

УДК 57.088.3+577.152.1

**ВИДІЛЕННЯ, ОЧИЩЕННЯ, СТАБІЛІЗАЦІЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА  
ФЛАВОЦИТОХРОМУ  $b_2$  ІЗ КЛІТИН НАДПРОДУЦЕНТА  
*OGATAEA POLYMORPHA* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*)**

**О. Смуток\*, М. Карковська, Н. Стасюк, М. Гончар**

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

Опрацьовано новий метод виділення, очищення та стабілізації L-лактат: цитохром с оксидоредуктази (КФ 1.1.2.3; флавоцитохром  $b_2$ , ФЦ  $b_2$ ) із клітин рекомбінантного штаму дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) та досліджено фізико-хімічні властивості очищених препаратів ферменту. Штам характеризується порушенням глюкозної катаболітної репресії та п'ятикратним надсинтезом ФЦ  $b_2$ , порівняно із батьківським штамом дикого типу. Для забезпечення максимального виходу мембранозв'язаного ФЦ  $b_2$  досліджено вплив низки детергентів і оптимізовано умови виділення ферменту. Для очищення ФЦ  $b_2$  розроблено новий метод афінної хроматографії, який ґрунтується на використанні цитохрому с як природного ліганда, іммобілізованого на амінопропілсилохромі. Ефективність розробленого методу афінної хроматографії було порівняно з іонообмінною хроматографією на DEAE-Toyorearl 650M целюлозі. За використання обох типів хроматографії питома активність ФЦ  $b_2$  у ферментних препаратах становила 10 Од·мг<sup>-1</sup>, а вихід очищеного ферменту коливався в межах 75–95 %. Ступінь очищення цільового ферменту від баластних білків оцінено за допомогою електрофорезу в ПААГ у денатуруючих умовах за наявності SDS. Досліджено дію низки стабілізуючих агентів і умов зберігання, щоби забезпечити підтримання максимальної активності ФЦ  $b_2$ . Найкращий стабілізуючий ефект спостерігали за використання 70 % амонію сульфату і зберігання препарату за температури –20 °С. Визначено деякі фізико-хімічні параметри очищеного ферменту з клітин *O. polymorpha* «tr1», зокрема: молекулярну масу і спектральні характеристики окисленої та відновленої форм ферменту.

*Ключові слова:* L-лактат: цитохром с оксидоредуктаза; *Ogataea polymorpha*; клітини надпродуцента; виділення, очищення, стабілізація ферменту

L-молочна кислота (L-лактат) як аналіт відіграє важливу роль у різних сферах діяльності людини. В інтенсивній терапії та хірургії визначення вмісту лактату в біологічних рідинах є важливим для оцінки стану пацієнта. Підвищення рівня L-лактату у крові є основним індикатором ішемічного стану, причинами якого можуть бути різні типи шоку, гіпоксія, карбон монооксид- або ціанідна інтоксикації, серцева недостатність і т.п. [10]. Зміни вмісту L-лактату також можуть бути наслідком діабету або патологічного всмоктування жирних кислот у товстому кишківнику [5, 7]. У спортивній медицині визначення вмісту L-лактату дає змогу оцінити пороговий анаеробний рівень витривалості спортсмена і підібрати оптимальні режими навантаження. Однак важливість аналізу L-лактату не лімітується лише медичним сектором. Лактат є компонентом багатьох харчових продуктів і напоїв. Молочнокислі бактерії природно продукують L- і D-лактат, тому вони наявні в багатьох молочних продуктах, отриманих у процесі молочнокислого бродіння, таких як

йогурт, сири, а також у ферментованих овочах. L-лактат часто додають до харчових продуктів для підкреслення смаку та як природний консервант. Підвищення вмісту лактату у м'ясо-молочних продуктах є ознакою їхнього псування [3]. Якість молока, пива, вина, фруктових і овочевих соків можна оцінити, визначаючи вміст L- і D-молочної кислоти.

На сьогодні розроблено низку ензиматичних підходів для аналізу L-лактату на основі NAD<sup>+</sup>-залежної лактатдегідрогенази із м'язів ссавців (ЛДГ) та бактерійної лактатоксидази (ЛО). Проте більшість із описаних методів мають низку недоліків: неабсолютна селективність, необхідність використання екзогенного кофактора, що додатково підвищує вартість методів і ускладнює процедуру аналізу. Це потребує подальшого пошуку нових ферментів і технологій на їхній основі, які можуть суттєво покращити експлуатаційні характеристики біоаналітичних наборів, забезпечити високу технологічність їхнього виготовлення та можливість широкого використання.

Засвоєння L-молочної кислоти дріжджами здійснюється через селективне окислення L-лактату, яке каталізується мітохондріальною L-лактат: ферицитохром *c* оксидоредуктазою (КФ 1.1.2.3; флавоцитохром *b*<sub>2</sub>, ФЦ *b*<sub>2</sub>). Цей білок кодується у дріжджів геном *CYB2*. ФЦ *b*<sub>2</sub>, отриманий із *Saccharomyces cerevisiae* та *Hansenula anomala*, – гомотетрамер, кожна субодиниця якого містить по одній молекулі флавінмононуклеотиду і протопегму IX. Флавоцитохром *b*<sub>2</sub> завдяки своїм унікальним каталітичним властивостям (абсолютна специфічність до L-енантіомера лактату, відсутність у потребі екзогенного кофактора) має важливе біоаналітичне значення, оскільки здатний замінити NAD<sup>+</sup>-залежну ЛДГ м'язів ссавців або ЛО під час визначення вмісту L-лактату в біологічних рідинах і харчових продуктах за допомогою ензиматичних і біосенсорних підходів.

Мета роботи – розробити схему виділення, очищення та стабілізації L-лактат: цитохром *c* оксидоредуктази (ФЦ *b*<sub>2</sub>) із клітин рекомбінантного штаму дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*), отримати і дати фізико-хімічну характеристику очищеного ферменту.

#### Матеріали та методи

У роботі використовували рекомбінантний штам *Ogataea polymorpha* «tr1» (*gcr1 catX CYB2*) – надпродуцент флавоцитохрому *b*<sub>2</sub> із колекції Інституту біології клітини НАН України [8, 13]. Штам характеризується порушенням глюкозної катаболітної репресії, відсутністю каталазної активності та п'ятикратним надсинтезом ФЦ *b*<sub>2</sub>, порівняно із батьківським штамом [8].

