

УДК 577.158.7

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИСОМАЛЬНОЙ КАТАЛАЗЫ ИЗ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Hansenula polymorpha*

© 2013 г. Я.-С. Тянь, Х. Сюй, Дж. Сюй, Р.-Х. Пенг, К.-Х. Яо

Биотехнологический научно-исследовательский институт, главная лаборатория сельскохозяйственной генетики и селекции Академии сельскохозяйственных наук, Шанхай, 201106, Китай

e-mail: yaoquanhong_sh@yahoo.com.cn

Поступила в редакцию 24.09.2012 г.

Каталаза расщепляет H_2O_2 в клетках и снижает токсичность перекисных соединений. Ген каталазы *HpCAT1* из метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* за исключением части, кодирующей сигнальный пептид, был клонирован в экспрессирующий вектор рУМ3165 и методом электропорации встроен в геном *Pichia pastoris* GS115. В результате анализа активности фермента и электрофореза в ПААГ с Na-ДДС было показано, что рекомбинантный белок (*HpCAT1*) из *H. polymorpha* экспрессировался в *P. pastoris*. Внеклеточную каталазу *P. pastoris* GS115 выделяли из супернатанта культуры, осаждали высаливанием $(NH_4)_2SO_4$ и проводили аффинную хроматографию на Ni-NTA. Исследованы основные биохимические свойства рекомбинантного белка *HpCAT1*, температурный и pH-оптимумы, термостабильность, pH-стабильность, а также чувствительность к ионам металлов и химическим веществам. При использовании H_2O_2 в качестве субстрата *HpCAT1* оптимальные значения pH и температуры были ~2.6 и 45°C, соответственно. Активность рекомбинантного белка ингибировалась в присутствии 1.0 мМ Hg^{2+} и Cu^{2+} и возрастала в присутствии 1 мМ Fe^{2+} .

DOI: 10.7868/S0555109913050140

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – один из самых распространенных антиоксидантных ферментов, катализирующих расщепление H_2O_2 на воду и кислород, препятствующих образованию высокотоксичных соединений ^-OH и O_2^- – побочных продукты метаболизма кислорода [1]. Активность каталазы обнаруживается почти у всех видов аэробных и анаэробных организмов. В дополнение к своей биологической функции, каталазы находят применение в фармацевтической [2], пищевой, текстильной и целлюлознобумажной промышленности, а также используются при биоремедиации окружающей среды [3–5]. Возможность биологического и промышленного использования этого фермента привлекает внимание к этому ферменту как биохимиков, так и молекулярных биологов. Были выделены и исследованы многие гены, кодирующие каталазу у животных [6], растений [7] и микроорганизмов [8]. Совсем недавно, необычные биохимические свойства, которые могут быть использованы, привлекли внимание исследователей к изучению каталазы из микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях, например при высоких или низких температурах [9, 10], в окисляющих условиях [11, 12], при высокой концентрации солей [13, 14], радиоактивности [15] или в щелочных/кислотных средах обитания [16, 17].

Проведенные исследования показали, что мутанты термостойких метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с отсутствующей пероксисомальной каталазой (*HpCAT1*), не растут в условиях, когда метанол является единственным источником углерода и энергии [18], то есть этот белок индуцируется при выращивании *H. polymorpha* на метаноле и он необходим для метаболизма субстрата.

Впервые каталаза была выделена из внеклеточного экстракта *H. polymorpha* в 1975 г. Однако тогда были исследованы только пероксидазные свойства этого белка [19]. Полная процедура очистки нативного *HpCAT1* и его свойства были исследованы в 1991 г. в работе [20]. В 1992 г. *HpCAT1* ген был клонирован, выявлена сигнальная последовательность этого фермента [21]. Локализация каталазы в клетках была изучена в том же году [22]. Тем не менее, низкий выход при очистке гомогенного белка *HpCAT1* и его нестабильность препятствовали дальнейшему анализу фермента и применению его в промышленности [20]. Наше исследование каталазы *H. polymorpha* – первый шаг к получению гетерологичной рекомбинантной каталазы, которую можно использовать в некоторых отраслях промышленности.

