

УДК 579.222

Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ*, Т.Л. ГОРДЕЕВА, С.П. СИНЕОКИЙ

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: larbor3@rambler.ru

Сравнение L-лактатдегидрогеназ различного происхождения в клетках дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*

Исследована экспрессия генов *ldh1 Bos taurus*, *ldhA Homo sapiens*, *ldhA Rhizopus oryzae*, *ldh1 Lactobacillus plantarum*, *ldh1 Lactobacillus pentosus*, кодирующих L-лактатдегидрогеназы, в дрожжевых клетках *Schizosaccharomyces pombe* ВКПМ У-3106. Проведены сравнение каталитических характеристик ферментов, кодируемых этими генами, а также оценка уровня синтеза молочной кислоты полученными рекомбинантными штаммами. Показано, что L-лактатдегидрогеназы из *L. plantarum* и *L. pentosus* обладают наибольшей ферментативной активностью (примерно в 2—2,5 раза более высокой, чем ферменты млекопитающих) и перспективны для создания штаммов-продуцентов молочной кислоты на основе дрожжей *S. pombe*.

Ключевые слова: ген *ldh*, L-лактатдегидрогеназа, молочная кислота, *Schizosaccharomyces pombe*.

Молочная кислота широко используется в пищевой промышленности для консервирования и ароматизации и в производстве биodeградируемой пластмассы — полилактата. Другая сфера использования молочной кислоты — получение биodeградируемого растворителя этиллактата, который применяется при производстве электротехники, лаков и красок, текстиля, смазок, клеев и т.д. Предполагается, что нетоксичные эфиры молочной кислоты потенциально могут заменить более 80% растворителей, используемых в мире в настоящее время. В связи с этим актуальной становится задача разработки эффективных способов производства молочной кислоты.

Традиционно для получения молочной кислоты используют микробиологические способы, основанные на культивировании бактериальных штаммов молочнокислых бактерий. Недостатком бактериальных штаммов — продуцентов молочной кислоты является их чувствительность к низким значениям pH и высоким концентрациям конечного продукта, что приводит к замедлению роста культуры, снижению скорости синтеза целевого продукта и, как следствие, преждевременному завершению процесса ферментации.

В связи с этим особый интерес для создания продуцентов молочной кислоты представляет конструирование штаммов микроорганизмов, в мень-

Борщевская Лариса Николаевна, Гордеева Татьяна Леонидовна, Синеокий Сергей Павлович.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ДТГ — дитиотреитол; КЖ — культуральная жидкость; МК — молочная кислота; ОП — оптическая плотность; п. н. — пар нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; LDH — лактатдегидрогеназа; *ldh* — ген LDH; NADH — никотинамидадениндинуклеотид восстановленный.

* Автор для переписки.

шей степени чувствительных к низким значениям pH и высоким концентрациям молочной кислоты.

Перспективным объектом для производства молочной кислоты являются, в частности, дрожжи, многие из которых способны расти и осуществлять брожение в условиях повышенной кислотности [1] и в отличие от бактерий не требуют для роста сложных по составу сред.

Выбор генов, кодирующих лактатдегидрогеназы, которые эффективно работают в дрожжах *Schizosaccharomyces pombe*, и создание с их использованием промышленно-ценных продуцентов молочной кислоты является важной задачей. Повышенный интерес к созданию высокоэффективных продуцентов молочной кислоты на основе *S. pombe* связан не только с достаточно хорошей генетической изученностью этого объекта, но и с тем, что эти дрожжи наиболее устойчивы к низким значениям pH среды и высоким концентрациям молочной кислоты [2]. Данный вид дрожжей также не требует сложных органических сред и удобен для промышленной ферментации. Дрожжи *S. pombe* успешно экспрессируют гены различных лактатдегидрогеназ. Так, по данным работы [3], *S. pombe* экспрессировал ген лактатдегидрогеназы млекопитающих (*Homo sapiens*) и продуцировал молочную кислоту в количестве 88 г/л. В работе [2] были получены дрожжи *S. pombe*, экспрессирующие ген лактатдегидрогеназы из грибов *Rhizopus oryzae* и продуцирующие 58 г/л молочной кислоты за 8 сут.

Гены лактатдегидрогеназ с различной эффективностью экспрессируются в дрожжевых системах. Так, в работе [4] сравнивали эффективность экспрессии четырех различных генов лактатдегидрогеназ (*ldh* из мышечной ткани быка *Bos taurus*, бацилл *Bacillus megaterium*, молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus plantarum*) в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Наилучшие результаты получены с использованием генов *L. plantarum* и *L. casei*, в модельной системе позволившим получить 6150 мг/л и 4160 мг/л молочной кислоты, соответственно, в то время как соответствующий показатель для *ldh* из мышечной ткани быка *B. taurus* составил 801 мг/л, а для бациллярного *ldh* — 1371 мг/л.

В данном исследовании в клетках дрожжей *S. pombe* проанализирована активность пяти L-лактатдегидрогеназ различного происхождения — *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rhizopus oryzae*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus* — с целью подобрать гены, наиболее перспективные для создания штаммов-продуцентов молочной кислоты на основе дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы. Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза были получены из компании «Диам» (Россия), все ферменты для молекулярных работ — от фирмы Fermentas (Литва).