Клітини вихідного штаму зберігали на скосах із багатим агаризованим середовищем (YPD) (г·л<sup>-1</sup>): глюкоза – 20, дріжджовий екстракт – 5, пептон – 10, агар – 20. Дріжджі вирощували до середини стаціонарної фази росту в колбах Ерленмейера на круговому шейкері (240 об·хв<sup>-1</sup>) за 30 °С у середовищі Беркгольдера [14] такого складу (г·л<sup>-1</sup>): КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – (0,5 – 1); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – (3 – 3,5); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – (0,2 – 0,5); CaCl<sub>2</sub> – 0,1. До середовища додавали дріжджовий екстракт «Діфко» до 0,5 %. Як джерело карбону та енергії використовували суміш 1 % глюкози та 0,5 % рацемату лактату.

Концентрацію клітин (у мг абсолютної маси на 1 мл суспензії) визначали за мутністю розведених суспензій шляхом їхнього фотометрування на фотоелектроколориметрі ФЕК–56М (за λ=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:

$$C = \frac{E \cdot n}{1,33} \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1},$$

де  $C$  – концентрація клітин;  $E$  – оптична густина за  $\lambda=540$  нм;  $n$  – розведення вихідної суспензії; 1,33 – коефіцієнт перерахунку, визначений за допомогою калібрування гравіметричним методом.

Для приготування суспензії клітин дріжджів біомасу промивали двічі водою і один раз – 50 мМ фосфатним буфером (ФБ), рН 7,8 (до концентрації 90–100 мг·мл<sup>-1</sup>), що містив інгібітори протеаз – 1 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) (інгібітор серинових протеїназ). Суспензію 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 тричі по 2 хв за 1000 об·хв<sup>-1</sup> і 0 °С. Безклітинні екстракти (БЕ) відокремлювали від уламків клітин центрифугуванням (15 000 об·хв<sup>-1</sup>,  $r_{\text{сеп}} = 8$  см, 30 хв, 4 °С). Осади промивали 50 мМ ФБ, рН 7,8 з 1 мМ ФМСФ, повторно руйнували і центрифугували. У БЕ визначали активність ФЦ  $b_2$  та концентрацію білка за Lowry [12].

Активність ФЦ  $b_2$  визначали спектрофотометрично, за рівнем відновлення фериціаніду калію, за  $\lambda=420$  нм [4]. Реакційна суміш містила: 0,03 М фосфатний буфер, рН 7,8; 0,03 М L-лактат; 1 мМ ЕДТА; 0,083 мМ  $K_3Fe(CN)_6$ ; 0,02 мл екстракту. Питому активність ферменту (ПА, мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка) розраховували за формулою (1), а питому об'ємну активність (VA, мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мл<sup>-1</sup> реакційної суміші) – за формулою (2):

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

де  $\Delta E / \text{хв}$  – зміна оптичної густини за  $\lambda=420$  нм за хвилину;  $V_p$  – об'єм реакційної суміші, мл;  $n$  – розведення екстракту;  $\varepsilon_{\text{мм}}$  – мілімолярний коефіцієнт екстинції калію фериціаніду, який дорівнює 1,04 мМ<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>;  $V_e$  – об'єм екстракту, мл;  $C_b$  – концентрація білка в екстракті, мг·мл<sup>-1</sup>.

Питому активність ферменту знаходили за формулою, враховуючи різницю між специфічною активністю (+ субстрат) і неспецифічною активністю (без субстрату):  $\text{ПА} = \text{ПА}_{+\text{Lact}} - \text{ПА}_{-\text{Lact}}$ . За одиницю активності (1 Од.) приймали таку кількість ферменту, яка за стандартних умов визначення зумовлює окислення 1 мкмоль L-лактату за 1 хв.

Нами вдосконалено схему очищення ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha*, основою якого послугував метод, розроблений для дріжджів *H. anomala* [6].

**Стадія 1. Лізис клітин.** Висушені клітини (2 г) лізували за наявності 1,2 мл бутанолу за кімнатної температури з додаванням 100 мл буфера А: 0,1 М лактат натрію у 20 мМ ФБ, рН 7,5; 0,025 мМ ЕДТА; 1 мМ ФМСФ. Суміш витримували 12 год за температури +4 °С.

**Стадія 2. Отримання безклітинних екстрактів.** Відстояну суміш центрифугували 30 хв за 0 °С та 4000 об·хв<sup>-1</sup> на центрифугі К 23, супернатант відбирали, осад повторно екстрагували.

**Стадія 3. Іонообмінна хроматографія на DEAE-целюлозі.** Безклітинні екстракти наносили на колонку (1,0 x 20 см). Як сорбент використовували DEAE-целюлозу Toyopearl 650 М (1-7-7, AKASAKA TOKYO, Японія), зрівноважену буфером А. Колонку промивали буфером А (70 мл), пізніше 50 мл буфером Б, що містив 0,1 М натрій-калій-фосфат, рН 7,6. Елюцію проводили 15 % (від насичення за 0 °С) амоній сульфатом у буфері Б. Ступінь очищення цільового ферменту від баластних білків характеризували, визначаючи його активність у фракціях елюатів і за допомогою електрофорезу в ПААГ у денатуруючих умовах (за наявності SDS).

**Стадія 4. Висолювання ферменту** проводили додаванням до елюату сухого амоній сульфату до 70 % (від насичення за 0 °С і контролю рН близько 7,0–7,5). Стабілізований таким чином фермент зберігав свою активність протягом двох місяців за температури –20 °С.

Електрофоретичний аналіз білкових препаратів, отриманих на різних стадіях очищення ферменту, проводили на приладі Helicon (Естонія) на пластинах для вертикального електрофорезу. Використовували SDS-електрофоретичний буфер, рН 8,3 (за Лемлі). Електрофорез проводили за кімнатної температури 2–3 год у SDS-поліакриламідному гелі, що містив:

А) 5 % концентруючого гелю (4,0 мл): dH<sub>2</sub>O 2,7 мл; 30 % акриламід/метиленбісакриламід (співвідношення 4:1) 0,67 мл; 1,0 М трис-гліциновий буфер (рН 6,8) 0,5 мл; 10 % персульфат калію 0,04 мл; 10 % SDS 0,04 мл; TEMED 0,004 мл.