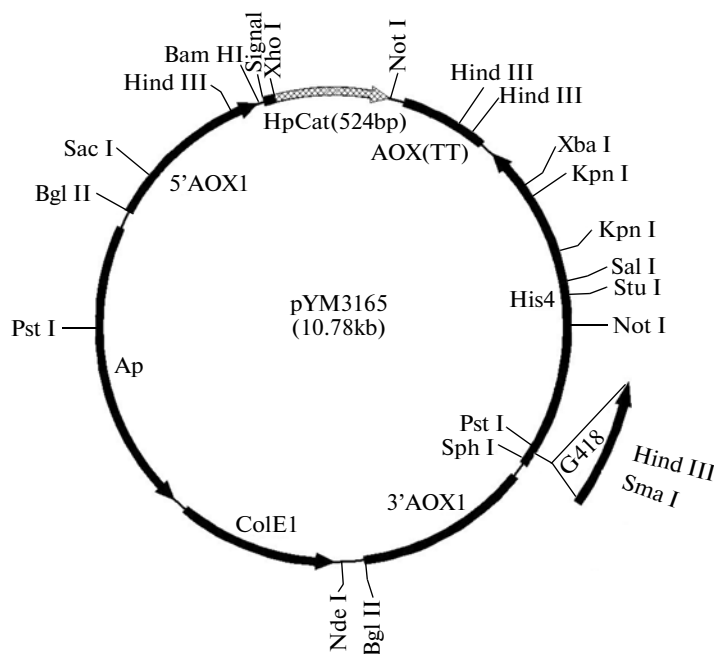


Рис. 1. Схема вектора pYM3165 для экспрессии каталазы в *P. pastoris* GS115.

Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, способные расти в условиях, когда метанол является единственным источником углерода, могут быть использованы в качестве весьма успешной системы для экспрессии гетерогенных рекомбинантных белков [23, 24]. Открытые рамки считывания белка находятся под контролем промотора алкоголь оксидазы, и, таким образом, высокие внутриклеточные концентрации белка можно индуцировать добавлением метанола к *P. pastoris* [25, 26]. Кроме того эта гетерогенная система экспрессии позволяет проводить генетические манипуляции с геном каталазы.

В настоящее время подробных энзимологических исследований рекомбинантного белка HpCAT1 не проводилось, в отличие от хорошо изученного нативного белка HpCAT1.

Цель работы – сравнение биохимических свойств нативной и рекомбинантной каталазы из *H. polymorpha*. Ген каталазы *HpCAT1* был клонирован и лигирован в экспрессирующий вектор с высокой степенью секрецией *P. pastoris* GS115. Рекомбинантный белок был экспрессирован в форме His-tag белка.

МЕТОДИКА

Микробные штаммы, плазмиды и реагенты. Бактериальный штамм *Escherichia coli* JM109, использованный для создания вектора, получен у “Promega” (США). Штамм *H. polymorpha* с высокой каталазной активностью ATCC № 26012 хра-

нился в Центральной лаборатории Биотехнологического научно-исследовательский института (Шанхай). Вектор клонирования pGEM-T, Pfu Taq ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы T4, и рестриктазы приобретены в “TaKaLa” (Китай). Штамм *P. pastoris* GS115 (*his4*) и плаزمида pPIC9K получены на фирме “Invitrogen” (США). Кассета G418 была заказана у фирмы “Sigma” (США). Все остальные реагенты были аналитической чистоты.

ПЦР-амплификация и секвенирование гена каталазы. Используя геномную ДНК *H. polymorpha* в качестве матрицы, 2 внешних праймера (праймер 1: 5'CTCGAGAAAAGATCCAACCCACCTGTTTTCAC TAC3 и праймер 2: 5'AGCGGCCGCTTAGATCT-TGGATGGAGAAGAAGCCTTTCTCTTAA-GCT-CCTG3') были сконструированы таким образом, чтобы скопировать полный ген каталазы (GenBank номер: X56501.1) без последовательности, кодирующей сигнальный пептид. Сайты рестрикции *Xho* I and *Not* были включены в праймеры 1 и 2 соответственно. 6*His-tag – модификация была включена в С-конец каталазы. ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси с использованием *Pfu*-полимеразы при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 95°C, затем 30 циклов: 30 с при 95°C, 60 с при 54°C, и 1 мин при 72°C, а затем заключительная элонгация в течение 10 мин при 72°C. Амплифицированный продукт был клонирован в вектор pGEM-T и проверен с помощью секвенирования ДНК.