Штаммы и среды. Для стандартных генно-инженерных работ (конструкция плазмид, получение плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tet^r)] (ВКПМ В-9838). Культуру растили при 37° в среде LB, г/л: триптон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 5. Штамм *Schizosaccharomyces pombe* ВКПМ Y-3106 (*leu1 32*) был получен из Американской коллекции типовых культур (ATCC 38399). Культуру дрожжей растили при 30° на среде YPD, г/л: пептон — 20, дрожжевой экстракт — 15 с добавлением 20 г/л глюкозы. Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

Ферментация рекомбинантных штаммов *Schizosaccharomyces pombe*. Штаммы выращивали в микроаэрофильных условиях в течение 72 ч на полной питательной среде YPD следующего состава, г/л: пептон — 10; дрожжевой экстракт — 5; глюкоза — 100. Инкубацию проводили в термостате при 30° без аэрации в объеме питательной среды 5 мл.

Клетки трижды отмывали деионизованной водой и разрушали с помощью стеклянных шариков по методике [4].

Конструирование экспрессионных плазмид. Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, трансформация *E. coli*) проводили в соответствии с методиками, приведенными в [5]. Праймеры, используемые в работе, синтезированы фирмой «Синтол» (Москва) и приведены в табл. 1.

Трансформация дрожжей *S. pombe*. Трансформация плазмидной ДНК клеток *S. pombe* включала следующие этапы:

1. Выращивание в среде YPD до концентрации $(0,5—1,0) \cdot 10^8$ кл/мл;
2. Осаждение клеток центрифугированием, промывание сначала ледяной стерильной водой, а затем ледяным раствором 1 М сорбита;
3. Ресуспендирование в ледяном растворе 1 М сорбита до концентрации $(1—5) \cdot 10^9$ кл/мл;
4. Обработка 25 мМ ДТТ в течение 15 мин, затем промывание 1 М раствором сорбита;
5. Перенос клеточной суспензии (40 мкл) в охлажденную пробирку Эппендорфа, добавление 100 нг ДНК и инкубация во льду в течение 5 мин;

Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность (5'→3')	Назначение
ldhbov-F ldhbov-D	aaagctagcaataatggctactttaaggatcaacttatt gaggcccagggtctcggcgcccta	Клонирование <i>ldh1 B. taurus</i>
ldhsap-F ldhsap-D	aaagctagccaccatggcaactctaaaggatca aaagttaaactaaaattgcagctcctttgga	Клонирование <i>ldhA H. sapiens</i>
ldhrhiz-F ldhrhiz-D	aaaagctagccaccatggctattacactcaagggt aaagttaaactaaacagctacttttagaaaagg	Клонирование <i>ldh1 R. oryzae</i>
ldhpla-F ldhpla-D	aagctagccaccatgtcaagcatgccaaatcatcaaaaag aaagcggccgctaattcagctaaaccgtcgtt	Клонирование <i>ldh1 L. plantarum</i>
ldhpen-F ldhpen-D	aagctagccaccatgtcaagcatgccaaatcatcaaaaag aaagcggccgctaattcagctaaaccgtcgtt	Клонирование <i>ldh1 L. pentosus</i>

6. Пернос смеси клеток и плазмидной ДНК в предварительно охлажденную кювету для электропорации;

7. Электропорация при следующих условиях: 2,5 кВ, 400 Ом, 25µF;

8. Добавление 1 мл ледяного 1 М раствора сорбита;

9. Посев клеток на твердую селективную среду с добавлением генетицина (Invitrogen Corp.).

Изучение ферментативной активности лактатдегидрогеназ. Удельную активность лактатдегидрогеназ определяли с использованием общепринятой методики [4].

Активность ферментов рассчитывали по формуле:

$$X = \Delta E / V \cdot 6,22a, \text{ мкмоль NADH/мин/мг белка,}$$

где ΔE — среднее изменение ОП пробы при длине волны 340 нм за 1 мин; V — конечный объем пробы в кювете (1,4 мл); 6,22 — коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм; a — содержание белка в пробе, определенное в параллельном образце методом Лоури или другим, мг.

Определение концентрации молочной кислоты в КЖ проводили методом ВЭЖХ [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения активности L-лактатдегидрогеназ различного происхождения была разработана модельная система, позволяющая исследовать работу ферментов в клетках дрожжей *S. pombe* в одинаковых условиях. Она основана на клонировании генов, кодирующих различные L-лактат-

дегидрогеназы, в составе автономно реплицируемого экспрессионного вектора для дрожжей *S. pombe* pCMV-loxKm-ARS (рис. 1).

Вектор содержит сильный промотор pCMV, обеспечивающий конститутивную экспрессию генов, а автономно реплицируемый элемент *ARS1* позволяет поддерживать копийность плазмид в клетках *S. pombe* на постоянном уровне (около 15 копий на клетку), что дает возможность сравнить работу генов и кодируемых ими ферментов в одинаковых условиях.

Клонирование *ldh1 Bos taurus* в составе экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS

Для клонирования *ldh1 B. taurus* в экспрессионном векторе pCMV-loxKm-ARS при помощи ПЦР с использованием *Taq*-полимеразы и праймеров ldhbov-F, ldhbov-D (см. табл. 1) был получен фрагмент ДНК, содержащий кодирующую область клонируемого гена.

Матрицей для ПЦР служила синтетическая последовательность ДНК гена *ldh1 B. taurus*. Амплифицированную ДНК размером 1001 п.н. расщепляли эндонуклеазами *NheI* и *NotI* и лигировали с ДНК так же расщепленного экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS. Полученной плазмидой трансформировали *E. coli*. Клоны, содержащие необходимую вставку амплифицированной ДНК размером 1001 п.н., отбирали по устойчивости к ампициллину. Плазмидную ДНК, выделенную из отобранных клонов, идентифицировали с помощью рестрикционного анализа.

