

УДК 577.15.02

## СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *Trigonopsis variabilis*, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В КЛЕТКАХ *E. coli*

С.С. Савин, И.В. Чернышев, В.И. Тишков, С.В. Хороненкова

(кафедра химической энзимологии; e-mail vit@enz.chem.msu.ru)

Осуществлена экспрессия оксидазы D аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* в клетках *E. coli* в виде растворимого и активного фермента. Изучена субстратная специфичность рекомбинантного фермента и определены кинетические параметры с несколькими аминокислотами. Разработаны и оптимизированы методики определения высоких и низких концентраций рекомбинантной оксидазы D аминокислот по ферментативной активности.

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, DAAO) является флавинодержим ферментом. Она катализирует окислительное дезаминирование D-аминокислот в соответствующие  $\alpha$ -кетокислоты с образованием аммиака и восстановлением молекулярного кислорода до пероксида водорода. Этот фермент представляет значительный интерес для биотехнологии, так как может быть использован при получении 7 аминоцефалоспоровой кислоты из цефалоспорина C [1, 2]. Данная стадия является ключевой для синтеза полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. Оксидаза D-аминокислот все в более широких масштабах используется для получения неприродных L-аминокислот [3] и  $\alpha$ -кетокислот [4], а также в биосенсорах [5–7] для детекции D-аминокислот в различных биологических образцах. Оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) является наиболее перспективным для практических целей ферментом из-за своей повышенной активности и стабильности в сравнении с DAAO из других источников [8–10].

Аналитическое применение DAAO в биосенсорах определяется главным образом субстратной специфичностью фермента. В литературе имеется достаточное количество данных по этому вопросу [9–11], однако результаты разных авторов противоречивы. Это может быть связано, во-первых, с разными методами и условиями определения активности фермента, во-вторых, с разной концентрацией растворенного кислорода, максимальная величина которой (0,21 мМ) при 37°C, pH 8,0 и при обычном давлении ниже, чем значение константы Михаэлиса фермента ( $K_M$ ) по кислороду (0,72 мМ для TvDAAO) [9].

Следует отметить, что для образцов DAAO, полученных из разных источников, наблюдается значительное различие в спектрах субстратной специфичности, что может быть использовано для селективного определения концентрации отдельных D-аминокислот в образцах на основе мультибиосенсора. В настоящее время на практике используют, как правило, не природные ферменты, а их мутантные формы с улучшенными свойствами (активность, стабильность). Чем более чувствительной будет методика определения активности, тем меньшее количество мутантного фермента потребуется для анализа и тем дешевле обойдется поиск новых мутантов, поскольку получение десятков тысяч мутантов и их скрининг – очень дорогая процедура. Оксидаза D-аминокислот – высокоактивный фермент, который легко детектируется различными методами при низких концентрациях (не более 0,05% от общего белка клетки), однако анализ высоких концентраций фермента без предварительного разбавления невозможен. При проведении единичных анализов процедура разбавления не является определяющим фактором, тем не менее в случае систематических анализов по определению DAAO в высоких концентрациях временные и денежные затраты на процедуру разбавления становятся существенными. Подобная ситуация наблюдается, например, при оптимизации культивирования рекомбинантных штаммов – продуцентов DAAO или при очистке фермента.

В предлагаемой работе была исследована субстратная специфичность оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis*, экспрессированной в клетках *E. coli*, а также предложены и оптимизирова-

ны методики определения высоких и низких концентраций рекомбинантного фермента.