Конструкция вектора, трансформация и скрининг. Экспрессионный вектор рУМ3165 был сконструирован в *P. pastoris* GS115 (рис. 1) введением гена каталазы в модифицированную плазмиду рPIC9K, в которой сайт рестрикции *Xho* I в касете G418 был удален с помощью сайт-направленного мутагенеза. Плазида рУМ3165 (2 мкг) была линейаризована расщеплением с помощью *Sal* I и затем трансформирована в компетентные клетки *P. pastoris* методом электропорации с использованием “Bio-Rad genepulser” (США) при 1750 Вт в кювете 0.2 см. Сразу после электропорации в кювету был добавлен 1.0 мл раствора ледяного 1.0 М сорбитола. Клетки высевали в чашки с селективной средой, содержащей 1.34% азотно-дрожжевой агара (YNB) без аминокислот (0.8 М сорбитол, 5% глюкозы и 2% агара). Клетки инкубировали при 28°C в течение 3 сут. Трансформанты, которые выросли на чашках были перенесены и рассеяны штрихами на чашках со средой MM (%: YNB – 1.34, биотин – 0.000004, глюкоза – 2.0, агар – 2.0) и средой MD (%: YNB – 1.34, биотин – 0.000004, метанол – 0.5, агар – 2.0). После инкубации при 28°C в течение 2 сут, были отобраны колонии, которые выросли на среде MD, но полностью отсутствовали на среде MM.

Экспрессия и выделение белка. Один из отобранных клонов инкубировали в среде VMGY, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1.0, пептон – 2.0, YNB – 1.34, биотин – 0.000004, глицерин – 1.0; при 28°C в течение 48 ч при постоянном встряхивании (220 об./мин). Затем клетки отделяли центрифугированием при 3000 g 3 мин, два раза промывали стерильной водой и ресуспендировали в среде, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1.0, пептон – 2.0, YNB – 1.34, биотин – 0.000004, метанол – 0.5 (ВММУ) и инкубировали в течение 3 сут при 28°C для биосинтеза каталазы. В супернатант (1.0 л) культуры добавляли сульфат аммония до 80% насыщения для осаждения рекомбинантного белка. Полученный осадок ресуспендировали в 15 мл среды ВММУ, приготовленной без добавления 0.5% метанола, и обессоливали на колонке с сефадексом G-15. Колонка Ni-NTA для аффинной хроматографии из комплекта HisTrap HP (“Amersham Biosciences”, США) была перед экспериментом промыта 5 мл дистиллированной воды, затем через колонку пропускали 5 мл буфера для нанесения (20 mM фосфатный буфер, 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, pH 7.4–7.6). После этого через колонку было пропущено 5 мл буфера для промывания (20 mM фосфатный буфера, 500 mM NaCl и 500 mM имидазол, pH 7.4–7.6) и колонку уравнивали 5 мл буфера для нанесения. Раствор фермента (15 мл) наносили на колонку с помощью шприца, промывали буфером для связыва-

ния (10 мл), после чего белок смывали буфером для элюирования (4 мл) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные после элюирования фракции собирали и тестировали методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС.

Анализ белка и степени гликозилирования. Белки из экстракта *P. pastoris* анализировали методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС с использованием 12%-ного разделяющего геля в системе mini-protein гель-электрофореза (“Bio-Rad”, США). Разделенные полосы белка окрашивали 0.2%-ным раствором кумасси бриллиантовым синим R-250.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд с использованием бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочной кривой [27]. Дегликозилирование рекомбинантной каталазы было проведено с использованием комплекта N-glycosidase F Deglycosylation Kit (“Roche”, Германия) в соответствии с инструкцией изготовителя. После проведения дегликозилирования полученную каталазу анализировали методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС.

Определение активности каталазы. Активность каталазы измеряли спектрофотометрически, регистрируя снижение OD₂₄₀, в результате расщепления H₂O₂ на спектрофотометре Tecan i-control (Швейцария). Коэффициент экстинкции ε для H₂O₂ при 240 нм был принят 43.6 M⁻¹ cm⁻¹. Реакционная смесь для стандартного анализа содержала 1.98 mM H₂O₂ в фосфатно-цитратном буфере МакИльвана (100 mM лимонная кислота, Na₂HPO₄, pH 2.6). Анализируемые смеси инкубировали при 30°C в течение 10 мин после инициации реакции добавлением 50 мкл очищенного фермента. За единицу активности фермента принимали количество мкмоль H₂O₂, превращенных за 1 мин.

