

УДК 577.152.1

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.48369

ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБІНАНТНОЇ ГЛІЦЕРОЛДЕГІДРОГЕНАЗИ ДРІЖДЖІВ

© М. М. Синенька, Г. З. Гайда, Г. М. Клепач, М. Ф. Іваш, М. В. Гончар

Ферменти мікробного походження широко використовуються в складі аналітичних тест-систем для клініки та промисловості. Ключовою складовою тест-систем для моніторингу гліцеролу є гліцерол-дегідрогеназа (ГДГ). Через відсутність вітчизняного препарату, актуальною залишається розробка економічно вигідних технологій його одержання.

В результаті досліджень виділено високоочищений препарат ГДГ з клітин рекомбінантних дріжджів та охарактеризовано властивості фермента

Ключові слова: ферменти мікробного походження, гліцеролдегідрогеназа дріжджів, гліцерол, рекомбінантний штам-продуцент, властивості фермента

Enzymes of microbial origin are widely used as components of the analytical test-kits for clinic and industry. A key component of the test-kits for glycerol monitoring is glycerol dehydrogenase (GDH). Because of the lack of domestic enzyme, the development of cost-effective technologies for its obtaining is actual. As a result of the research a highly purified GDH preparation was isolated from recombinant yeast cells and enzyme's properties were characterized

Keywords: enzymes of microbial origin, yeast glycerol dehydrogenase, glycerol, recombinant strain-producer, properties of enzyme

1. Вступ

Тест-системи, складовими яких є ферменти мікробного походження, характеризуються високою селективністю та чутливістю, тому широко використовуються на Заході як в аналітичних лабораторіях харчової та мікробіологічної промисловості, так і в медичних клініко-діагностичних лабораторіях. Широке застосування комерційних наборів вітчизняним споживачем лімітовано високою ціною діагностикумів, яка в першу чергу зумовлена витратами на отримання високоочищених ферментів. Тому актуальною проблемою вітчизняної біотехнологічної науки є розробка нових аналітичних технологій, придатних для визначення практично важливих аналітів за допомогою ферментативних підходів на основі дешевих ферментів. Ключовою складовою таких тест-систем на гліцерол є гліцерол-селективні ферменти, зокрема, гліцеролдегідрогеназа (ГДГ).

2. Постановка проблеми

Через високу вартість комерційної ГДГ та відсутність вітчизняного препарату, актуальною залишається проблема пошуку альтернативних джерел виділення цього ензиму та ефективних технологій його очищення. Мета дослідження – одержати високоочищений препарат NAD^+ -залежної ГДГ з клітин

рекомбінантного дріжджового штаму-продуценту та дослідити властивості цього ферменту.

3. Літературний огляд

ГДГ (КФ 1.1.1.6) синтезується тканинами ссавців [1] та мікроорганізмами, зокрема, бактеріями [2, 3] і дріжджами [4, 5].

У літературі описано три типи ГДГ, а саме: NAD^+ -залежна ГДГ, що перетворює гліцерол на дегідроксиацетон (ДГА) і навпаки (ЕС 1.1.1.6), NADP^+ -залежна ГДГ, що каталізує перетворення між гліцеролом та ДГА (Гліцерол 2-дегідрогеназа, ЕС 1.1.1.156), а також NADP^+ -залежна ГДГ, що каталізує перетворення гліцеролу на гліцеральдегід (ЕС 1.1.1.72). Комерційні препарати ГДГ є достатньо дорогими: 1000 одиниць (Од) ГДГ, виділеної із *Cellulomonas speciaes*, коштують 277,4 €, 100 Од із *Enterobacter aerogenes* – 154,7 € та 25 Од із *Bacillus megaterium* – 54,7 € [6].

Виділення ГДГ перспективне для розробки ензиматичних систем по визначенню вмісту гліцеролу для оцінки рівня тригліцеридів при ожирінні та метаболічних порушеннях, зокрема, ліпідного обміну, що викликають розвиток цукрового діабету II типу та серцево-судинні захворювання (у медицині). Аналіз гліцеролу є важливим для процесу виробництва вин та контролю їх якості (у виноробстві). В останні роки

з'явився ще один напрямок досліджень, який стрімко набуває практичного значення і дуже потребує надійних і зручних методів моніторингу гліцеролу як супутнього продукту при виробництві біодизельного палива [7] та в нових технологіях його утилізації, а також для одержання коштовного продукту хімічної промисловості – ДГА [8].