Б) 12 % розділяючого гелю (10,0 мл): H<sub>2</sub>O 4,0 мл; 30 % суміш акриламід/метиленбісакриламід (30:1) 3,3 мл; 1,0 М трис-гліциновий буфер (рН 6,8) 2,5 мл; 10 % персульфат калію 0,1 мл; 10 % SDS 0,1 мл; TEMED 0,004 мл.

SDS-поліакриламідні гелі фіксували 15 хв 15 % розчином трихлороцтової кислоти й зафарбовували протягом 2–3 год 0,25 % розчином Кумасі яскраво-голубого R 250 у суміші, що містила 10 % оцтову кислоту і 40 % етанол. Гель відмивали 10 % оцтовою кислотою.

Усі досліди проводили у трьох-чотирьох повторях. Для кожної вибірки показників визначали середнє значення (M), стандартну похибку середнього (m) та середнє квадратичне відхилення (σ). Розрахунок статистичних показників і побудову графіків проводили за допомогою програми Origin 7.5.

### Результати і їхнє обговорення

*Оптимізація виділення флавоцитохрому b<sub>2</sub> з клітин O. polymorpha «tr1» із використанням детергентів*

Оскільки природною локалізацією холоферменту ФЦ b<sub>2</sub> є міжмембранний простір мітохондрій, для його ефективної екстракції необхідні детергенти (табл. 1).

Таблиця 1

Властивості окремих детергентів [1]

Показник	Концентрація, ммоль·л <sup>-1</sup>	Молекулярна маса	Розмір міцели, Да	Агрегаційне число	Густина, г·мл <sup>-1</sup>
Тритон X-100*	0,24	628	90000	140	0,908
Твін-20*	0,012	1228	76000	60	0,896
NP-40	0,29	617	90000	149	1,103
1 % N-лауроїлсаркозин	14,57	293,38	–	2	1,033

**Примітка:** \* – ці речовини є полідисперсними сумішами, тут наведено середні значення

Тритон X-100, Твіни-20 та *нонілфеноксиполіетоксилетанол* (NP-40) є неіонними детергентами. Вони мають незаряджені гідрофільні групи в «головці», що містять поліоксіетиленові компоненти. Взагалі, неіонні детергенти більш придатні для руйнування ліпід-ліпідних або ліпід-білкових взаємодій, ніж білок-білкових, тому вони вважаються неденатуруючими й широко використовуються для виділення мембранних білків у біологічно активній формі. Речовини з поліоксіетиленовими групами в «головці» можуть містити алкілполіетиленові етери із загальною формулою C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>OH або фенільне кільце між алкільним ланцюгом і етерним угрупованням. Тритони X-100 та NP-40 належать до останнього класу речовин. Поліоксіетиленовий ланцюг утворює невпорядковане кільце й у подальшому видаляється з гідрофобного ядра міцели. Алкільні глікозиди дедалі частіше використовуються як неіонні детергенти за виділення мембранних білків [1]. Для порівняння ефективності використання неіонних детергентів було використано іонний детергент N-лауроїлсаркозин.

Щоб вивчити ефективність використання детергентів, під час виділення ФЦ b<sub>2</sub> із клітин дріжджів ліофільно висушені клітини руйнували скляними кульками Balotini (діаметром 0,5 мм), з використанням відповідних детергентів (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика безклітинних екстрактів, отриманих руйнуванням клітин *O. polymorpha* з використанням різних детергентів (наведено результати типового експерименту)

Безклітинний екстракт	V, мл	C <sub>б</sub> , мг·мл <sup>-1</sup>	Σ б, мг	VA ФЦ b <sub>2</sub> , Од·мл <sup>-1</sup>	ПА ФЦ b <sub>2</sub> , Од·мг <sup>-1</sup>	Σ VA Од.
Контроль (без додавання детергента)	0,45	14,30	6,40	13,00	0,90	5,85
NP-40 (0,0175 %)	0,45	18,20	8,20	15,00	0,82	6,75
NP-40 (0,035 %)	0,45	18,80	8,50	17,70	0,94	7,97
1 % Твін-20	0,45	15,00	6,75	9,95	0,66	4,48
1 % Тритон X-100	0,40	14,80	5,92	12,00	0,81	4,80
1 % N-лауроїлсаркозин	0,40	14,00	5,60	9,95	0,71	3,98

**Примітки:** V – об'єм; C<sub>б</sub> – концентрація білка; Σ б – сумарна кількість білка; VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність; Σ VA – сумарна кількість одиниць ферменту

Найефективнішою речовиною для екстракції ФЦ b<sub>2</sub> виявився NP-40 у концентрації 0,035 % (табл. 2). Він забезпечував у 1,36 рази вищу об'ємну питому активність ФЦ b<sub>2</sub> у безклітинних екстрактах, порівняно з контролем. Проте масова питома активність ферменту практично не зростала (0,94 проти 0,90 Од·мг<sup>-1</sup>), що свідчить про те, що цей детергент сприяє кращій екстракції як цільового ферменту, так і баластних білків.

Щоб вивчити ймовірний інактивуєчий вплив окремих детергентів на активність ФЦ b<sub>2</sub> у безклітинних екстрактах (БЕ), провели електрофорез БЕ за нативних умов. У лунки 8 % ПААГ вносили однакову кількість ФЦ b<sub>2</sub> (0,03 Од.) і після проведення електрофорезу проводили візуалізацію ферментативної активності відповідно до методики [9].