Исследование свойств рекомбинантного белка. Влияние температуры и pH на активность фермента, термостабильность, pH-стабильность, влияние H₂O₂, а также ионов металлов и других химических веществ на активность каталазы определяли по методике, описанной ранее [30] с небольшими модификациями.

Оптимальную для проявления активности температуру исследовали в интервале 30–80°C с шагом 5°C. Исследование термостабильности было проведено путем инкубации аликвот фермента в фосфатно-цитратном буфере (pH 2.6) при 40, 50 и 60°C. Пробы фермента отбирали в разное время, активность фермента определяли в реакции с H₂O₂ по методике, описанной выше. Влияние pH на активность каталазы исследовали в фосфатно-цитратном буфере в диапазоне pH от 2.2 до 3.4. pH-ста-

Очистка секретируемой рекомбинантной каталазы *P. pastoris* GS115

Стадия очистки	Объем, мл	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг	Выход, %	Степень очистки
Супернатант	1000	255.81	102508	401	100	1.0
Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄	15	0.93	6108	6568	6.0	16.4
Ni-NTA аффинная хроматография	4	0.22	5343	24287	5.2	60.6

бильность фермента определяли, регистрируя расщепление H₂O₂ в буферном растворе (при pH 2.6) после предварительной инкубации исследуемой аликвоты каталазы при различных pH и 4°C в течение 24 ч.

Влияние ионов металлов. Фермент выдерживали в 50 mM ЭДТА в течение 30 мин при 4°C перед нанесением на колонку с сефадексом G-15. Фермент, элюированный с колонки, тестировали в буфере (pH 2.6), содержащем 1.98 mM H₂O₂ в присутствии или отсутствии ионов металлов (CrCl₃, MnSO₄, FeSO₄, CaCl₂, Pb(NO₃)₂, MgSO₄, HgCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, Cd(NO₃)₂, FeCl₃, CoCl₃, AlCl₃, и KCl) в концентрации 1.0 mM.

Воздействие химических веществ на фермент исследовали, используя H₂O₂ как субстрат в буфере, в состав которого входили исследуемые химические реагенты. Так, например, использовали буфер с содержанием 1.0 mM органических растворителей (95% этанол-хлороформ в соотношении 5 : 3), 0.01 mM NH₂OH, 0.01 mM NaN₃, или 0.01 mM KCN, 10% Na-ДДС или 10 mM ЭДТА. Соответствующие константы Михаэлиса-Ментен для H₂O₂ были определены методом Лайнувера-Берка. Скорость реакции измеряли в буферном растворе (pH 2.6) при 45°C в течение 10 мин с использованием диапазонов концентрации субстрата 0–0.7 mM с 6 повторностями для каждого измерения. Все эксперименты ставились в 6 повторностях, для каждого рассчитывали стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование гена каталазы и конструкция экспрессирующего вектора. Часть ДНК, соответствующая гену *HpCAT1* без части последовательности, соответствующей сигнальному пептиду, была амплифицирована с помощью ПЦР и клонирована в вектор pGEM-T. Три колонии, содержащие рекомбинантную ДНК, были выбраны случайным

образом и проведено секвенирование их ДНК. ДНК с выверенной последовательностью лигировали в реконструированный экспрессионный вектор (рис. 1), в котором сайт *Xho* I в кассете G418 был удален с помощью сайт-направленного мутагенеза после проведения рестрикции по сайтам *Xho* I и *Not* I. Последовательность сигнального пептида *HpCAT1* была клонирована в этот же вектор так, чтобы последовательность находилась под контролем промотора AOX1.

