фериціанідредуктазна активність, тому нарощення клітин для виділення ферменту проводили на середовищі з 1 мМ Zn^{2+} .

Оскільки штам *O. polymorpha* "tr6" було сконструйовано під сильним промото-ром гена алкогольоксидази, додавання метанолу (MeOH) має сприяти посиленню експресії гена *DLD1*. Для перевірки індукуючого впливу метанолу й оптимізації синтезу DLDH було використано середовище з додаванням метанолу та контрольне середовище без додавання цього карбонового субстрату. Кожні 8 год відбирали аліквоти клітин (експериментальна і контрольна), клітини відмивали, використовуючи стандартну процедуру. Опісля відмиті клітини зберігали за $-20^{\circ}C$ до процедури визначення активностей АО і DLDH. Для визначення активностей цільових ферментів було здійснено пермеабілізацію за допомогою цетилтриметиламоній броміду (ЦТАБ), концентрація отриманих "тіней" клітин становила 20 мг·мл⁻¹.

Дослідження профілю активності D-лактатдегідрогенази (DLDH) і алкогольоксидази (АО) штаму *O. polymorpha* "tr6" під час росту на середовищі з 2% глюкозою з додаванням і без додавання 0,5% метанолу представлено на рис. 4.

Для визначення профілю активності DLDH й усунення забруднення АО отриманих препаратів було використано середовище Беркгольдера – СБ [12] такого

складу: KH_2PO_4 – 1 г·л⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5 г·л⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 г·л⁻¹. До СБ додавали дріжджовий екстракт “Діфко” 0,5%. Як джерело карбону та енергії використовували суміш 2% глюкози та 0,5% MeOH або лише 2% глюкозу. Дріжджі вирощували до середини логарифмічної фази росту в колбах Ерленмейера на круговому шейкері (240 об·хв⁻¹) за 30 °С.

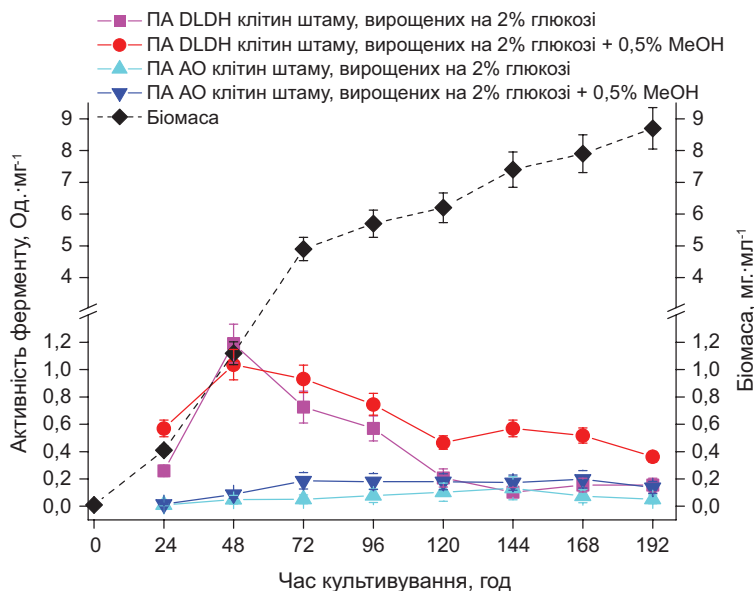


Рис. 4. Профіль ПА DLDH і алкогольоксидази (АО) пермеабілізованих клітин штаму *O. polymorpha* “tr6”.
Умови: клітини вирощували на середовищах з додаванням і без додавання 0,5% метанолу (MeOH)

Fig. 4. The profile of the activity of DLDH and alcohol oxidase (AO) of permeabilized *O. polymorpha* “tr6” cells.
Conditions: cells were grown in medium with addition and without adding 0.5% methanol (MeOH)