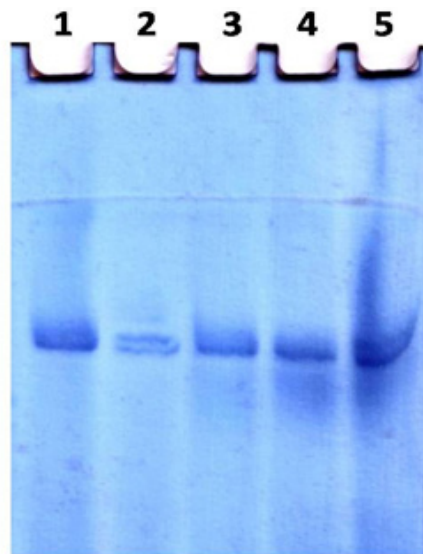


Рис. 1. Візуалізація активності ФЦ b<sub>2</sub> безклітинних екстрактів, отриманих за використання різних детергентів: 1 – контроль (без додавання детергента); 2 – 1 % Твін-20; 3 – 1 % N-лауроїлсаркозин; 4 – 1 % Тритон X-100; 5 – NP-40 (0,035 %). Умови нативного електрофорезу: 8 % ПААГ; рН 8,8; 5 год; 60 В; 12 мА; кімнатна температура

Як видно із рис. 1, практично всі досліджені детергенти не виявляють суттєвої інактивуєчої дії на активність ферменту в процесі його виділення. Лише за використання 1 % Твіну-20 візуально спостерігали зниження активності ФЦ b<sub>2</sub> щодо контролю.



Для забезпечення кращого виходу ФЦ  $b_2$ , після руйнування клітин дріжджів уламки клітин додатково обробляли сумішшю, що містила 10 % бутанол у 50 мМ фосфатному буфері (рН 7,8) з додаванням 1 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ та 100 мМ лактату натрію за наявності досліджуваних детергентів (NP-40, Твін-20, Тритон X-100 та N-лауроїлсаркозин). Оптимальні умови обробки уламків клітин були такими: співвідношення екстрагуючої суміші до уламків клітин – 2 г на 10 мл; час інкубації – 20 год; температура 4 °С із постійним перемішуванням на магнітній мішалці. Безклітинні екстракти відокремлювали від уламків клітин центрифугуванням за 10 000 g. В отриманих екстрактах визначали сумарний білок за Лоурі та питому активність ФЦ  $b_2$  (табл. 3).

Таблиця 3

Характеристика безклітинних екстрактів, отриманих із клітин *O. polymorpha* після 20 год лізису з використанням бутанолу та детергентів (наведені результати типового експерименту)

Супернатант	V, мл	$C_6$ , мг·мл <sup>-1</sup>	$\Sigma$ б, мг	VA, Од·мл <sup>-1</sup>	ПА, Од·мг <sup>-1</sup>	$\Sigma$ VA, Од.
Контроль (без додавання детергента)	0,45	16,7	7,50	2,30	0,13	1,04
NP-40 (0,0175 %)	0,45	16,80	7,56	9,00	0,53	4,05
NP-40 (0,035 %)	0,45	17,60	7,90	27,00	1,57	12,15
1 % Твін-20	0,45	15,00	6,00	6,00	0,40	2,70
1 % Тритон X-100	0,45	23,00	10,35	4,60	0,20	2,07
1 % N-лауроїлсаркозин	0,45	20,00	9,00	23,00	1,16	10,35

**Примітки:** V – об'єм;  $C_6$  – концентрація білка;  $\Sigma$  б – сумарна кількість білка; VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність;  $\Sigma$  VA – сумарна кількість одиниць ферменту

Результати, представлені у табл. 3, чітко підтверджують попередні дані про позитивний вплив NP-40 (у концентрації 0,035 %) на екстракцію ферменту з уламків клітин протягом їхньої обробки бутанолом – 12,15 Од. проти 1,04 Од., що майже у 12 разів вище, порівняно з контролем. Трохи менший вихід ферменту спостерігали за використанням N-лауроїлсаркозину – 10,35 Од., що майже в 10 разів перевищує значення контролю. Слід зазначити, що «коефіцієнт якості» екстракції щодо цільового білка в 1,35 разу кращий для системи з NP-40, ніж для системи з N-лауроїлсаркозином (ПА 1,57 Од·мг<sup>-1</sup> проти 1,16 Од·мг<sup>-1</sup>, відповідно).

*Афінна хроматографія для виділення й очищення ФЦ  $b_2$  із клітин рекомбінантного штаму *O. polymorpha* «tr1»*

Для афінного очищення ФЦ  $b_2$  нами синтезовано афінний сорбент на основі амінопропілсилохрому, модифікованого комерційним цитохромом *c* у ролі ліганда. Цитохром *c* зі серця бика (C2037 SIGMA-ALDRICH) ковалентно зв'язували силохромом, активованим глутаровим альдегідом, завдяки утворенню основи Шиффа між залишками лізину й альдегідними групами.

Афінний сорбент синтезували за такою схемою: до 25 мл силохрому амінопропілового додавали 50 мл 0,25 М ФБ, рН 8,0 та 5 мл 25%-ного глутарового альдегіду. Суміш, помірно перемішуючи на шейкері, залишали на ніч за температури 28 °С. Осад промивали 250 мл 0,05 М ФБ. Модифікацію активованого сорбенту проводили за допомогою цитохрому *c*. У колбу вносили 10 мл активованого глутаровим альдегідом амінопропілового силохрому у ФБ, рН 8,0 і додавали розчин цитохром *c* з концентрацією 2 мг·мл<sup>-1</sup>. Сорбент промивали дистильованою водою за помірного перемішування з подальшою фільтрацією крізь фільтрувальний папір. Модифікований силохром сушили на повітрі [2].

Для контролю ступеня модифікації сорбенту визначали сумарний білок цитохрому *c* до і після його зв'язування, промиваючи сорбент 10 мМ ФБ, рН 7,8. Сумарний білок у розчині цитохрому *c* з концентрацією 2 мг·мл<sup>-1</sup> до зв'язування становив 10 мг, тоді як після зв'язування в промивах білка залишалося тільки 0,5 мг. Отже, 5 мл сорбенту зв'язало близько 9,5 мг цитохрому *c*.

Для очищення ФЦ *b*<sub>2</sub> 15 мл БЕ зі сумарною кількістю одиниць активності 278 Од. і білком 359 мг наносили на колонку, наповнену іммобілізованим на модифікованому цитохромом *c* аміносилохромі. Після нанесення БЕ колонку промивали 25 мМ фосфатним буфером рН 7,8 та елюювали зв'язані білки зростаючими концентраціями того ж буферу. Отримані білкові фракції збирали й аналізували активність ферменту. За швидкості потоку буферу для елюції 20 та 25 мл·хв<sup>-1</sup> було отримано фракцію білків, що не зв'язувалася зі сорбентом (ФНБ), і білкові фракції, що елюювалися 0,2 М фосфатним буфером рН 7,8 (Ф1). Результати визначення активності продемонстрували, що активність ФЦ *b*<sub>2</sub> виявлялась у Ф1 і не визначилась у ФНБ, що свідчить про високу спорідненість ферменту до афінного сорбенту.