Экспрессия и очистка каталазы. После секвенирования ДНК рекомбинантный вектор был обозначен как pYM3165 и был трансформирован в штамм *P. pastoris* GS115 методом электропорации. После 3-суточного выращивания было получено около 500 клонов, из которых несколько было отобрано для индукции каталазы. Присутствие *HpCAT1* последовательности в геномной ДНК, выделенной из трансформантов *P. pastoris*, было подтверждено с помощью ПЦР. Супернатант культуры одного из клонов обладал высокой каталазной активностью. Этот клон был выбран для дальнейших исследований. Стадии очистки ре-

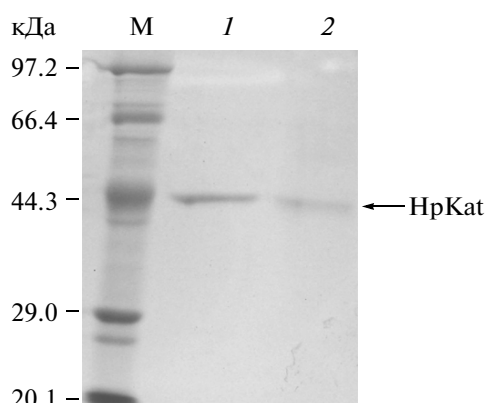


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС рекомбинантной каталазы, выделенной *P. pastoris* GS115. М – молекулярные маркеры; 1 – очищенная каталаза; 2 – дегликозилированная каталаза.

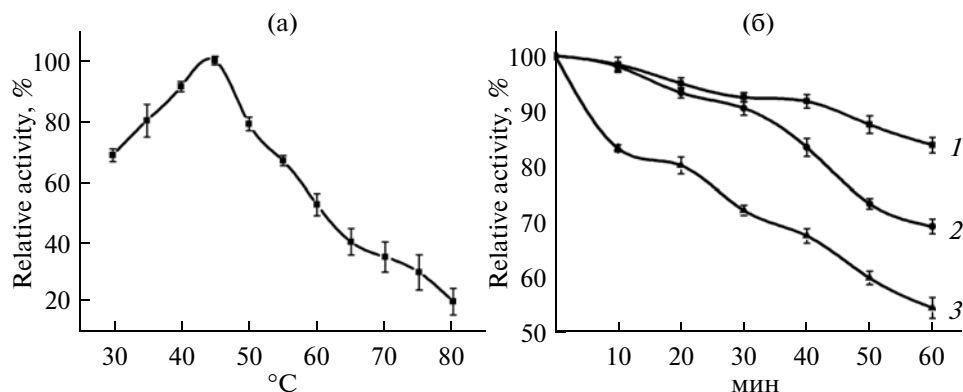


Рис. 3. Влияние температуры на активность рекомбинантной каталазы *P. pastoris* GS115. а – температурный оптимум, б – термостабильность. 1 – 40°C, 2 – 50°C, 3 – 60°C. Здесь и на рис. 4–6 значение активности представлено средними значениями 6 отдельных измерений со стандартным отклонением.

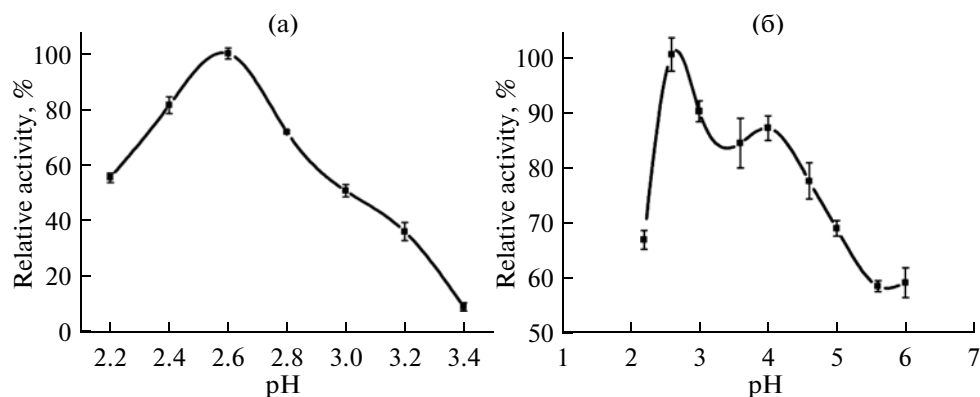


Рис. 4. Влияние pH на активность рекомбинантной каталазы *P. pastoris* GS115. а – pH-оптимум, б – pH-стабильность.