Найвищу ензиматичну ПА DLDH пермеабілізованих клітин спостерігали на 48–50-ту год росту (рис. 4). Тоді активність DLDH клітин, вирощених на середовищі з додаванням 0,5% MeOH, була вищою, хоча незначно, і становила 1,19 Од·мг⁻¹ порівняно з DLDH активністю, а клітин, вирощених на контрольному середовищі, – 1,0 Од·мг⁻¹ вологої маси “тіней” клітин. Водночас активність АО клітин, вирощених без і з додаванням 0,5% MeOH, була найнижчою у цей часовий період – 0,05 та 0,08 Од·мг⁻¹ вологої маси “тіней” клітин, відповідно. Саме тому 48–50 год є оптимальним проміжком часу для отримання препаратів з високою DLDH- і низькою АО активністю. Водночас на 48–50-ту год культивування дріжджів біомаса клітин становила тільки 1,1 мг·мл⁻¹, що є недостатньою кількістю для виділення DLDH. Тому для виділення DLDH клітини вирощували протягом 62 год, досягаючи значення біомаси клітин 3,3 мг·мл⁻¹.

Розробка схеми виділення DLDH із клітин штаму-продуцента *O. polymorpha* “tr6” та очищення ферменту. За основу схеми виділення DLDH *O. polymorpha* послуговував метод, описаний для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [9].

Клітини дріжджів трансформанта “tr6” *O. polymorpha* вирощували в колбах за 30 °С на шейкері протягом 62 год. На початку стаціонарної фази росту клітини осаджували центрифугуванням і двічі відмивали дистильованою водою та 50 мМ

ФБ, pH 7,8, від компонентів середовища. Відмиті клітини висушували та проводили їхнє фізичне руйнування в кульовому млині скляними кульками Балотіні. Руйнування відбувалося в ФБ, pH 7,8 без додання 1 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду, оскільки раніше нами було виявлено негативний вплив цих речовин на активність DLDH.

Руйнування клітин проводили за схемою: 1,5-хвилинне руйнування на Вортексі з 6 хв охолодження на льоді (повтор процедури 5 разів). Після цього відбирали БЕ, а до уламків клітин вносили 50 мМ ФБ, pH 7,8 та повторювали руйнування за попередньою схемою. Отриманий БЕ характеризувався активністю DLDH 1,2 Од·мл⁻¹. Однак оптимальною виявилася схема, яка включала 2-хвилинне руйнування на Вортексі та 8 хв охолодження на льоді (повтор двічі). Активність DLDH у БЕ за такої схеми фізичного руйнування становила 2 Од·мл⁻¹.

З метою підвищення виходу мембранозв'язаного ферменту DLDH із уламків клітин було використано додаткову обробку уламків клітин детергентом Тритон Х100, дитіотреїтолом і нонілфеноксиполіетоксилетанолом (NP40). Проте ефективність руйнування клітин не підвищилась, а стабільність DLDH помітно знизилась. Тому для подальших досліджень було вибрано варіант отримання БЕ лише за допомогою фізичного руйнування кульками Балотіні.

Після отримання БЕ їх фракціонували охолодженням 50% ацетоном і осаджували центрифугуванням (30 хв; 2 000 об·хв⁻¹; -5 °С). Отриманий осад ресуспендували в 5 мл 50 мМ ФБ, pH 7,5 і наносили на колонку, заповнену сорбентом DEAE-Toyopearl 650M (TSK-GEL, Японія).

“Проскок” і промиви розчини відбирали та визначали в них концентрацію білка й активність DLDH. У разі елюції ферменту спостерігали його вимивання із верхнього шару сорбенту у вигляді більш забарвленої зони. Збирали фракції об'ємом 3 мл. Ступінь очищення цільового ферменту від баластних білків характеризували, визначаючи його активність і концентрацію білка в кожній фракції елюату (табл. 2) та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов і наявності SDS (рис. 5).