4. Мета дослідження

Метою даної роботи було одержати препарат ГДГ *H. polymorpha* – перспективний біоаналітичний інструмент для визначення гліцеролу – з дріжджового штаму-продуценту та дослідити властивості фермента.

5. Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували рекомбінантний трансформант W303 (*HpGDH*) дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* – продуцент ГДГ [9].

Клітини культивували у колбах об'ємом 500 мл. при 30 °С на шейкері при постійній аерації (200 об./хв) у синтетичному середовищі з рН 6,0 наступного складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5, KH_2PO_4 – 3, MgSO_4 – 0,2, по 40 мг/л гістидину, лейцину, урацилу та аденіну. Мікроелементи додавали у вигляді сполук: H_3BO_3 (1 мг/л), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,3 мг/л), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – (4 мг/мл), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,3 мг/л), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 мг/л), біотин (0,05 мг/л); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,5 мг/л), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,5 мг/л), ЕДТА (15 мг/л), КJ (0,1 мг/л). Середовище також містило (мг/л) : інозитол – 25, пара-амінобензойну кислоту – 0,2, по 1 мг/л Сапантотеанату, ніотинової кислоти та вітамінів В₁ і В₆. Як джерела вуглецю використовували глюкозу (0,1 %) та гліцерол (1 %).

Клітини штаму-продуценту культивували у 2 стадії: інокулянт вносили у маточну колбу із синтетичним середовищем та інкубували до середини логарифмічної фази росту при постійній аерації. За добу аліквоту суспензії клітин переносили у колбу із свіжим середовищем аналогічного складу та культивували протягом 15 год.

Біомасу клітин дріжджів *S. cerevisiae* (в мг абсолютної маси на 1 мл суспензії) визначали за мутністю розведених суспензій шляхом їх фотометрування на приладі ФЕК КФК-3 при 540 нм в кюветі 3 мм із коефіцієнтом перерахунку (1,33), визначеним при калібруванні гравіметричним методом.

Для приготування суспензії клітин дріжджів, біомасу промивали двічі водою та один раз 10 мМ К₂Na-фосфатним буфером, рН 8,0 (ФБ), до осаду клітин додавали ФБ з 2 мМ ЕДТА до кінцевої концентрації клітин 90 – 100 мг/мл та інгібітор протеїназ – фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) до 0,4 мМ.

Для отримання безклітинних екстрактів (БЕ) суспензію клітин розливали у стаканчики для гомогенізації, вносили скляні кульки (діаметр 0,45 – 0,5 мм) в кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі 6 разів по 1 хв з інтервалом 1 хв на льоді, при 8000 об./хв. БЕ відокремлювали від уламків клітин центрифугуванням (15 000 об./хв, $r_{\text{сеп}}=8$ см., 30 хв., 4 °С). В БЕ визначали активність ферменту та концентрацію білка за Лоурі.

Виділення та характеристика фермента. ГДГ виділяли із БЕ клітин продуценту шляхом двохетапної іонообмінної хроматографії (ІОХ) на сорбенті ДЕАЕ-Тоуорpearl 650-М за схемою, розробленою нами для очистки дріжджової формальдегіддегідрогенази [10].

Електрофоретичний аналіз білкових препаратів, отриманих на різних стадіях очистки ферментів, проводили на приладі Helicon на пластинах для вертикального електрофорезу. Електрофорез проводили за денатуруючих умов в 12 % SDS-ПААГ.

Активність (А, в мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹) ГДГ визначали в реакції з 0,1 М гліцеролом та 1 мМ NAD, реєструючи швидкість утворення NADH(H)⁺ за приростом оптичної густини при 340 нм.

6. Результати та їх обговорення

Штам *S. cerevisiae* W-303 (*HpGDH*), створений для біотрансформації гліцеролу до ДГА [9], містить мультікопійну плазмиду p424GDH з інтегрованим геном ГДГ *H. polymorpha* під контролем сильного конститутивного промотора GAP (гліцеральдегід 3-фосфат дегідрогеназного) *S. cerevisiae*. Вихідний мультікопійний човниковий вектор експресії p424GPD (6527 п.н.) має конститутивний промотор GAP, термінатор CYC1 і селективний маркер TRP. Під час культивування клітин у глюкозному середовищі конститутивно синтезується ГДГ *H. polymorpha*, яка ефективно окислює гліцерол з утворенням значних кількостей ДГА, що секретується клітинами. Результати по виділенню та хроматографічному очищенню ГДГ методом ІОХ представлено в табл. 1: отримували 5–6 -кратно очищені препарати ГДГ з активністю 34–37,5 Од/мг. білка з максимальним виходом в кращих фракціях до 20 %.