комбинантной каталазы из супернатанта культуры *P. pastoris* GS115 приведены в таблице. Рекомбинантный белок осаждали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, полученный осадок обессоливали на колонке с сефадексом G-15, после чего активные фракции наносили на колонку Ni-NTA для проведения аффинной хроматографии. Результат очистки – 60-кратная очистка препарата каталазы, выход составил 5.2%. Очищенный фермент обладал высокой удельной активностью около 25000 ед./мг при использовании H_2O_2 в качестве субстрата. Молекулярная масса негликозилированной каталазы HpCAT1 была определена с помощью ПААГ с Na-ДДС, окрашивание проводили кумасси бриллиантовом синим R-250. Молекулярная масса каталазы составила ~46 кДа. После обработки фермента эндогликозидазой Н в геле (рис. 2, вторая дорожка) была обнаружена полоса, соответствующая белку меньшего размера (45 кДа), что позволяет отнести HpCAT1 к гликопротеинам с 3.7% гликозилирова-

ния. Согласно анализу сервера NetNGlyc 1.0 каталаза имеет 1 N-гликозилированный сайт в последовательности (позиция Asn95). Этот расчет подтвердился, однако степень гликозилирования HpCAT1 оказалась незначительной.

Термочувствительность и термостабильность рекомбинантной каталазы. Были исследованы биохимические свойства очищенной каталазы. Активность каталазы была максимальной при 45°C (рис. 3а), фермент, нагретый до температуры 40°C сохранял в течение 1 ч ~90% своей активности. При повышении температуры до 60°C сохранялось более 50% активности фермента (рис. 3б).

Влияние pH на активность и стабильности рекомбинантной каталазы. Зависимость активности каталазы от pH была изучена в широком диапазоне pH от 2.2 до 10.2 (данные не представлены). Остаточная активность наблюдалась в узком диапазоне pH от 2.2 до 3.4 (рис. 4а) и не обнаруживалась при pH выше 4.0. После инкубации фермен-

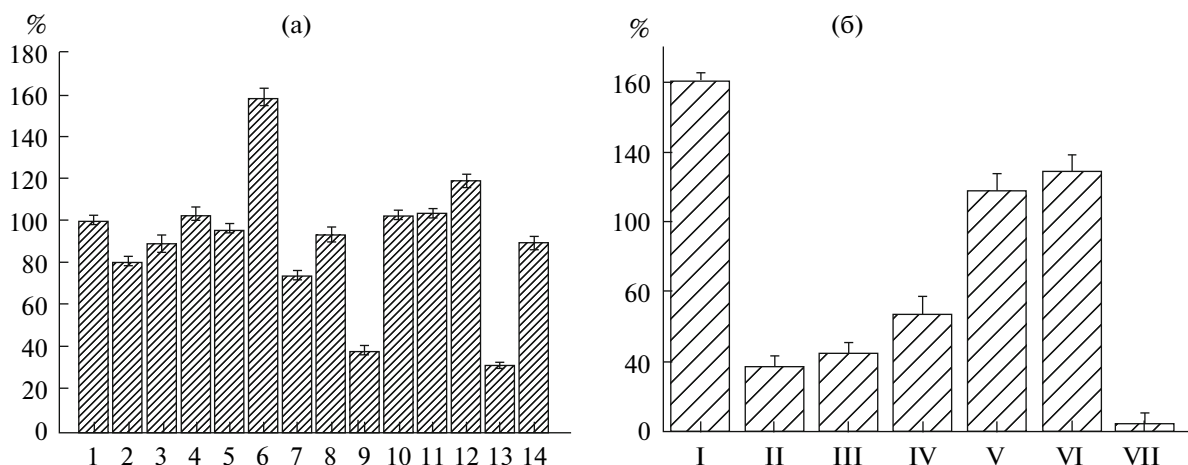


Рис. 5. Действие ионов металлов (а) и других веществ (б) на активность каталазы *P. pastoris* GS115. 1 – контроль, 2 – Cd²⁺, 3 – Cr²⁺, 4 – Ca²⁺, 5 – Zn²⁺, 6 – Fe²⁺, 7 – Fe³⁺, 8 – Mg²⁺, 9 – Hg²⁺, 10 – Al³⁺, 11 – Mn²⁺, 12 – Pb²⁺, 13 – Cu²⁺, 14 – K⁺, I – контроль; II – EDTA; III – 10% Na-ДДС; IV – органические растворители, V – NH₂OH; VI – NaN₃, VII – KCN.