Таблиця 4

Етапи очищення ФЦ *b*<sub>2</sub> з використанням афінної хроматографії на іммобілізованому цитохромі *c* (наведено результати типового експерименту)

Показник	V, мл	C <sub>б</sub> , мг·мл <sup>-1</sup>	∑ б, мг	VA, Од.·мл <sup>-1</sup>	ПА, Од.·мг <sup>-1</sup>	∑ VA, Од.	Вихід, %	Очищення, разів
БЕ	15,0	23,9	359,0	18,5	0,77	277,5	=100	–
«Проскок» під час нанесення	10,0	16,0	160,0	слідова	слідова	слідова	–	–
Елюція 25 мМ ФБ, рН 7,8	3,0	22,0	66,0	23,80	1,10	71,0	25,6	1,43
Елюція 50 мМ ФБ, рН 7,8	3,0	6,50	19,5	35,0	5,38	105,0	37,8	8
Елюція 200 мМ ФБ, рН 7,8	3,0	1,0	3,0	10,0	10,0	30,0	10,8	13

**Примітки:** V – об'єм; C<sub>б</sub> – концентрація білка; ∑ б – сумарна кількість білка; VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність; ∑ VA – сумарна кількість одиниць ферменту

Унаслідок проведеної афінної хроматографії отримано очищений препарат ФЦ *b*<sub>2</sub> з питоною активністю до 10 Од.·мг<sup>-1</sup>. Вихід ферменту за активністю становив 74 %. Для стабілізації ферменту до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий амоній сульфат до 70 % від насичення за 0 °С, підтримуючи рН близько 7,5.

Ступінь очищення цільового ферменту від баластних білків характеризували, визначаючи його активність і концентрацію білка в кожній фракції елюату (табл. 4) та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов за наявності SDS (рис. 2).

Як видно з електрофореграми, очищений препарат ферменту представлений чіткою домінуючою зоною з молекулярною масою субодиниць 79 кДа. Мінорна зона з молекулярною масою 64,6 кДа відповідає домішковому білку невідомої природи, можливо, частково деградованим субчастинкам ФЦ *b*<sub>2</sub>.

Для додаткової характеристики чистоти очищеного препарату ФЦ *b*<sub>2</sub> аналізували його спектр поглинання у видимій ділянці порівняно з цитохромом *c*. В обидвох випадках використовували однакову концентрацію білка – 1 мг·мл<sup>-1</sup>. Спектри реєстрували у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см в межах довжин хвилі 350–700 нм на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC, використовуючи стандартну програму “UVProbe 2.20” (рис. 3).

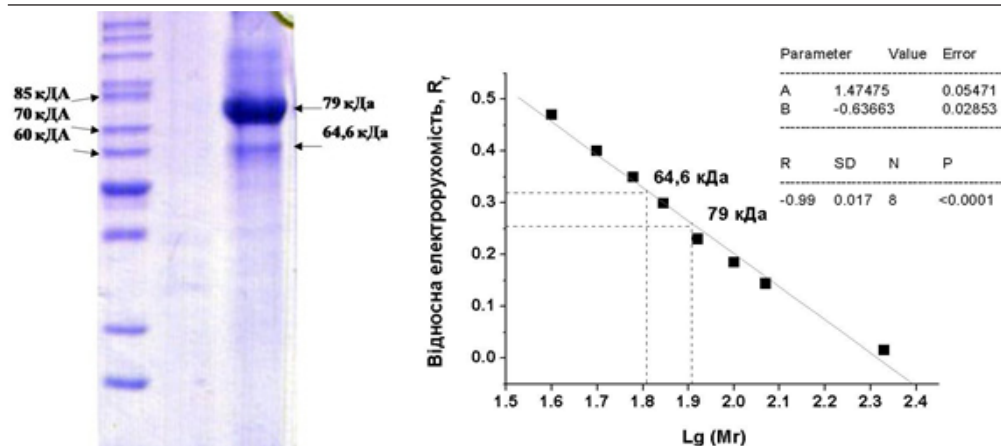


Рис. 2. Електрофоретична характеристика та визначення молекулярної маси очищеного препарату ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha*, отриманого за допомогою афінної хроматографії. SDS-електрофорез за денатуруючих умов у 12 % ПААГ. Білки забарвлені Кумасі R-250

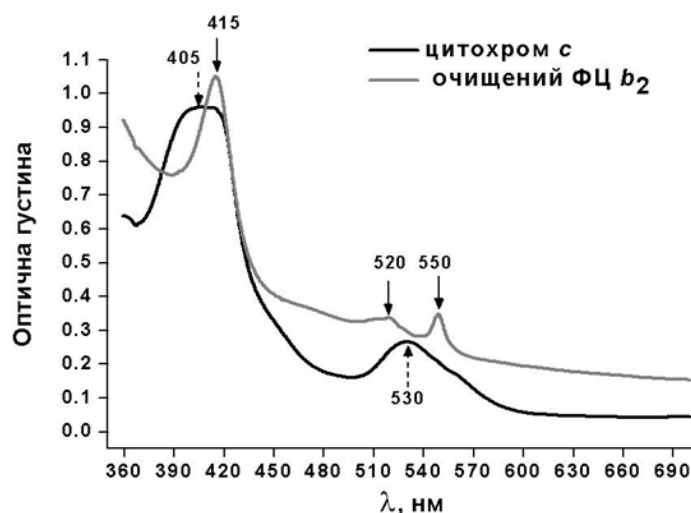


Рис. 3. Спектри поглинання цитохрому  $c$  і очищеного препарату ферменту (відновлена форма ФЦ  $b_2$ ) за наявності 0,33 мМ L-лактату

У спектрі спостерігали максимуми поглинання гему для цитохрому  $c$  і очищеного ФЦ  $b_2$ , які припадають на 405 та 415 нм, відповідно. Окрім того, для відновленої форми ФЦ  $b_2$  мають місце максимуми поглинання флавінових груп за  $\lambda=520$  та 550 нм; у разі цитохрому  $c$  цих піків немає. Для препарату цитохрому  $c$  виявлено характерний максимум за довжини хвилі 530 нм.