Полученная плаزمида размером 6929 п.н. была названа pCMV-loxKm-ARS-bov (рис. 2).

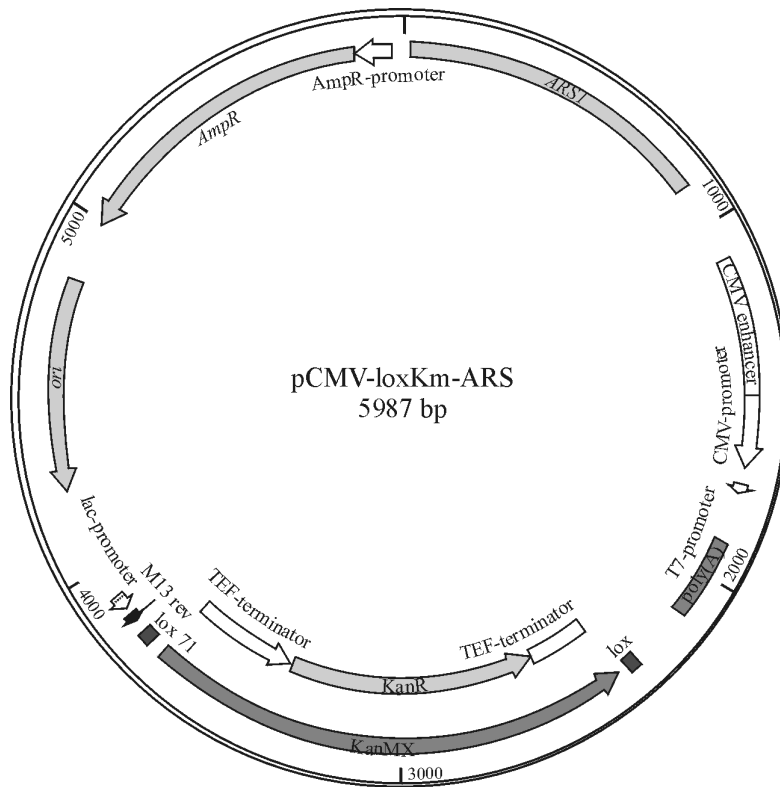


Рис. 1. Физическая карта экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS, включающего следующие элементы: 1 — дрожжевой селективный маркер *kanMX*, кодирующий устойчивость к гентецину, под контролем дрожжевого TEF-промотора; 2 — промотор цитомегаловируса человека CMV; 3 — автономно реплицируемый элемент *ARS1 S. pombe*; 4 — селективный маркер для клеток *E. coli* — ген *AmpR*, кодирующий β-лактамазу и придающий клеткам устойчивость к ампициллину; 5 — бактериальный pUC origin