### Экспериментальная часть

**Экспрессия гена *daao*.** Для экспрессии целевого белка была использована плазида рKanDAAO, полученная клонированием гена *daao* по сайтам рестрикции NcoI и BamHI в экспрессионный вектор рЕТ33b [12]. Трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК проводили согласно методу [13]. Для экспрессии гена *daao* использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)/pLysS Codon Plus ("Novagen", США). Клетки культивировали при комнатной температуре (22°C) на 2\*YT среде (16 г/л бактотриптона и 10 г/л дрожжевого экстракта фирмы "Difco" (США), 1,5 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л хлорида натрия, 1 г/л гидрофосфата калия и 1% глицерина фирмы "Fluka/BioChemika" (Швейцария), рН 7,5). Индукцию осуществляли добавлением IPTG (изопропил-β-D-тио-галактозид) фирмы "Sigma" (США) до конечной концентрации 1,0 мМ при плотности клеток на 600 нм  $A_{600} = 1,0$ . Культивирование прекращали после достижения постоянной величины поглощения при 600 нм при 22 °С.

**Очистка рекомбинантной T<sub>v</sub>DAAO.** Очистка включала термообработку при 45 °С в течение 10 мин, ионообменную хроматографию на колонке "MonoQ" ("PharmaciaBiotech", Швеция) и гель-фильтрацию на колонке "Sephacryl S 200" ("PharmaciaBiotech", Швеция). Чистота полученных ферментных препаратов составила не менее 95%, выход по активности – 85%.

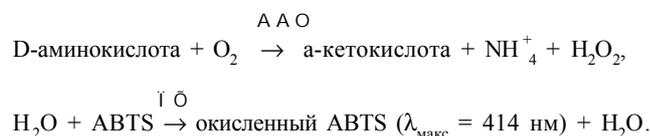
**Определение активности DAAO.** Для определения активности оксидазы D-аминокислот по выделению пероксида водорода использовали пероксидазу из корней хрена (ПХ) ("Reanal", Венгрия) и ее субстрат АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)) фирмы "Sigma" (США). В качестве субстрата для DAAO использовали различные D-аминокислоты ("Reanal", Венгрия). В кювету спектрофотометра (рабочий объем 1 мл, оптический путь 1 см) добавляли раствор D-аминокислоты в 50 мМ калий-фосфатном буфере (КФБ), 20 мкл раствора АВТС (16 мг/мл) в воде, 10 мкл раствора пероксидазы в 50 мМ КФБ (1000 Ед/мл) и насыщенный кислородом 50 мМ КФБ (рН 8,0) до общего объема 980 мкл. После термостатирования в течение 10 мин добавляли 20 мкл фермента. Определение проводили при 30°C по накоплению продукта окисления АВТС на длине волны 414 нм ( $\epsilon_{414} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) на спектрофотометре "Shimadzu 1601PC".

**Определение кинетических параметров реакции DAAO.** Для определения величин максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса концентрацию соответствующей D-аминокислоты варьировали в диапазоне 0,5–5,0  $K_m$ . Приблизительное значение  $K_m$  определяли в отдельном эксперименте, измеряя скорость реакции при концентрациях D-аминокислоты 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10 мМ. Зависимость скорости реакции от температуры определяли при насыщающей концентрации D-триптофана (10 мМ) и D-метионина (10 мМ) при температурах 20, 25, 30 и 37°C. Зависимость кинетических свойств от рН среды изучали, измеряя величины  $V_m$  и  $K_m$  при значениях рН 7,0, 8,0 (50 мМ КФБ буфер) и 9,0 (50 мМ Трис-НСI). Значения рН определяли на рН-метре "Эксперт-001" ("Эконикс-эксперт", Россия) с точностью до 0,05 ед. рН при температуре 30°C. Градуировочный график получали из зависимости активности фермента от его концентрации при насыщающей концентрации D-аминокислоты (30°C, рН 8,0). Значения активности при каждой концентрации измеряли не менее 3 раз, а на границах и в середине диапазона определение проводили по 5 раз.

Величины  $V_m$  и  $K_m$  определяли как результат нелинейной регрессии зависимости скорости реакции от концентрации D-аминокислоты с помощью программы "Origin Pro 7,5", позволяющей оценить также и ошибки расчета параметров.

### Обсуждение результатов

Для определения активности DAAO использовали дополнительную реакцию восстановления образующегося пероксида водорода при сопряженном окислении АВТС, катализируемую пероксидазой из корней хрена:



Перед изучением субстратной специфичности рекомбинантного фермента было решено провести оптимизацию условий определения активности, так как выбор неоптимальных условий может быть причиной расхождения с данными других авторов.