Для оцінки ефективності афінної хроматографії ФЦ  $b_2$  її результати порівнювали з параметрами очищення ферменту за допомогою іонообмінної хроматографії. Останню проводили на колонці, заповненій комерційним сорбентом DEAE-Toyopearl 650M. Після нанесення безклітинних екстрактів на колонку, „проскок” і промивні розчини відбирали, визначаючи в них концентрацію білка й активність ФЦ  $b_2$ . Фракції збирали, стежачи за просуванням по колонці буро-забарвленої зони, що відповідає ФЦ  $b_2$ .



Таблиця 5

Етапи очищення ФЦ  $b_2$  за допомогою іонообмінної хроматографії на DEAE-целюлозі  
 (наведено результати типового експерименту)

Показник	V, мл	$C_6$ , мг·мл <sup>-1</sup>	$\Sigma$ б, мг	VA, Од.·мл <sup>-1</sup>	ПА, Од.·мг <sup>-1</sup>	$\Sigma$ VA, Од.	Вихід, %	Очищення, разів
БЕ	6,00	23,90	143	18,50	0,77	111	=100	–
«Проскок» під час нанесення	5,00	2,80	14,00	слідова	слідова	слідова	–	–
Елюція 50 мМ ФБ, рН 7,8	3,00	4,75	14,25	слідова	слідова	слідова	–	–
Елюція 125 мМ ФБ, рН 7,8	3,00	1,30	3,90	слідова	слідова	слідова	–	–
Елюція 200 мМ ФБ, рН 7,8	3,00	1,98	5,94	слідова	слідова	слідова	–	–
Елюція 200 мМ ФБ, рН 7,8 + 30% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,20	4,8	10,45	48,3	10,00	106,3	95	13,4

**Примітки:** V – об'єм;  $C_6$  – концентрація білка;  $\Sigma$  б – сумарна кількість білка; VA – питома об'ємна активність; ПА – питома масова активність;  $\Sigma$  VA – сумарна кількість одиниць ферменту

За допомогою іонообмінної хроматографії отримано препарат ФЦ  $b_2$  з питоною активністю 10 Од·мг<sup>-1</sup>, що збігається з характеристикою ферменту, очищеного за допомогою афінної хроматографії (у кращій III фракції елюату). Вихід ферменту за активністю близький до 95 %. Для стабілізації ферменту до об'єднаних фракцій елюату додавали сухий амонію сульфат до 70 % від насичення за 0 °С, підтримуючи рН близько 7,5.

Ступінь очищення ФЦ  $b_2$  отриманого іонообмінною хроматографією, оцінювали за допомогою електрофорезу в ПААГ у денатуруючих умовах за наявності SDS (рис. 4).

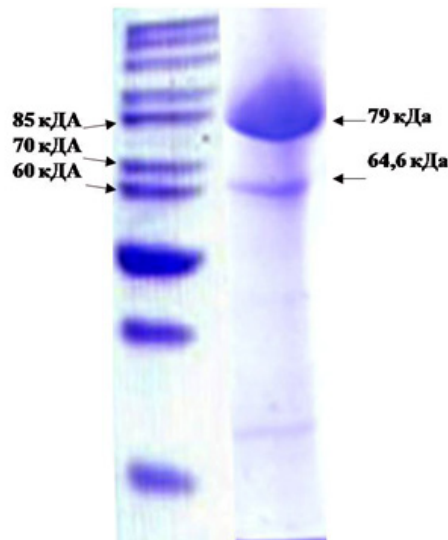


Рис. 4. Характеристика препарату ФЦ  $b_2$  *O. polymorpha* «tr1» після очищення іонообмінною хроматографією. SDS-Електрофорез за денатуруючих умов у 12 % ПААГ. Білки забарвлено Кумассі R-250

Як видно з рис. 4, очищений препарат ферменту представлений чіткою домінуючою білковою зоною з молекулярною масою субодиниці 79 кДа. Як і у разі використання афінної хроматографії, на електрофореграмі препарату ФЦ  $b_2$  після іонообмінної хроматографії нижче основної зони спостерігається мінорна білкова зона з молекулярною масою 64,6 кДа.

Для додаткової перевірки гомогенності очищених препаратів ФЦ  $b_2$  проведено дослідження спектральних характеристик окисленої та відновленої форм ферменту.

Відновлення вихідної окисленої форми очищеного ФЦ  $b_2$  проводили додаванням 0,3 мМ L-лактату (субстрату) до вихідного препарату ферменту.

Спектри препарату ФЦ  $b_2$  з питомою активністю 10 Од·мг<sup>-1</sup> та концентрацією білка 4,8 мг·мл<sup>-1</sup> реєстрували на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC (рис. 5).

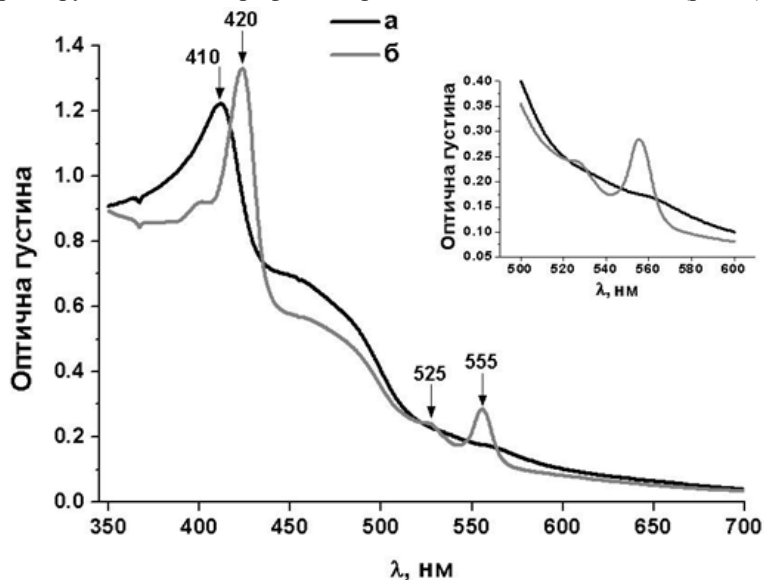


Рис. 5. Спектри поглинання ФЦ  $b_2$  вихідної окисленої (а) та відновленої форми (за наявності 0,3 мМ L-лактату) (б)