За результатами електрофоретичного аналізу (рис. 1), отриманий препарат фермента характеризувався достатньо високою чистотою, а молекулярна маса субодиниць ГДГ є близькою 40 кДа, що характерно для дріжджових ГДГ [4, 5].

Препарат ГДГ із активністю 34 Од/мг білка було використано для досліджень по стабільності за різних умов зберігання та для вивчення властивостей фермента.

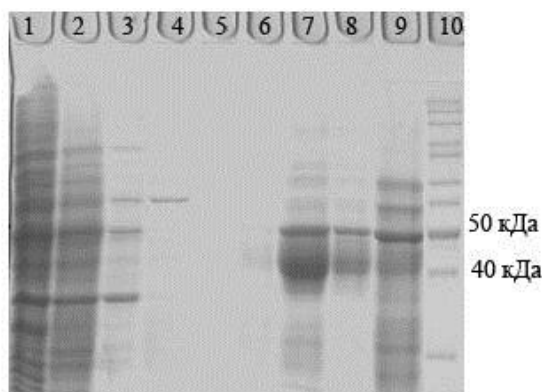


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз препаратів ГДГ у 15% ДСН-ПААГ в ході очистки: 1 – вихідний БЕ; 2 – просок з колонки 1; 3 – 9 – фракції 1–7, відповідно, з колонки 2, 10 – маркери молекулярної маси

Таблиця 1

Характеристика препарату ГДГ, одержаного за допомогою ІОХ

Фракція	V, мл	C _{білка} , мг/мл	Σ _{білок} , мг	A, Од/мл	A, Од/мг	ΣA, Од	Вихід (%)	Очистка (разів)
Вихідний препарат БЕ	20	5,35	107	34,6	6,5	692	=100	1
Проскок з 1-ї колонки	60	3,95	0,65	0,68	1,1	40,8	5,9	
Проскок з 2-ї колонки	270	0,12	32,4	0	0	0	0	
Промивні води 50 мМ ФБ								
Фракції:	6	0,15	0,9	0,13	0,87	0,78	0,1	0,13
1	3,2	0,21	0,67	0,93	4,4	3	0,4	0,7
2	5,5	0,23	1,27	5,8	24	32	4,6	3,7
3	4,5	0,14	0,63	5,25	37,5	23,6	3,4	5,8
Елюати 0.5 М NaCl/ ФБ:								
5	1,5	2,2	3,3	76	34	114	16,5	5,2
6	1	1,55	1,55	28	18	28	4	2,8
7	1,7	0,14	0,24	0,16	1,14	0,27	0,04	0,18

Основними критеріями ефективності технології виділення будь-якого фермента є вихід високоочищеного препарату (табл. 1) та стабільність його під час зберігання (табл. 2). Як бачимо із результатів

досліджень, наведених у табл. 2, найкраще зберігаються препарати ГДГ за присутності 0,5 М NaCl і 1 мМ ЕДТА при +5 °С та при - 20 °С. Сульфат амонію інгібує активність ГДГ.