На точность определения оксидазы D-аминокислот может влиять большое количество факторов. Во-первых, тип D-аминокислоты. Для достижения наибольшей чувствительности следует использовать такую D-аминокислоту, при которой активность фермента является максимальной, тогда как в случае высоких концентраций DAAO, наоборот, следует использовать D-аминокислоту, при которой активность фермента

минимальна. Величина константы Михаэлиса должна быть наименьшей, поскольку в таком случае можно использовать низкие концентрации субстрата и в конечном итоге сократить стоимость анализа.

Вторым важным фактором является точность дозирования растворов, используемых при определении активности. Ошибка измерения будет зависеть как от точности добавления растворов, так и от возможного изменения скорости реакции при изменении концентрации субстратов и ферментов, возникающего за счет ошибки дозирования. В настоящее время на практике широко используются автоматические пипетки с переменным объемом. Точность таких пипеток составляет 1–2%. Для проведения анализа требуется смешать пять компонентов: два раствора субстратов (D-аминокислота и ABTS), два раствора ферментов (DAAO и ПХ) и раствор буфера. Таким образом, только за счет операций дозирования ошибка определения будет составлять не менее 2,4–4,5%. Кроме того, поскольку скорость ферментативной реакции зависит от концентраций фермента и субстрата, на точность измерения будут влиять изменения в концентрации субстратов (D-аминокислоты и ABTS), полученные за счет ошибки дозирования. Этот фактор может быть нивелирован при использовании “насыщающих” концентраций субстратов ( $i_{20-25} K_M$ ), что следует непосредственно из уравнения Михаэлиса–Ментен.

Вначале была проведена оптимизация условий реакции, катализируемой пероксидазой хрена. Для корректной детекции активности DAAO образующийся в основной реакции пероксид водорода не должен накапливаться в реакционной среде, поэтому необходимо подобрать оптимальную концентрацию ПХ. Обычно в подобных системах активность второго фермента должна превышать активность основного фермента, как правило, в 10 раз. В зависимости от константы Михаэлиса эта величина может возрасти еще больше. Теоретический расчет показывает, что максимальная величина активности DAAO с помощью выбранной методики не должна превышать 1 ед. активности. При больших значениях активности скорость изменения поглощения раствора будет более 1 ед. поглощения за 10 с, что делает невозможным ее точное определение. Поэтому было решено использовать при анализе 10 ед. активности пероксидазы. Было установлено, что в присутствии ~1 ед. активности DAAO при использовании 10 (и выше) ед. активности ПХ, активность пероксидазы постоянна (рис. 1).

Вторым этапом была оптимизация концентрации ABTS. Для обеспечения максимальной активности ПХ необходимо работать с “насыщающими” концентрациями ABTS. Из литературы известно, что активность пероксидазы хрена не зависит от концентрации ABTS (32 мг/мл). Как следует из табл. 1, в случае биферментной системы величина наблюдаемой активности DAAO была постоянна при концентрации ABTS в кювете  $\geq 0,32$  мг/мл.

Таким образом, для определения активности рекомбинантной TvDAAO необходимо использовать количество пероксидазы хрена не менее 10 ед., а концентрация ABTS в кювете  $\geq 0,32$  мг/мл.

В табл. 2 представлены кинетические параметры для реакции рекомбинантной TvDAAO с различными D-аминокислотами, полученные нами при оптимизированных условиях определения. Из табл. 2 видно, что наибольшим сродством рекомбинантный фермент обладает к субстратам с большим гидрофобным радикалом (D-триптофан, D-фенилаланин, D-метионин и D-лейцин). Для сравнения в этой же таблице приведены данные других авторов по субстратной специфичности TvDAAO.