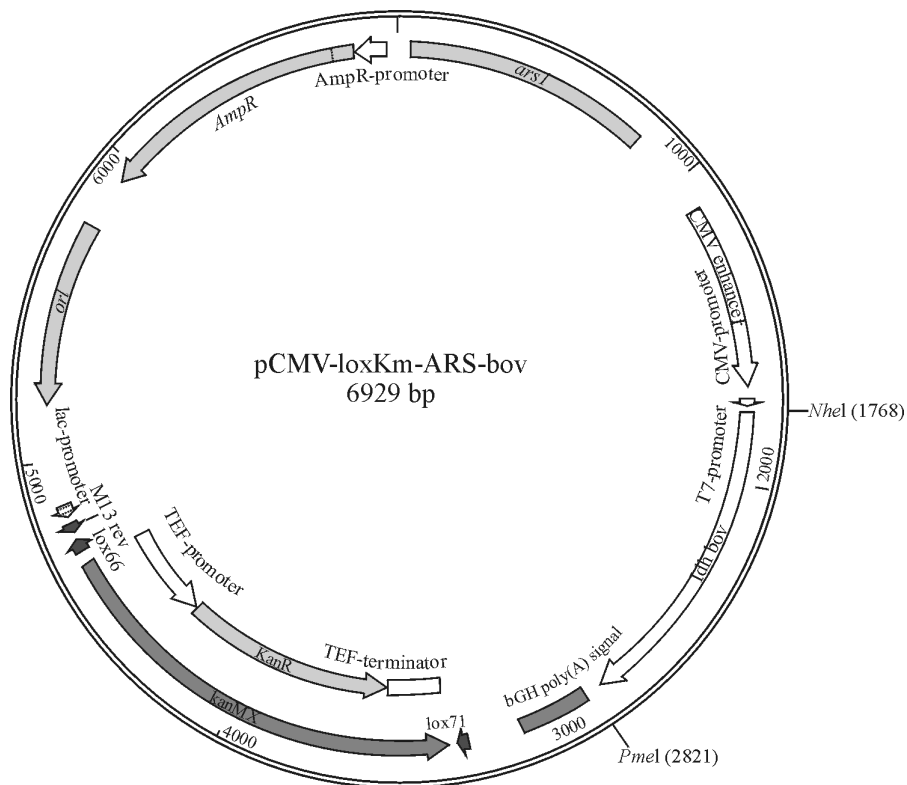


Рис. 2. Физическая карта плазмиды pCMV-loxKm-ARS-bov, содержащей бычий ген *ldh*

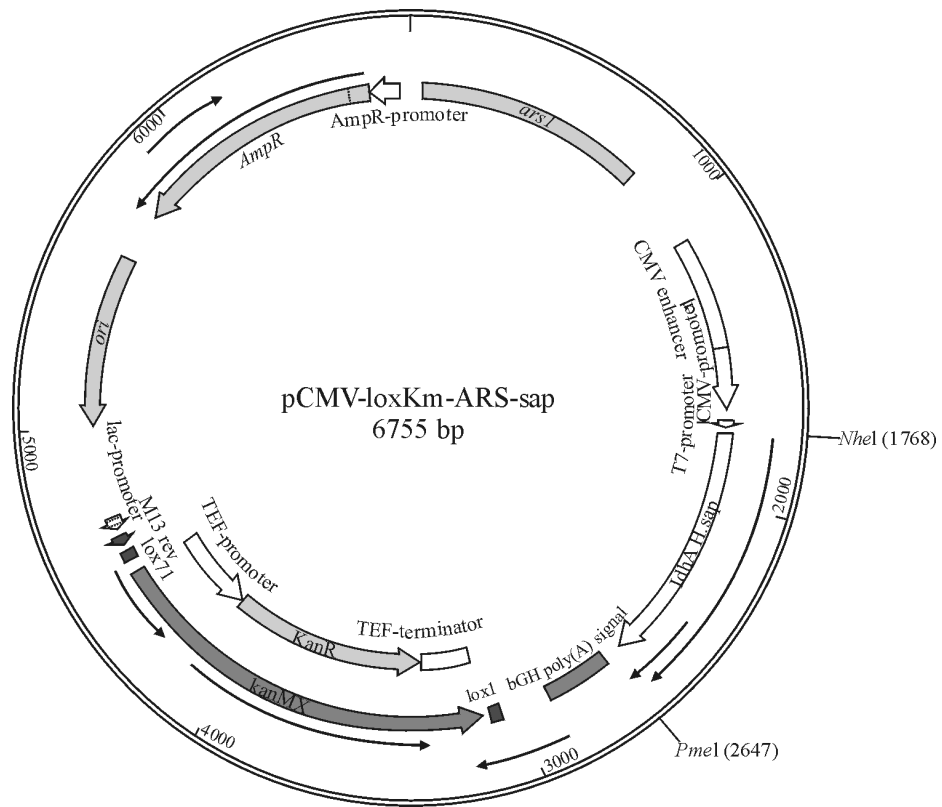


Рис. 3. Физическая карта плазмиды pCMV-loxKm-ARS-sap, содержащей человеческий ген *ldh*

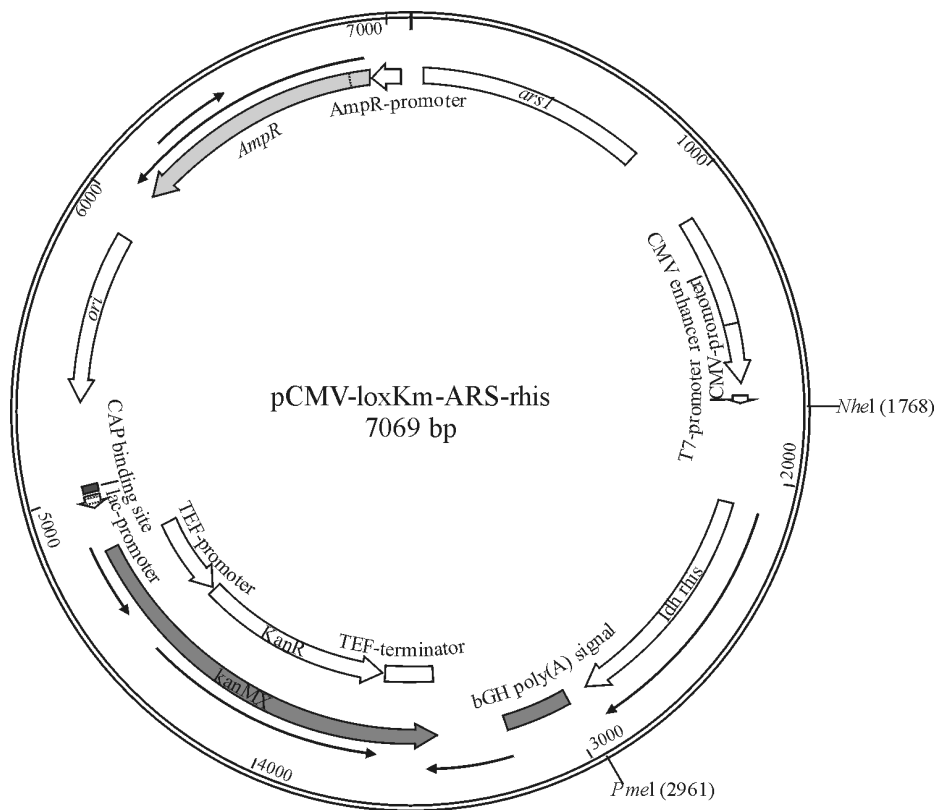


Рис. 4. Физическая карта плазмиды pCMV-loxKm-ARS-rhis, содержащей ген *ldh R. oryzae*