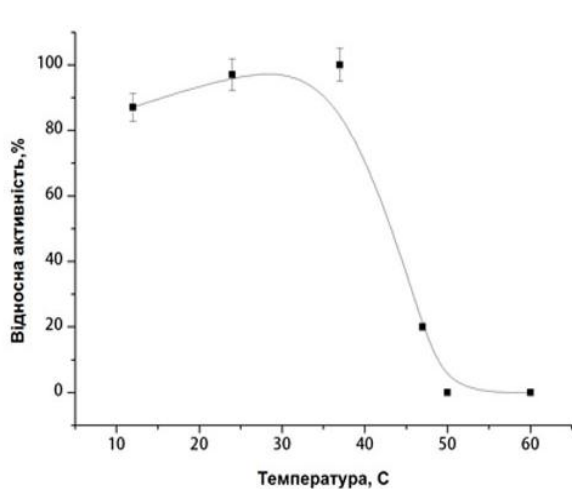
Таблиця 2

Аналіз активності ГДГ у препаратах за різних умов зберігання упродовж місяця

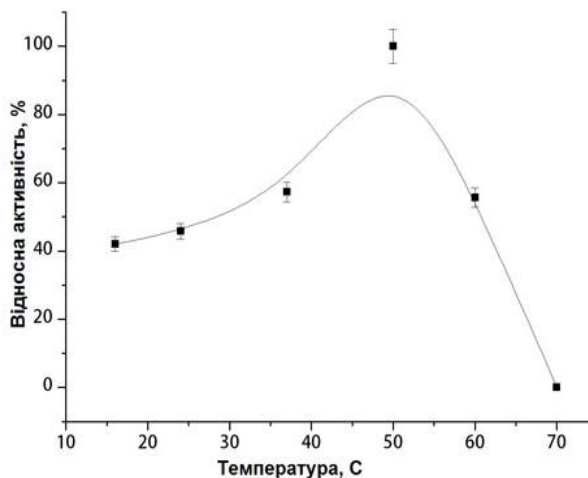
№ п/п	Умови зберігання препарату	Вихідна активність, Од/мг	Залишкова активність, Од/мг	Залишкова активність, %
1	-10 °С; у 70 % сульфаті амонію	8,5±1,5	0,44±0,15	5,2 %
2	+5 °С; у 0,5 М NaCl, 1 мМ ЕДТА, ФБ	8,5±1,5	7,20±0,8	84,5 %
3	-20 °С; у 0,5 М NaCl, 1 мМ ЕДТА, ФБ	8,5±1,5	7,75±0,5	91,2 %

Термостабільність препарату ГДГ аналізували за її термоінактивацією за підвищених температур (рис. 2). Для визначення температурної стабільності фермент інкубували 5 хв. при фіксованих температурах від +12 °С до +60 °С та визначали активність за стандартних умов. Температурний оптимум активності ГДГ (температура субстрату при визначенні активності), є високим - +50 °С.

Важливими ензимологічними характеристиками ферменту є кінетичні параметри (рис. 3), зокрема константа Міхаеліса-Ментен (K_M) і максимальна швидкість реакції (V_{max}). Їх визначали експериментально за залежністю початкової швидкості реакції (v) від концентрації субстрату (S).



а



б

Рис. 2. Властивості фермента: а – температурна стабільність; б – температурний оптимум

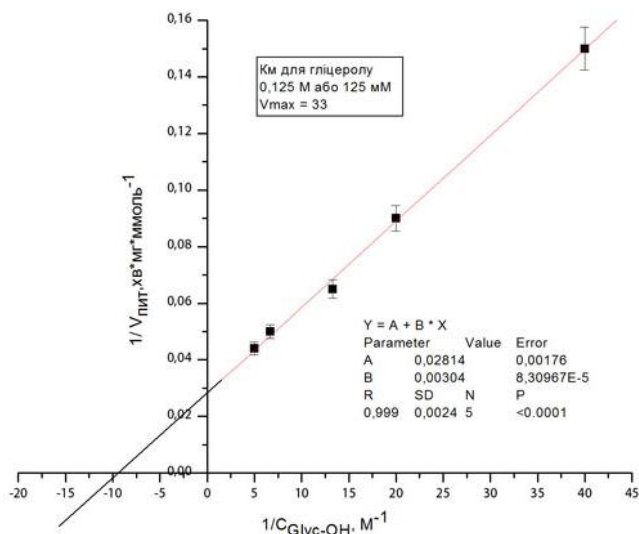


Рис. 3. Залежність швидкості ферментативної реакції, каталізованої гліцеролдегідрогеназою, від концентрації гліцеролу у формі подвійних обернених величин

Як видно з рис. 3, K_M ГДГ для гліцеролу складає 125 мМ та $V_{\text{пит. (макс.)}} = 33$ кмоль·хв⁻¹·мг⁻¹. Отримані експериментальні дані близькі до літературних значень: K_M ГДГ із дріжджів рекомбінантного штаму *Hansenula polymorpha* D1-1 складає 118 мМ [5].