Наиболее высокая активность фермента наблюдается с D-метионином и D-валином. Эти D-аминокислоты более других подходят для определения низких концентраций рекомбинантной TvDAAO. Однако в случае D-валина наблюдается высокое значение  $K_M$ , т.е. для работы в режиме “насыщения” концентрация этого субстрата в реакционной смеси должна быть порядка 0,35 М, что существенно превосходит его растворимость (0,22 М). Таким образом, D-валин не подходит для проведения анализов образцов с низкой

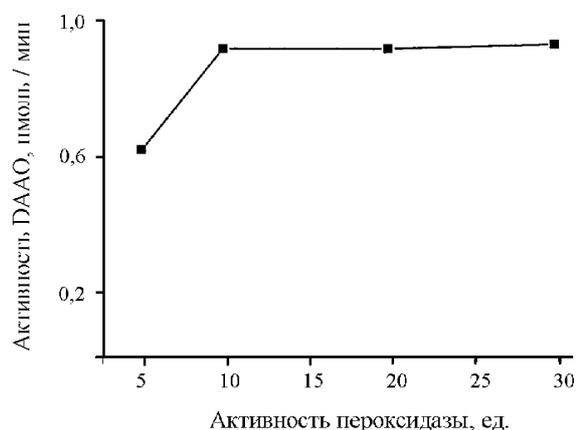


Рис. 1. Зависимость активности DAAO с D-метионином от количества пероксидазы в реакционной смеси (50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 8,0; 10 мМ D-метионин, 0,32 мг/мл ABTS)

Т а б л и ц а 1

## Зависимость активности рекомбинантной TvDAAO от концентрации ABTS

Концентрация ABTS в кювете, мг/мл	Активность TvDAAO, нмоль/мин
0,16	0,58 ± 0,01
0,32	0,79 ± 0,02
0,48	0,78 ± 0,02
0,64	0,80 ± 0,03

концентрацией TvDAAO. D-метионин, напротив, имеет низкое значение  $K_M$  и его концентрация в реакционной смеси должна составлять ~10–15 мМ. Для определения высоких концентраций рекомбинантной TvDAAO необходимо использовать субстрат с наименьшей максимальной скоростью и минимальным

значением  $K_M$  (в силу ограниченной растворимости большинства D-аминокислот). Для этих целей был выбран D-триптофан, который имеет величину  $K_M$  в 30–80 раз меньшую, чем другие “плохие” субстраты DAAO (пролин и треонин). В отдельных экспериментах было показано, что изменение pH в диапазоне 7,0–9,0 не оказывает влияния на активность фермента с D-метионином и D-триптофаном (табл. 2).

При оптимизации методик определения низких и высоких концентраций TvDAAO была исследована зависимость активности фермента от температуры. Эта зависимость имеет довольно сложный вид. Например, при повышении температуры с 30 до 37°C происходило снижение наблюдаемой скорости реакции, связанное, по-видимому, с уменьшением растворимости кислорода. В качестве оптимальной была выбрана температура 30°C. При более низких температурах снижается чувствительность определения, тогда как при более высоких время термостатирования увеличивается. На рис. 2 представлена зависи-

Т а б л и ц а 2

## Значения константы Михаэлиса и максимальной скорости для рекомбинантной TvDAAO с некоторыми D-аминокислотами (50 мМ КФБ, 30°C, pH 8,0). Для D-метионина и D-триптофана приведены значения кинетических параметров при pH 7,0, 8,0 (50 мМ КФБ), pH 9,0 (50 мМ Tris HCl)

D-аминокислота	$K_m$ , мМ	$V_m$ , мМ/мин	Относительная активность*, %		
			данная работа	[10]	[9]
D-метионин					
pH 7,0	0,58±0,02	4,56±0,08			
pH 8,0	0,46±0,04	4,60±0,10	<b>100</b>	78	<b>100</b>
pH 9,0	0,44±0,04	4,40±0,20			
D-аланин	9,7±0,8	2,51±0,08	50	97	32
D-валин	17,7±0,4	4,51±0,05	89	<b>100</b>	39
D-лейцин	0,78±0,06	1,70±0,08	34	32	30-40
D-пролин	26±6	0,27±0,02	5	25	2
D-треонин	10,0±1,6	0,25±0,02	5	4	30-40
D-фенилаланин	0,40±0,04	2,00±0,09	39	36	80
D-триптофан					
pH 7,0	0,33±0,03	1,10±0,05			
pH 8,0	0,32±0,03	1,08±0,05	21	38	<b>100</b>
pH 9,0	0,34±0,03	1,10±0,05			
D-аспарагиновая кислота	нет реакции				