Таблиця 2. Концентрація білка й активність DLDH *O. polymorpha* “tr6” різних фракцій під час іонообмінної хроматографії

Table 2. Concentration of the protein and DLDH activity of *O. polymorpha* “tr6” cells in the different fractions during ion exchange chromatography

	V, мл	C _б , мг·мл ⁻¹	Σ _б , мг	VA, Од·мл ⁻¹	ПА, Од·мг ⁻¹	ΣVA, Од.	Вихід, %	Очищення, раз
Розчин осаду після фракціонування ацетоном	1,3	17,5	23,0	2,6	0,15	3,4	100	-
Промиви	3,0	6,1	18,3	1,1	0,18	3,3	97	1,2
Е1 (15% (NH ₄) ₂ SO ₄ в 0,2 М ФБ pH 7,8)	2,0	1,1	2,2	0,58	0,8	1,2	35	5,3
Е2 (70% (NH ₄) ₂ SO ₄ в 0,2 М ФБ pH 7,8 + 0,75 NaCl + 1% Тритон ×100)	6,0	0,97	5,82	0,6	1,1	3,6	19	7,0

Позначення: V – об'єм; C_б – концентрація білка; Σ_б – сумарна кількість білка; VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність; ΣVA – сумарна кількість одиниць ферменту

Abbreviations: V – volume; C_б – protein concentration; Σ_б – total quantity of protein; VA – volumetric activity; ПА – specific activity; ΣVA – total amount of activity units of the enzyme

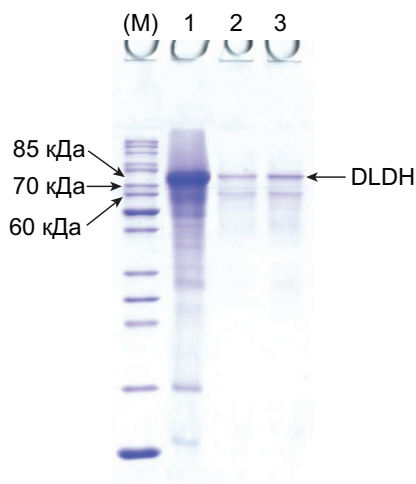


Рис. 5. Електрофоретична характеристика сконцентрованого безклітинного екстракту до нанесення на колонку (1) та очищеного препарату DLDH *O. polymorpha* "tr6" (2, 3). SDS-електрофорез за денатуючих умов (12 % SDS-ПААГ), білки забарвлені Кумасі R-250. (М) – маркери молекулярної маси

Fig. 5. The electrophoretic characteristics of the concentrated cell-free extract before applying to the column (1) and the purified DLDH preparation of *O. polymorpha* "tr6" (2, 3) after 12 % SDS-PAGE-electrophoresis. Proteins are colored by Coomassie R-250). (M) – molecular weight markers

Вихід ферменту після стадії хроматографічного очищення становив приблизно 50 %. Найвища питома активність в окремих фракціях зі ступенем очищення 7 разів досягала 1,1 Од·мг⁻¹. Для стабілізації ферменту до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий сульфат амонію до 70 % (насичення) за 0 °С, підтримуючи рН близько 7,5.

Досліджено рН оптимум очищеного препарату DLDH *O. polymorpha* "tr6" (рис. 6).

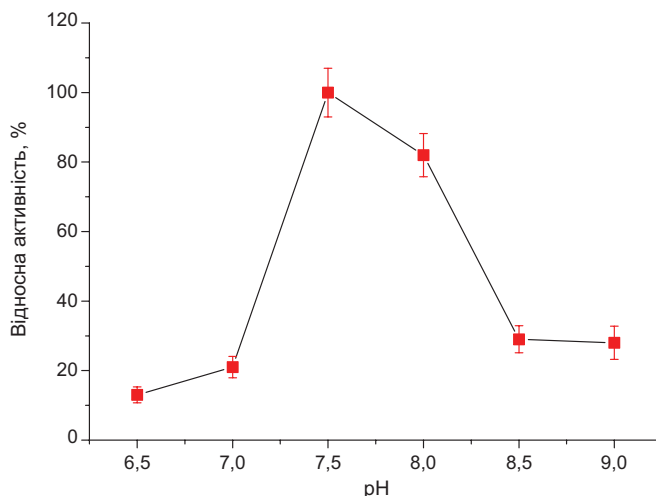


Рис. 6. Відносна активність очищеного препарату DLDH за різних значень рН (30 мМ ФБ і Тріс-ФБ)

Fig. 6. Relative activity of purified DLDH preparation at different pH values (30 mM PB and Tris-PB).