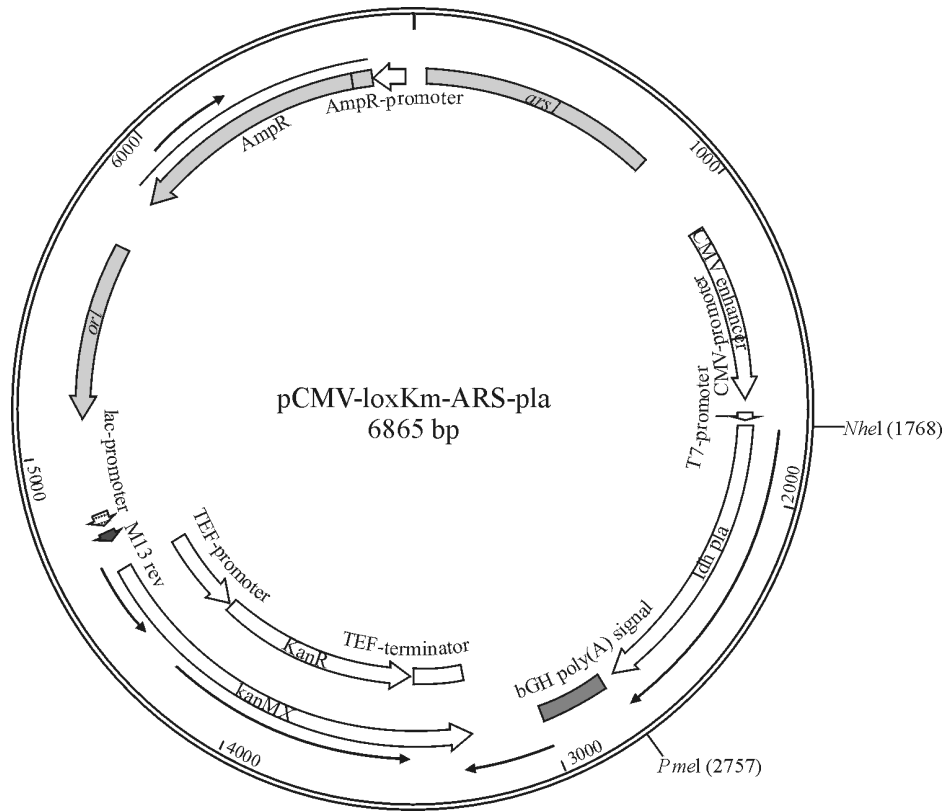


Рис. 5. Физическая карта плазмиды pCMV-loxKm-ARS-pla, содержащая ген *ldh L. plantarum*

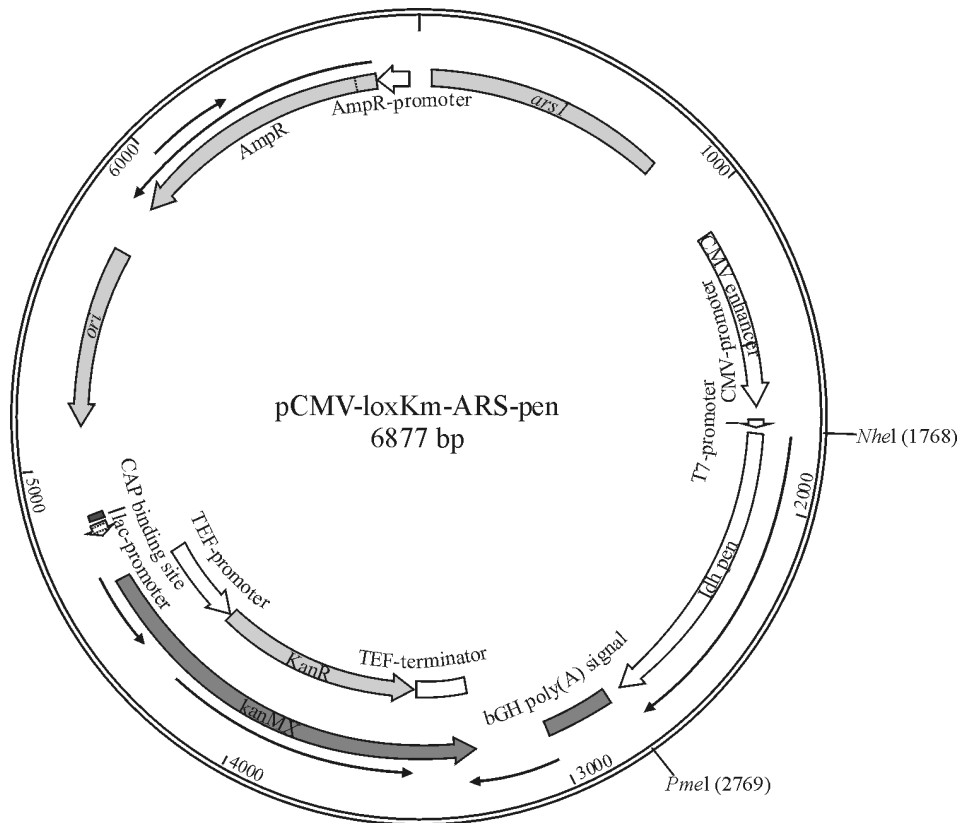


Рис. 6. Физическая карта плазмиды pCMV-loxKm-ARS-pen, содержащей ген *ldh L. pentosus*

Клонирование *ldhA H. sapiens* в составе экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS

Для клонирования *ldhA H. sapiens* в экспрессионном векторе pCMV-loxKm-ARS при помощи ПЦР с использованием *Taq*-полимеразы и праймеров *ldhsap-F*, *ldhsap-D* (см. табл. 1) был получен фрагмент ДНК, содержащий кодирующую область человеческого гена *ldh1*.