7. Висновки

Таким чином, в результаті проведених досліджень:

1. Розроблено схему виділення і очистки препарату ГДГ *H. polymorpha* з біомаси рекомбінантних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* W303 (*HpGDH*) – над-продуцента ГДГ.
2. Одержано аналітичні кількості високоочищеного препарату фермента.
3. Досліджено деякі фізико-хімічні (молекулярна маса субодиниць, стабільність при зберіганні, температурна стабільність та температурний оптимум) та кінетичні характеристики (константа Міхаєліса-Ментен і максимальна швидкість реакції) фермента.

Література

1. Kormann, A. Purification and properties of an NADP⁺-dependent glycerol dehydrogenase from rabbit skeletal muscle [Text] / A. Kormann, R. Hurst, T. Flynn // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*. – 1972. – Vol. 258, Issue 1. – P. 40–55. doi: 10.1016/0005-2744(72)90965-5

2. Li, M. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans* [Text] / M. Li, J. Wu, X. Liu, J. Lin, D. Wei, H. Chen // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101, Issue 21. – P. 8294–8299. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.065

3. Ruzheinikov, S. Glycerol dehydrogenase [Text] / S. Ruzheinikov, J. Burke, S. Sedelnikova, P. Baker, R. Taylor, P. Bullough et al. // *Structure*. – 2001. – Vol. 9, Issue 9. – P. 789–802. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00645-1

4. Gartner, G. Purification and properties of glycerol dehydrogenase from *Candida valida* [Text] / G. Gartner, G. Kopperschlager // *Journal of General Microbiology*. – 1984. – Vol. 130, Issue 12. – P. 3225–3233. doi: 10.1099/00221287-130-12-3225

5. Yamada-Onodera, K. Characterisation of glycerol dehydrogenase from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha* D1-1, and its gene cloning [Text] / K. Yamada-Onodera, H. Yamamoto, E. Emoto, N. Kawahara, Y. Tani // *Acta Biotechnologica*. – 2002. – Vol. 22, Issue 3-4. – P. 337–353. doi: 10.1002/1521-3846(200207)22:3/4<337::aid-abio337>3.0.co;2-6

6. Catalog : Biochemicals and Reagents [Text]. – «Sigma», 2009–2010. – 928 p.

7. Gerpen, J. Biodiesel processing and production [Text] / J. V. Gerpen // *Fuel Processing Technology*. – 2005. – Vol. 86, Issue 10. – P. 1097–1107. doi: 10.1016/j.fuproc.2004.11.005

8. Kumar, G. Stabilized glycerol dehydrogenase for the conversion of glycerol to dihydroxyacetone [Text] / G. Kumar, Y. Wee, I. Lee, H. Sun, X. Zhao, S. Xia et al. // *Chemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 276. – P. 283–288. doi: 10.1016/j.cej.2015.04.039

9. Nguyen, H. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of dihydroxyacetone (DHA) from sugars: a proof of concept [Text] / H. Nguyen, E. Nevoigt // *Metabolic Engineering*. – 2009. – Vol. 11, Issue 6. – P. 335–346. doi: 10.1016/j.ymben.2009.07.005

10. Demkiv, O. Formaldehyde dehydrogenase from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and bioanalytic application [Text] / O. Demkiv, S. Paryzhak, G. Gayda, V. Sibirny, M. Gonchar // *FEMS Yeast Research*. – 2007. – Vol. 7, Issue 7. – P. 1153–1159. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00255.x

References

1. Kormann, A. W., Hurst, R. O., Flynn, T. G. (1972). Purification and properties of an NADP⁺-dependent glycerol dehydrogenase from rabbit skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 258 (1), 40–55. doi: 10.1016/0005-2744(72)90965-5

2. Li, M., Wu, J., Liu, X., Lin, J., Wei, D., Chen, H. (2010). Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, 101 (21), 8294–8299. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.065

3. Ruzheinikov, S. N., Burke, J., Sedelnikova, S., Baker, P. J., Taylor, R., Bullough, P. A. et al. (2001). Glycerol Dehydrogenase. *Structure*, 9 (9), 789–802. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00645-1

4. Gartner, G., Kopperschlager, G. (1984). Purification and Properties of Glycerol Dehydrogenase from *Candida valida*. *Journal of General Microbiology*, 130 (12), 3225–3233. doi: 10.1099/00221287-130-12-3225