З'ясовано, що рН-оптимум ферменту коливається у межах від 7,5 до 8,0 (рис. 6), що узгоджується з літературними даними [11].

ВИСНОВКИ

1. Проведено оптимізацію складу культурального середовища й умов культивування рекомбінантних дріжджів для отримання найбільшої біомаси

клітин із найвищою питомою активністю D-лактат : цитохром с оксидоредуктази (DLDH).

2. Досліджено вплив деяких іонів двовалентних металів на активність DLDH у пермеабілізованих клітинах *O. polymorpha* "tr6" (*gcr1 catX Δcyb2/DLD1*). З'ясовано, що додаткове внесення у поживне середовище Zn^{2+} помітно підвищує рівень активності DLDH у клітинах.
3. Оптимізовано умови виділення D-лактат : цитохром с оксидоредуктази та розроблено схему очищення ферменту.
4. Досліджено деякі фізико-хімічні властивості очищених препаратів DLDH рекомбінантного штаму дріжджів *O. polymorpha* "tr6".

ПОДЯКИ

Робота виконана за підтримки Міністерства освіти і науки України, тема: "Оптимізація умов іммобілізації ферментів на наночастинках у полімерних матрицях для покращення операційних параметрів лактат-селективних біосенсорів" і проект #0116U004737.

Конфлікт інтересів. Автори статті підтверджують, що конфлікту інтересів немає.

1. Appleby C.A., Morton R.K. Lactic dehydrogenase and cytochrome b2 from yeast. Purification and crystallization. **Biochem. J.**, 1959; 71: 492–499 [PMCID: PMC1196822].
2. Babaei-Jadidi R., Karachalias N., Ahmed N., Battah S., Thornalley P.J. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. **Diabetes**, 2003; 52(8): 2110–2120 [PMID: 12882930].
3. Christopher M.M., Broussard J.D., Fallin C.W., Drost N.J., Peterson M.E. Increased serum D-lactate associated with diabetic ketoacidosis. **Metabolism, Clinical and Experimental**, 1995; 44 (3): 287–290 [PMID: 7885271].
4. Gonchar M., Maidan M., Korpan Y., Sibirny V., Kotylak Z., Sibirny A. Metabolically engineered methylotrophic yeast cells and enzymes as sensor biorecognition elements. **FEMS Yeast Res**, 2002; 2: 307–314 [PMID: 12702280].
5. Hasegawa H., Fukushima T., Lee J. A., Tsukamoto K., Moriya K., Ono Y., Imai K. Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. **Anal Bioanal Chem**, 2003; 377(5): 886–891 [DOI: 10.1007/s00216-003-2108-6].
6. Karkovska M., Smutok O., Gonchar M. Laboratory prototype of bioreactor for oxidation of toxic D-lactate using yeast cells overproducing D-lactate cytochrome c oxidoreductase. **BioMed Research International**, 2016; 2016: 5 [DOI:10.1155/2016/4652876].
7. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 1951; 193: 265–275 [PMID: 14907713].
8. Phillips S.A., Miralles D., Thornalley P.J. Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats. Effect of the aldose reductase inhibitor Statil. **Biochem Pharmacol**, 1993; 46(5): 805–811 [PMID: 8373434].
9. Pohanka M., Zbooil P. Amperometric Biosensor for D-Lactate Assay. **Food Technol. Biotechnol**, 2008; 46(1): 107–110 [DOI: 10.1021/ac1004426].
10. Ratliff D.M., Vander Jagt D.J., Eaton R.P., Vander Jagt D.L. Increased levels of methylglyoxal-metabolizing enzymes in mononuclear and polymorphonuclear cells from insulin-dependent diabetic patients with diabetic complications: aldose reductase, glyoxalase I, and glyoxalase II- a clinical research center study. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, 1996; 81(2): 488–492 [DOI:10.1210/jcem.81.2.8636255].
11. Reed D.W., Hartzell P.L. The *Archaeoglobus fulgidus* D-lactate dehydrogenase is a Zn(2+) flavoprotein. **J. Bacteriol**, 1999; 181(24): 7580–7587 [PMCID: PMC94217].