Матрицей для ПЦР служила синтетическая последовательность ДНК гена *ldh1 H. sapiens*. Амплифицированную ДНК размером 999 п.н. расщепляли эндонуклеазами *NheI* и *PmeI* и лигировали с ДНК так же обработанного экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli*. Клоны, содержащие необходимую вставку амплифицированной ДНК размером 999 п.н., отбирали по устойчивости к ампициллину. Плазмидную ДНК, выделенную из отобранных клонов, идентифицировали с помощью рестрикционного анализа.

Полученная плазида размером 6755 п.н. была названа pCMV-loxKm-ARS-sap (рис. 3).

Клонирование *ldh1 Rhizopus oryzae* в составе экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS

Для клонирования *ldh1 Rhizopus oryzae* в экспрессионном векторе pCMV-loxKm-ARS при помощи ПЦР с использованием *Taq*-полимеразы и праймеров *ldhrhiz-F*, *ldhrhiz-D* (см. табл. 1) был получен фрагмент ДНК, содержащий кодирующую область клонируемого человеческого гена.

Матрицей для ПЦР служила тотальная геномная ДНК *R. oryzae* ВКПМ F-431. Амплифицированную ДНК размером 960 п.н. расщепляли эндонуклеазами *NheI* и *NotI* и лигировали с ДНК таким же образом обработанного экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli*. Клоны, содержащие необходимую вставку амплифицированной ДНК размером 960 п.н., отбирали по устойчивости к ампициллину. Плазмидную ДНК, выделенную из отобранных клонов, исследовали с использованием рестрикционного анализа.

Полученная плазида размером 7069 п.н. была названа pCMV-loxKm-ARS-rhiz (рис. 4).

Клонирование *ldh1 Lactobacillus plantarum* в составе экспрессионного вектора pCMV-loxKm-ARS

Для клонирования *ldh1 L. plantarum* в экспрессионном векторе pCMV-loxKm-ARS при по-

мощи ПЦР с использованием *Taq*-полимеразы и праймеров *ldhpla-F*, *ldhpla-D* (см. табл. 1) был получен фрагмент ДНК, содержащий кодирующую область клонируемого гена.

Матрицей для ПЦР служила тотальная геномная ДНК *L. plantarum* ВКПМ В-7636. Амплифицированную ДНК размером 994 п.н. расщепляли эндонуклеазами *NheI* и *PmeI* и лигировали с ДНК экспрессионного вектора pCMV-Km-ARS, обработанного тем же способом. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli*. Клоны, содержащие необходимую вставку амплифицированной ДНК размером 994 п.н., отбирали по устойчивости к ампициллину. Плазмидную ДНК, выделенную из отобранных клонов, подвергали рестрикционному анализу.

Полученная плазида размером 6865 п.н. была названа pCMV-loxKm-ARS-pla (рис. 5).

Клонирование *ldh1 Lactobacillus pentosus* в составе экспрессионного вектора pCMV-Km-ARS

Для клонирования *ldh1 Lactobacillus pentosus* в экспрессионном векторе pCMV-Km-ARS при помощи ПЦР с использованием *Taq*-полимеразы и праймеров *ldhpen-F*, *ldhpen-D* (см. табл. 1) был получен фрагмент ДНК, содержащий кодирующую область клонируемого гена.

Матрицей для ПЦР служила тотальная геномная ДНК *L. pentosus* ВКПМ В-7667. Амплифицированную ДНК размером 963 п.н. расщепляли эндонуклеазами *NheI* и *PmeI* и лигировали с ДНК так же обработанного экспрессионного вектора pCMV-Km-ARS. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli*. Клоны, содержащие необходимую вставку амплифицированной ДНК размером 963 п.н., отбирали по устойчивости к ампициллину. Плазмидную ДНК, выделенную из отобранных клонов, исследовали с помощью рестрикционного анализа.

Полученная плазида размером 6877 п.н. была названа pCMV-loxKm-ARS-pen (рис. 6).

Трансформация репликативными плазмидами

Экспрессионные репликативные плазмиды, содержащие гены, кодирующие L-лактатдегидрогеназу, были перенесены путем трансформации в клетки штамма *S. pombe* Y-3106.

Наличие плазмид в полученных штаммах подтверждали методом ПЦР с использованием

проверочных праймеров (см. табл. 1) к генам соответствующих лактатдегидрогеназ (рис. 7).

Наличие ПЦР-фрагментов ожидаемого размера (960 п.н. в случае *ldh Rhizopus oryzae*; 999 п.н. — *H. sapiens*; 994 п.н. — *L. plantarum*; 963 п.н. — *L. pentosus*; 1001 п.н. — *B. taurus*) подтверждает присутствие плазмид и соответствующих генов *ldh* в полученных штаммах.

Эти штаммы использовали для последующего изучения каталитической активности L-лактатдегидрогеназ.

Каталитическая активность

L-лактатдегидрогеназ в клетках *S. pombe*

Штаммы, содержащие экспрессионные репликативные плазмиды с клонированными генами *ldh* различного происхождения, выращивали в микроаэрофильных условиях на полной питательной среде с добавлением генетицина и 2% глюкозы в течение 48 ч. Затем клетки отмывали, разрушали и клеточные экстракты, содержащие L-лактатдегидрогеназы, использовали для исследования их активности.

Исследовали скорость прямой (пируват → лактат) и обратной (лактат → пируват) реакций, катализируемых LDH. Кинетические характеристики реакций оценивали по величине изменения среднего значения ОП пробы (ΔE). Расчет активности ферментов проводили с использованием формулы, приведенной в разделе «Условия эксперимента». Результаты представлены на рис. 8.