5. Yamada-Onodera, K., Yamamoto, H., Emoto, E., Kawahara, N., Tani, Y. (2002). Characterisation of glycerol dehydrogenase from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha* D1-1, and its gene cloning. *Acta Biotechnologica*, 22 (3-4), 337–353. doi: 10.1002/1521-3846(200207)22:3/4<337::aid-abio337>3.0.co;2-6

6. Catalog: Biochemicals and Reagents (2009–2010). Sigma, 928.

7. Gerpen, J. V. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, 86 (10), 1097–1107. doi: 10.1016/j.fuproc.2004.11.005

8. Kumar, G. S., Wee, Y., Lee, I., Sun, H. J., Zhao, X., Xia, S. et al. (2015). Stabilized glycerol dehydrogenase for the conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Chemical Engi-*

neering Journal, 276, 283–288. doi: 10.1016/j.cej.2015.04.039

9. Nguyen, H. T. T., Nevoigt, E. (2009). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of dihydroxyacetone (DHA) from sugars: A proof of concept. *Metabolic Engineering*, 11 (6), 335–346. doi: 10.1016/j.ymben.2009.07.005

10. Demkiv, O. M., Paryzhak, S. Y., Gayda, G. Z., Sibirny, V. A., Gonchar, M. V. (2007). Formaldehyde dehydrogenase from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and bioanalytic application. *FEMS Yeast Research*, 7 (7), 1153–1159. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00255.x

Дата надходження рукопису 22.07.2015

Синенька Марія Миколаївна, інженер, Відділ аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, Україна, 79005
E-mail: maria-swntozelska@ukr.net

Гайда Галина Зуфарівна, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник, Відділ аналітичної біотехнології, старший науковий співробітник, Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, Україна, 79005
E-mail: galina.gayda@gmail.com

Клепач Галина Миколаївна, кандидат біологічних наук, доцент, Дрогобицький державний педагогічний університет, вул. Т. Шевченка, 23, м. Дрогобич, Львівська обл., Україна, 82100
E-mail: pavlishko@yahoo.com

Іваш Марія Федорівна, Відділ Аналітичної біотехнології, інженер, Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова 14/16, м. Львів, Україна, 79005

Гончар Михайло Васильович, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу Аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, Україна, 79005
E-mail: mykhailo1952@gmail.com

УДК 631.5: 581.4: 58.08

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.47982

ANALYSIS OF THE LIVING STATE OF CENOPOPULATION OF POLYCENTRIC BIOMORPH *POA ANGUSTIFOLIA* L.

© O. Kuznetsova

*For studying the living state of cenopopulation of polycentric biomorph it was offered to use the method of correlative analysis and asymmetry of vegetative signs of *Poa angustifolia* L. The received data demonstrated that the most informative indicators are the generalized correlation coefficient and unsymmetrical factor. The use of received criteria allows define the living state of vegetatively movable specie at only the single research*
Keywords: living state, cenopopulations of polycentric biomorphs, vegetative signs of *Poa angustifolia* L.

*Для вивчення життєвого стану ценопопуляції поліцентричної біоморфи було запропоновано використання методу кореляційного аналізу і асиметрії вегетативних ознак *Poa angustifolia* L. Отримані дані показали, що найбільш інформативними показниками є узагальнений коефіцієнт кореляції і коефіцієнт асиметрії. Використання отриманих критеріїв дозволить визначити життєвий стан вегетативно рухомого виду вже при одноразовому дослідженні*

Ключевые слова: життєвий стан, ценопопуляції поліцентричності біоморф, вегетативні ознаки *Poa angustifolia* L.

1. Introduction

The revelation of indicative signs and methods that allow define the vitality of vegetable population and make the prognosis of its development and so of the whole phytocenosis was always an important task of ecology.

Morphologic structure of the plant is a united system of interconnected organs and its elements. The study of internal connections between the separate organs is important for solving many theoretical and practical problems of ecology and phytocenology [1]. Internal connections in biological objects can define the degree of its correspondence to the concrete ecotope and the living state of organisms [2]. The prevalence of the high posi-

tive connections among the functionally important signs demonstrates the certain coordination in morphogenesis, in functioning and development of individuals, the fitness to ecotope conditions; its lack can indicate the disintegrative processes and be an early diagnostic signal of destructive phenomena [3].

2. Analysis of literature data and the statement of the problem

Among the methods of definition of the living state of cenopopulations the scientists of the previous century often used an analysis of aged groups [4–7]. The modern scientists pay attention to the same method [8–