12. Shavlovskiy G.M., Zharova V.P., Shchelokova I.F., Trach V.M., Sibirnyi A.A., Kshemin-skaia G.P. Flavinogenic activity of natural strains of the yeast. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol.** 1978; 14(2): 184–189. (In Russian). [ISSN: 0555-1099].
13. Smutok O., Dmytruk K., Karkovska M., Schuhmann W., Gonchar M., Sibirny A. D-lactate-selective amperometric biosensor based on the cell debris of the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*. **Talanta**, 2014; 125: 227–232 [DOI: 10.1016/j.talanta.2014.02.041].
14. Thornalley P.J., Hooper N.I., Jennings P.E., Florkowski C.M., Jones A.F., Lunec J., Barnett A.H. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 1989; 7(2): 115–120 [PMID: 2776650].
15. Thornalley P.J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. **Int. Rev. Neurobiol.** 2002; 50: 37–57 [PMID: 12198817].

OPTIMIZATION OF SYNTHESIS AND DEVELOPMENT OF PURIFICATION SCHEME FOR D-LACTATE : CYTOCHROM C OXIDOREDUCTASE FROM RECOMBINANT YEAST *OGATAEA (HANSENULA) POLYMORPHA* “tr6”

O. V. Smutok, M. I. Karkovska, T. M. Prokopiv, M. V. Gonchar

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: smutok.oleg.2015@gmail.com

The optimization of conditions for synthesis of D-lactate : cytochrome c oxidoreductase (EC 1.1.2.4; DLDH) by recombinant yeast strain *Ogataea (Hansenula) polymorpha* “tr6” (*gcr1 catX Δcyb2/DLD1*) was performed. The strain is characterized by impairment of glucose catabolic repression, deletion of the *CYB2* gene, responsible for the synthesis of L-lactate: cytochrome c oxidoreductase, and six-fold overproduction of DLDH. Moreover, an isolation and purification of the target enzyme using ion exchange chromatography was proposed. The optimization of the cultural medium composition and conditions for the yeast cells' cultivation to obtain the biomass with the highest specific activity of DLDH have been performed. Biomass of the cells *O. polymorpha* “tr6” is the highest in a medium with 1 % glycerol and 0.5 % racemic lactate, while the best specific activity of DLDH and the lowest non-specific ferricyanide reductase activity are observed in a medium with 1 % ethanol and 0.5% racemic lactate. The influence of some ions of divalent metals on the activity of DLDH in permeabilized cells and induction of the enzyme' synthesis in the cells of *O. polymorpha* “tr6” were investigated. It has been shown that the addition of Zn^{2+} ions to the cultural medium significantly increases the activity of DLDH in the cell-free extracts of the yeast cells. The isolation of the membrane-bound DLDH was carried out using methods of physical destruction of the cells. DLDH purification was performed on the DEAE-Toyopearl ion-exchange cellulose 650 M. The yield of the enzyme after chromatographic purification was about 50 %. The highest specific enzyme activity in purified fractions with a 7-fold purification degree was reached up to $1.1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Some of the physicochemical properties of the purified preparation of DLDH of recombinant *O. polymorpha* yeast strain “tr6” have been investigated.

Keywords: D-lactate : cytochrome c oxidoreductase, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*, synthesis, isolation, recombinant cells

Одержано: 19.01.2018