Исследования показали, что наибольшая скорость реакции по направлению от пирувата к лактату наблюдается у лактатдегидрогеназ из *L. plantarum* и *L. pentosus*, тогда как у других изученных ферментов скорость этой реакции была заметно ниже. Именно скорость реакции образования лактата является наиболее существенным показателем при выборе гена, на основе которого предполагается конструирование штамма-производителя молочной кислоты.

Сравнительный анализ продуктивности штаммов

Был проведен сравнительный анализ продуктивности штаммов, содержащих экспрессионные репликативные плазмиды с клонированными генами *ldh* различного происхождения. Клетки рекомбинантных штаммов выращивали в микроаэрофильных условиях в течение 72 ч на полной питательной среде с добавлением 10% глюкозы.

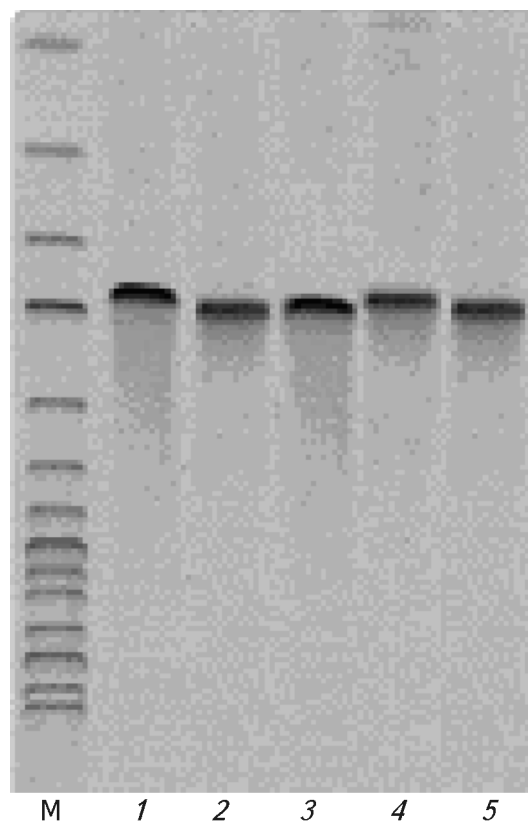


Рис. 7. Результаты ПЦР-анализа исследуемых штаммов *S. pombe* Y-3106, несущих гены *ldh* различных организмов, с помощью проверочных праймеров к этим генам: дорожки 1–5 — *R. oryzae* (1); *H. sapiens* (2); *L. plantarum* (3); *L. pentosus* (4); *ldh B.taurus* (5); М — маркер ДНК (O⁺GeneRuler 1 kb DNA Ladder; сверху вниз 250 п.н., 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п.н.)

Методом ВЭЖХ исследовали содержание молочной кислоты в образцах КЖ (табл. 2).

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что наибольшая продукция молочной кислоты наблюдается при экспрессии генов, кодирующих L-лактатдегидрогеназы из *L. plantarum* и *L. pentosus*.

Таким образом, данные по продуктивности штаммов в отношении дегидрогеназ полностью согласуются с данными об активности ферментов.

Известно, что гены, кодирующие лактатдегидрогеназы различного происхождения, с разной эффективностью экспрессируются в дрожжевых системах при различном уровне активности кодируемых ими ферментов или даже полном ее отсутствии [7]. Так, гены лактатдегидрогеназы грибов успешно экспрессируются в дрожжевой системе, так как значение рН-оптимума действия этого фермента равно 6,0, а внутриклеточное значение рН дрожжей остается практически нейтральным при росте на глюкозе даже при очень низких значениях внешнего рН. В бактериальной клетке при низ-

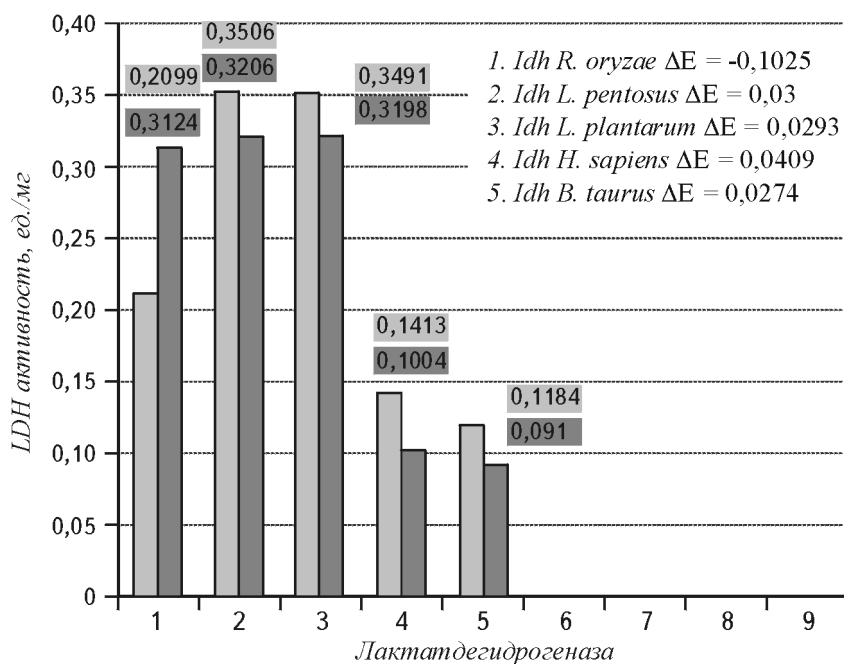


Рис. 8. Сравнение активности лактатдегидрогеназ (светлый прямоугольник — пируват→лактат, темный прямоугольник — лактат→пируват) из различных источников в клетках дрожжей *S. pombe*: 1 — *R. oryzae*; 2 — *L. pentosus*; 3 — *L. plantarum*; 4 — *H. sapiens*; 5 — *B. taurus*

ких значениях pH среды внутриклеточное значение pH падает до 5,0. Бактериальные LDH всегда имеют более низкий pH-оптимум, чем эукариотические, однако в отличие от грибных лактатдегидрогеназ обладают высокой удельной активностью [8] и поэтому в дрожжах работают более эффективно.