та в буферном растворе при различных рН в диапазоне от 2.2 до 10.2 при 4°С в течение 24 ч наблюдалась его значительная инактивация в щелочной среде и даже после инкубации фермента при рН 6.0 сохранялось только 60% активности (рис. 4б).

Влияние ионов металлов и химических веществ на активность рекомбинантной каталазы. Присутствие 1.0 мМ Hg²⁺ и Cu²⁺ в значительной степени ингибировало каталитическую активность рекомбинантной каталазы на 62 и 64% соответственно. Интересно, что активность фермента увеличивалась на ~60% в растворе 1 мМ Fe²⁺ (рис. 5а). Воздействие ЭДТА (50 мМ) и 10%-ного Na-ДДС приводило к снижению активности фермента на 81 и 78% соответственно. Воздействие 0.01 мМ NH₂OH или 0.1 мМ NaN₃ ингибировало активность фермента на 25 и 27% соответственно, однако наиболее сильное ингибирование наблюдалось в присутствии 0.01 мМ KCN, вызывающего падение активности фермента до 2% (рис. 5б). Как известно, многие белки теряют активность в присутствии органических растворителей. Выделенную каталазу инкубировали с органическими растворителями в соотношении каталаза-95%-этанол-хлороформ 10 : 5 : 3 (об./об.). При воздействии органических растворителей активность фермента уменьшалась на 65% (рис. 5б).

Влияние концентрации H₂O₂ на кинетику и активность рекомбинантной каталазы. Выделенная каталаза при использовании H₂O₂ в качестве субстрата была крайне нестабильной. При достижении концентрации H₂O₂ 20 мМ наблюда-

лась инактивация фермента (рис. 6). Зависимость скорости расщепления H₂O₂ HpCAT1 от концентрации субстрата при рН 2.6 и 45°С подчинялась кинетике Михаэлиса-Ментен. График, построенный в обратных координатах, позволил определить, что значение кажущейся K_м 0.95 мМ, а V_{макс} ~25 000 ед./мг белка.

В настоящее время проведен ряд исследований каталазы из *H. polymorpha* [20–22, 28–30]. HpCAT1 впервые была выделена из отделенного от клеток экстракта *H. polymorpha* с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [30]. В присутствии H₂O₂ фермент был способен окислять метанол, формальдегид и формиат. В 1991 г. было показано что HpCAT1 участвует в метаболизме метанола, однако его присутствие необязательно

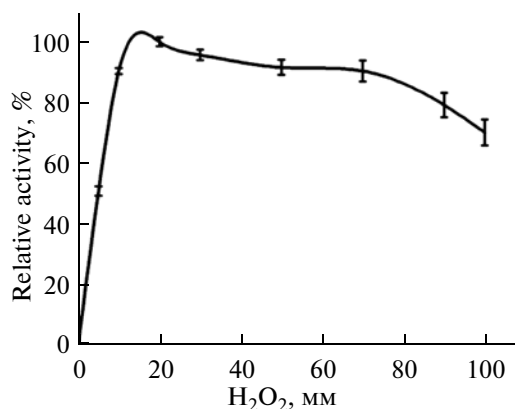


Рис. 6. Влияние концентрации H₂O₂ на активность каталазы *P. pastoris* GS115.

для метаболизма углеродных субстратов с большим количеством углеродных атомов [28]. Была выделена нативная каталаза из *H. polymorpha*, исследованы некоторые ее свойства [20]. Последовательность ДНК *HpCAT1* впервые клонировали и секвенировали в 1992 г. [21, 22]. В 1998 г. было показано, что мутант *H. polymorpha*, не имеющий пероксисомальной каталазы, не способен расти на метаноле в качестве единственного источника углерода и энергии [29]. Этот результат показал, что *HpCAT1* играет ключевую роль в метаболизме *H. polymorpha*.

Проведенное ранее выделение нативной *HpCAT1* показало, что очистка этого белка требует строгого соблюдения определенных условий, поскольку нестабильность фермента ограничивала дальнейший анализ его биохимических свойств [20]. Рекombинантный белок *HpCAT1*, выделенный из *P. pastoris* GS115, был значительно стабильнее и количество белка было достаточным для исследования его свойств. Настоящая работа — это первая публикация, посвященная ферментативным свойствам рекombинантного секретируемого белка *HpCAT1*. Обнаружено несколько уникальных особенностей рекombинантного фермента.