\* Значения указаны в процентах к максимальной активности с наилучшим субстратом – D-метионином

Таблица 3

Статистическая обработка данных точности определения низких концентраций DAAO с D-метионином.

Количество DAAO в пробе, мкг	Среднее значение активности, мкмоль/мин	Доверительный интервал
$1 \times 10^{-3}$	$4,28 \times 10^{-3}$	$0,30 \times 10^{-3}$
$35 \times 10^{-3}$	$194 \times 10^{-3}$	$9,7 \times 10^{-3}$
$70 \times 10^{-3}$	$385 \times 10^{-3}$	$25 \times 10^{-3}$
0,42	0,0265	0,0013
2,1	0,197	0,0016
8,4	0,764	0,0026

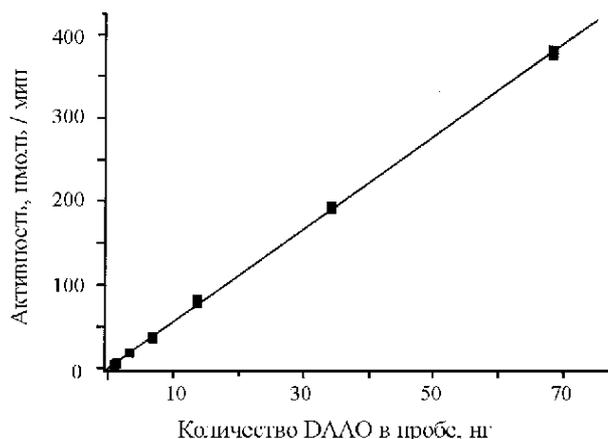


Рис. 2. Градуировочный график зависимости величины ферментативной активности от количества DAAO в пробе. Субстрат – 10 мМ D-метионин. 50 мМ фосфатный буфер (рН 8,0); концентрации пероксидазы и АВТС 10 ед./мл и 0,32 мг/мл соответственно

мость наблюдаемой активности TvDAAO с D-метионином от концентрации фермента. Как видно из этого рисунка, активность рекомбинантной TvDAAO линейно зависит от ее концентрации в диапазоне 1–70 нг/мл.

На рис. 3, а представлена концентрационная зависимость активности TvDAAO с D-триптофаном. Линейность наблюдается только при концентрациях фермента меньше 8,4 мкг/мл (рис. 3, б). При более вы-

соких концентрациях наблюдается отклонение от линейной зависимости, связанное с образованием олигомеров фермента. В нативном состоянии TvDAAO представляет собой димер, тогда как олигомеры более высокого порядка имеют более низкую удельную активность по сравнению с димером (рис. 3, а). Это согласуется с литературными данными [9].

Для определения точности предложенных методик для минимальных и максимальных количеств