В данной работе в одинаковой экспрессионной системе дрожжей *S. pombe* были изучены L-лактатдегидрогеназы различного происхождения: грибная — из *Rhizopus oryzae*, млекопитающих — из *Bos taurus* и *Homo sapiens*, и из молочнокислых бактерий — *L. plantarum* и *L. pentosus*.

Исследования показали, что гены *ldh* из молочнокислых бактерий *L. plantarum* и *L. pentosus* эффективно экспрессируются в клетках *S. pombe*, а кодируемые ими ферменты обладают наибольшей удельной активностью, что обеспечивает самую высокую продукцию штаммами молочной кислоты среды всех изученных штаммов.

Таким образом, гены *ldh* *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus pentosus* могут быть использованы для создания штаммов-продуцентов молочной кислоты на основе дрожжей *S. pombe*.

Таблица 2

Производство молочной кислоты рекомбинантными штаммами

Штамм	Происхождение L-лактатдегидрогеназы	Концентрация молочной кислоты в КЖ, г/л
<i>S. pombe</i> Y-3106/ pCMV-loxKm-ARS-bov	<i>B. taurus</i>	2
<i>S. pombe</i> Y-3106/ pCMV-loxKm-ARS-sap	<i>H. sapiens</i>	7
<i>S. pombe</i> Y-3106/ pCMV-loxKm-ARS-rhiz	<i>R. oryzae</i>	3
<i>S. pombe</i> Y-3106/ pCMV-loxKm-ARS-pla	<i>L. plantarum</i>	18
<i>S. pombe</i> Y-3106/ pCMV-loxKm-ARS-pen	<i>L. pentosus</i>	17

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57914X0013) с использованием уникальной научной установки (УНУ) — Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (уникальный идентификатор проекта — RFMEFI59-214X0002).

Получено 18.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. — 221 с.
2. Синеокий С.П., Вустин М.М., Юзбашев Т.В., Рыбаков Ю.А., Райнина Е.И., Токарева Н.Г., Великая М.А., Агранович А.М., Дебабов В.Г. Способ микробиологического синтеза молочной кислоты и рекомбинантный штамм дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* для его осуществления // Патент RU2268304, C12P7/56. 2004
3. Futoshi, H., Hideki, T., Yuko, H., Chihiro, H. Transformant and Process for Production Thereof, and Process for Production of Lactic Acid // Patent US20120214214, C 12N 1/19. 2012.
4. Branduardi, P. Lactate production yield from engineered yeasts is dependent from the host background, the lactate dehydrogenase source and the lactate export / P. Branduardi., M. Sauer, L. De Gioia, G. Zampella, M. Valli, D. Mattanovich, D. Porro // Microb. Cell Fact. — 2006. — V. 5. — N 4. — P. 1—12.
5. Ramon, A.M. A novel cell wall protein specific to the mycelial form of *Yarrowia lipolytica* / A.M. Ramon, R. Gil, M. Burgal, R. Sentandreu, E. Valentin // Yeast. — 1996. — V. 12. — P. 1535—1548.
6. Gey, M. Characterization of biotechnological processes and products using high-performance liquid chromatography (HPLC). VI. Determination of lactic acid and short-chain carboxylic acids C₁—C₅ / M. Gey, P. Klossek, U. Becker // Acta Biotechnol. — 1990. — V. 5. — P. 459—468.
7. Shuichiro, K., Futoshi, H. Transformant and method for producing same, and method for producing lactic acid // Patent US201514627967, C12N15/81. 2015.
8. Garvie, E.I. Bacterial Lactate Dehydrogenases // Microbiol. Rev. — 1980. — V. 44. — N. 1. — P. 106—139.

L.N. BORSHCHEVSKAYA*, T.L. GORDEEVA,
and S.P. SINEOKY

The Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIgenetika), 117545, Moscow Russia

e-mail: larbor3@rambler.ru

Comparison of L-Lactate Dehydrogenases of Different Origins in *Schizosaccharomyces pombe* Yeast

The expression in the *Schizosaccharomyces pombe* yeast VKPM Y-3106 of the *ldh1* genes from *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rhizopus oryzae*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus pentosus* that encode L-lactate dehydrogenases has been investigated. The catalytic characteristics of the enzymes encoded by those genes were compared, and the level of the synthesis of lactic acid by the recombinant strains was assessed. It was shown that L-lactate dehydrogenases from *L. plantarum* and *L. pentosus* have the highest enzymatic activity (by about 2—2.5 times higher than the mammalian enzymes) and they are promising in the construction of the producing strains of lactic acid from the *S. pombe* yeast.

Key words: lactic acid, L-lactate dehydrogenase, *ldh* gene, *Schizosaccharomyces pombe*.

* Author for correspondence.