Як видно зі спектра поглинання окисленої форми ФЦ  $b_2$ , пік Сорє (максимум поглинання гему) припадає на 410 нм з коефіцієнтом мілімолярної екстинкції 20,0 мМ<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> (з урахуванням молекулярної маси субодиниці 79 кДа). У разі відновленої форми ферменту максимум поглинання гемової групи трохи зміщується до 420 нм з коефіцієнтом мілімолярної екстинкції 21,9 мМ<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, а піки в ділянці 525 та 555 нм є близькими до максимумів поглинання флавінових груп, описаних у літературі для флавоцитохромів  $b_2$  [11]. Окрім того, чіткий пік Сорє свідчить про високу чистоту очищеного препарату ФЦ  $b_2$ .

#### *Пошук стабілізуючих компонентів і оптимізація умов зберігання очищених препаратів ферменту*

У процесі тестування потенційних стабілізуючих компонентів для зберігання ферменту, препарат очищеного ФЦ  $b_2$  із активністю 20 Од·мл<sup>-1</sup>, що містив 25 мМ Тріс-ФБ, рН 8,5, 1 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ, інкубували за наявності низки органічних і неорганічних речовин: 40 % гліцеролу, 40 % сахарози та 70 % сульфату амонію. Як контроль за аналізу стабілізуючого впливу різних речовин використовували препарат ФЦ  $b_2$  без додавання жодних стабілізаторів (рис. 6).

Найкращий стабілізуючий ефект спостерігали за використання 70 % амонію сульфату (рис. 6). Проте навіть за його використання, активність очищеного препарату на сімнадцяту добу зберігання знижувалася в 1,25 разу (до 16 Од·мл<sup>-1</sup>), що свідчить про необхідність проведення подальших досліджень із пошуку оптимальних стабілізаторів ферменту.

Залежність активності очищеного препарату ФЦ  $b_2$  від температур зберігання представлено на рис. 7.

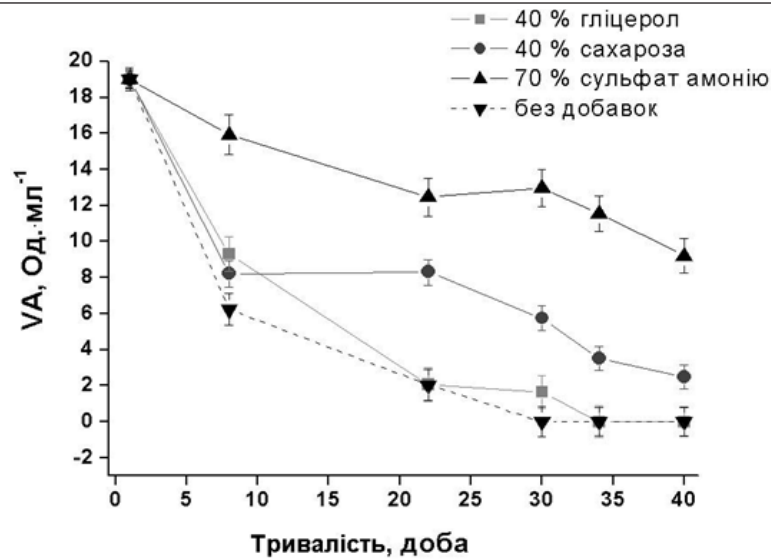


Рис. 6. Питома об'ємна активність препаратів очищеного ФЦ  $b_2$  ( $VA = 20$  Од·мл $^{-1}$ ) за використання низки стабілізуючих агентів: 40 % гліцеролу; 40 % сахарози; 70 % амонію сульфату. Умови зберігання: 25 мМ Трис-ФБ, рН 8,5; 1 мМ ЕДТА; 1 мМ ФМСФ та один зі стабілізуючих агентів за 4 °С у щільно закритих світлонепроникних пробірках

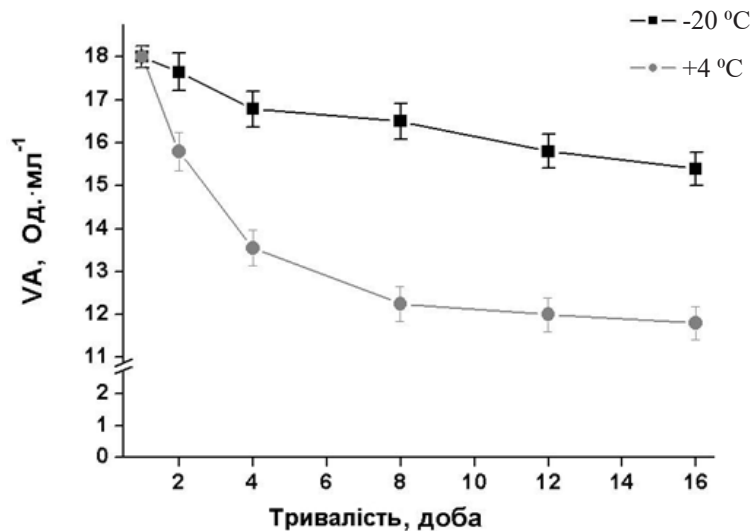


Рис. 7. Залежність питомої об'ємної активності очищеного препарату ФЦ  $b_2$  ( $VA = 20$  Од·мл $^{-1}$ ) за різних температурних режимів зберігання. Умови зберігання: 25 мМ Трис-ФБ, рН 8,5; 1 мМ ЕДТА; 1 мМ ФМСФ у 70 % амонію сульфаті в щільно закритих світлонепроникних пробірках за 4 °С (а) та -20 °С (б)

Отримані результати свідчать, що за використання як стабілізуючого агента 70 % амонію сульфату оптимальною температурою для зберігання є -20 °С. Так, на шістнадцяту добу зберігання препарату ФЦ  $b_2$  із  $VA$  20 Од·мл $^{-1}$  за температури -20 °С активність ферменту становила 16,0 Од·мл $^{-1}$ , що відповідає 80 % від його вихідної активності. У разі

зберігання препарату за температури 4 °С протягом шістнадцяти діб активність ФЦ  $b_2$  становила 12,0 Од·мл<sup>-1</sup>, що відповідає 60 % від вихідної активності препарату (рис. 7).