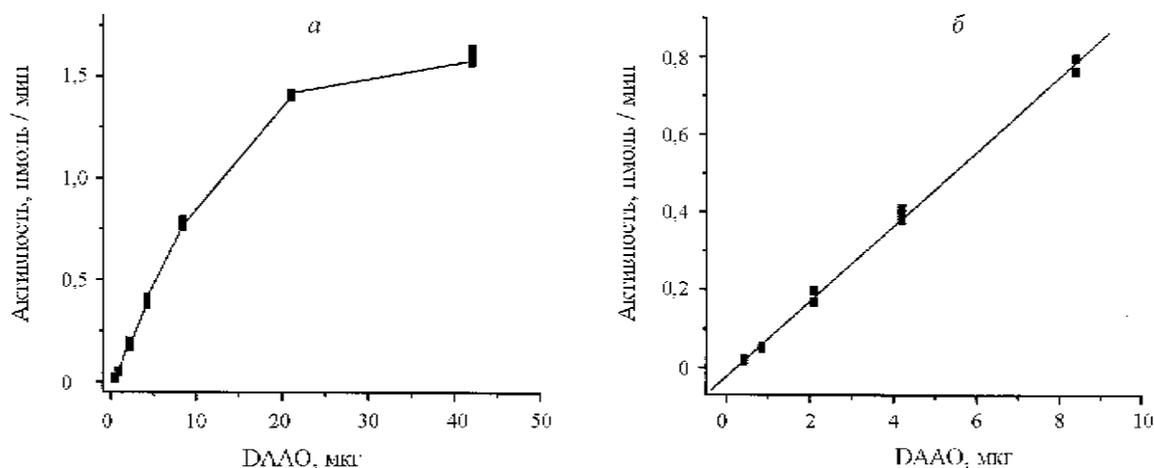


Рис. 3. Концентрационная зависимость активности DAAO (а) и ее линейный участок (б). 10 мМ D-триптофана в качестве субстрата (50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0; концентрация пероксидазы 10 ед/мл, концентрация АВТС 0,32 мг/мл)

фермента в пробе, а также в середине линейного диапазона было проведено по 5 контрольных измерений активности рекомбинантной TvDAAO. Полученные результаты представлены в табл. 3. Во всех случаях относительная погрешность измерения не превышает 5–7%.

Таким образом, была исследована субстратная специфичность оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* и предложены условия для проведения больших количеств анализов активности фермента в диапазоне 1–70 нг и 0,42–8,4 мкг фермента в пробе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям, контракт № 02.435.11.3005.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Conlon H.D., Bagal J., Baker K., Shen Y.Q., Wong B.L., Nolles R., Rausch C.W. // *Biotechnol. Bioeng.* 1995. **46**. P. 510.
2. Курочкина В.Б., Ныс П.С. // *Антибиотики и химиотерапия.* 2002. **47**. С. 29.
3. Nakajima N., Conrad D., Sumi H., Suzuki K., Esaki N., Wandrey C., Soda K. // *J. Ferm. Bioeng.* 1990. **70**. P. 322.
4. Beard T.M., Turner. N.J. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2002. **3**. P. 246.
5. Van Staden J.F., Stefan R.I., Aboul-Enein H. Y. // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000. **367**. P. 178.
6. Dominguez R., Serra B., Reviejo A.J., Pingarron J.M. // *Anal. Biochem.* 2001. **298**. P. 275.
7. Ihaba Y., Mizukami K., Hamada-Sato N., Kobayashi T., Imada C., Watanabe E. // *Biosens. Bioelectron.* 2003. **19**. P. 423.
8. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. **20**. P. 467.
9. Shrader T., Andreesen J.R. // *Arch. Microbiol.* 1996. **165**. P. 41.
10. Gabler M., Hense M., Fischer L. // *Enz. Microb. Technol.* 2000. **27**. P. 605.
11. Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. **65**. P. 627.
12. Давыдова Е.Е., Тишков В.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия.* 2002. **43**. С. 353.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 172.

Поступила в редакцию 01.12.05

## SUBSTRATE SPECIFICITY OF D-AMINO ACID OXIDASE FROM YEAST *TRIGONOPSIS VARIABILIS* EXPRESSED IN *E. COLI* CELLS

S.S. Savin, I.V. Chernyshov, V.I. Tishkov, S.V. Khoronenkova

(Department of Chemical Enzymology)

**D amino acid oxidase from yeast *Trigonopsis variabilis* was expressed in *E. coli* cells as active and soluble protein. Substrate specificity of the enzyme was studied and kinetic parameters with different D-amino acids were determined. Methods of detection of low and high concentrations of the recombinant D-amino acid oxidase were developed.**