Отже, в результаті роботи опрацьовано схему виділення флавоцитохрому  $b_2$  із клітин рекомбінантного штаму-продуцента *Ogataea (Hansenula) polymorpha* «tr1» із використанням різних детергентів. Розроблено новий метод очищення ФЦ  $b_2$  із клітин метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* на основі афінної хроматографії на іммобілізованому цитохромі *c*. Охарактеризовано фізико-хімічні властивості отриманих препаратів ферментів. Оптимізовано умови стабілізації очищеного препарату ФЦ  $b_2$ .

Автори вдячні к. х. н. Г. Гайді за консультування у приготуванні амінопропілцилохрому. Роботу виконано за фінансової підтримки МОН України у межах проектів #0118U000297 та #0116U004737.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Остапченко Л. І., Михайлик І. В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій: навч. посібник. К.: ВПЦ «Київський університет», 2006. 215 с.
2. Стасюк Н., Гайда Г., Гайда А. та ін. Синтез афінних сорбентів для очищення аргінази І людини із рекомбінантних дріжджів *Hansenula polymorpha* // Праці НТШ. Сер. Хемія і Біохемія. 2011. Т. 28. С. 139–149.
3. Ackland M. R., Reeder J. E. A rapid chemical spot test for the detection of lactic acid as an indicator of microbial spoilage in preserved foods // Appl. Bacteriol. 1984. Vol. 56. N 3. P. 415–419.
4. Appleby C., Morton R. Lactic dehydrogenase and cytochrome  $b_2$  from yeast. Purification and crystallization // Biochem. J. 1959. Vol. 71. P. 492–499.
5. Bleiberg B., Steinberg J., Katz S. et al. Determination of plasma lactic acid concentration and specific activity using high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. 1991. Vol. 568. N 2. P. 301–308.
6. Celerier J., Risler Y., Schwenke J. Isolation of the flavodehydrogenase domain of *Hansenula anomala* flavocytochrome  $b_2$  after mild proteolysis by an *H. anomala* proteinase // Eur. J. Biochem. 1989. Vol. 182. N 1. P. 67–75.
7. Crawford S., Hoogeveen R., Brancati F. et al. Association of blood lactate with type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study // Int. J. Epidemiol. 2010. Vol. 39. N 6. P. 1647–1655.
8. Dmytruk K., Smutok O., Gonchar M., Sibirnyĭ A. Construction of flavocytochrome  $b_2$ -overproducing strains of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) // Microbiology (Moscow). 2008. Vol. 77. N 2. P. 213–218.
9. Gaida G. Z., Stel'mashchuk S. Ya., Smutok O. V., Gonchar M. V. A new method of visualization of the enzymatic activity of flavocytochrome  $b_2$  in electrophoretograms // Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow). 2003. Vol. 39. N 2. P. 221–223.
10. Ichai C., Leverve X., Orban J.-Ch. Lactate and Acute Heart Failure Syndrome / in the Book Acute Heart Failure (Springer publishing. ISBN: 978-1-84628-781-7). 2008. P. 768–780.
11. Jacq C., Lederer F. Two molecular species of cytochrome  $b_2$  from *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem. 1972. Vol. 25. N 1. P. 41–48.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
13. Smutok O., Dmytruk K., Gonchar M. et al. Permeabilized cells of flavocytochrome  $b_2$  overproducing recombinant yeast *Hansenula polymorpha* as biological recognition element in amperometric lactate biosensors // Biosens. Bioelectron. 2007. Vol. 23. N 5. P. 99–605.

14. *Shavlovskiy G. M., Zharova V. P., Shchelokova I. F. et al.* Flavinogenic activity of natural strains of the yeast // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 1978. Vol. 14. N 2. P. 184–189.

*Стаття: надійшла до редакції 29.01.18*

*доопрацьована 21.02.18*

*прийнята до друку 27.02.18*

**ISOLATION, PURIFICATION, STABILIZATION AND CHARACTERISATION  
OF FLAVOCYTOCHROME  $b_2$  FROM OVERPRODUCING CELLS OF *OGATAEA  
POLYMORPHA* “tr1” (*gcr1 catX CYB2*)**

**O. Smutok\*, M. Karkovska, N. Stasyuk, M. Gonchar**

*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine  
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: smutok.oleg.2015@gmail.com*

A new method of isolation, purification, and stabilization of L-lactate: cytochrome c oxidoreductase (EC 1.1.2.3; flavocytochrome  $b_2$ , FC  $b_2$ ) from the cells of recombinant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* “tr1” (*gcr1 catX CYB2*) has been developed and physico-chemical characterisation of purified preparations has been done. The strain is characterized by impairment of glucose catabolic repression and a five-fold overproduction of FC  $b_2$ , compared to a parent wild-type strain. The effect of several detergents on the yield of membrane-incorporated FC  $b_2$  was studied and the enzyme isolation procedure has been optimized. A new method of affinity chromatography for purification of FC  $b_2$ , based on the use of cytochrome c as a natural ligand, immobilized on aminopropyl silochrome, has been developed. The efficiency of the developed affinity chromatography was compared to ion exchange chromatography on DEAE-Toyopearl 650M cellulose. The specific activity of FC  $b_2$  preparations for both types of chromatography was about 10 U·mg<sup>-1</sup> and enzyme yield was in the range of 75–95 %. The purity of the purified FC  $b_2$  was evaluated by SDS-PAAG electrophoresis under denaturing conditions. The effect of a number of stabilizing agents and storage conditions has been investigated in order to provide the maximum activity of the FC  $b_2$ . The best stabilizing effect was observed using 70 % ammonium sulfate and by storage of the preparation at -20 °C. Some physico-chemical parameters of the purified enzyme from *O. polymorpha* “tr1” cells have been studied (molecular mass and spectral characteristics of oxidized and reduced enzyme forms).

*Keywords:* L-lactate: cytochrome c oxidoreductase; *Ogataea polymorpha*; overproducing cells; isolation, purification, stabilization of the enzyme