В присутствии H_2O_2 в качестве субстрата активность нативного белка *HpCAT1* тестировали при низких температурах из-за его нестабильности. Рекombинантный белок *HpCAT1* был более стабильным, имел температурный оптимум $45^\circ C$, был относительно стабильным при высокой температуре, после инкубации при $60^\circ C$ в течение 1 ч сохранялось более 50% активности. Для каталаз из других видов температурный оптимум обычно наблюдается в интервале $40\text{--}60^\circ C$ [10]. Было показано, что активность каталазы термофиллов может в значительной степени зависеть от температуры и при этом фермент может обладать значительной термостабильностью. Температурный оптимум фермента из гипертермофильных архей *Archaeoglobus fulgidus* достигал $70^\circ C$ [30]. Стабильность каталаз, в особенности термостабильность, авторы работы [31] объясняют определенной структурой фермента. Нативный белок *HpCAT1* имел pH-оптимум в широком диапазоне pH $5.8\text{--}8.5$, в то время как рекombинантная каталаза имела высокую активность в узком интервале pH $2.2\text{--}3.0$. Приведенные результаты согласуются с данными, полученными для фототрофных бактерий *Rhodospseudomonas capsulata*, имеющих также более узкий диапазон оптимальных значений pH для действия фермента $6.0\text{--}6.5$ [32]. Однако, узкий pH-оптимум и низкая pH-стабильность рекombинантного белка *HpCAT1* препятствуют его промышленному внедрению. Такие свойства не

характерны для монофункциональных каталаз, которые как правило имеют широкий оптимум pH и термостабильности [14, 33]. Тем не менее, свойства фермента могут быть улучшены *in vitro*, если использовать стратегию направленной эволюции, предусматривающей перестановки в ДНК. Такой подход был ранее использован в нашей лаборатории для увеличения термостабильности β -глюкуронидазы [34]. Интересно, что рекombинантная каталаза из *H. polymorpha* обладала значительной термостабильностью, однако ее активность в значительной степени зависела от температуры. Причины этого явления могут быть связаны с необходимостью выживания *H. polymorpha* в окружающей среде. В дальнейшем особенности фермента необходимо исследовать с проведением структурно-функционального анализа *HpCAT1*.

Результаты влияния ионов металлов на активность рекombинантного *HpCAT1* из *H. polymorpha* показали, что 1.0 мМ Hg^{2+} и Cu^{2+} ингибировали активность белка, в то время как в присутствии 1.0 мМ Fe^{2+} активность белка увеличивалась. Для каталазы из *Pseudomonas aeruginosa* было показано, что ионы Fe^{3+} , а не Fe^{2+} значительно увеличивали экспрессию и повышали активность [35]. Влияние KCN на активность рекombинантной каталазы было таким же, как и на нативную каталазу, влияние NaN_3 на активность рекombинантной каталазы было значительно слабее по сравнению с влиянием на активность нативного фермента [20]. Рекombинантная каталаза *H. polymorpha* была более устойчива к действию NaN_3 , по сравнению с нативным ферментом.

Полученный рекombинантный фермент был более чувствителен к воздействию H_2O_2 , по сравнению с исходным белком [20]. Ферменты из бактерий *Micrococcus luteus* и *Vibrio rumoiensis* проявляли максимальную стабильность в присутствии H_2O_2 в концентрациях 80 мМ и 70 мМ [10] соответственно, а каталазы из *Escherichia coli* и *Rhodobacter capsulata* были способны к расщеплению 2.0 мМ H_2O_2 в течение $20\text{--}30$ мин с сохранением при этом только 50% своей активности [32]. Хотя рекombинантный белок *HpCAT1* из *H. polymorpha* не является самым чувствительным к H_2O_2 , тем не менее это свойство может быть серьезным препятствием для его промышленного внедрения и в значительной степени ограничивает диапазон применения фермента. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения механизмов такой чувствительности к субстрату H_2O_2 .

В заключение следует отметить, что мы провели клонирование и экспрессию *HpCAT1* с использованием экспрессирующей системы *P. pastoris* GS115. Рекombинантная каталаза термостой-

ких дрожжей *H. polymorpha* была более стабильна и обладала лучшими термодинамическими свойствами по сравнению с нативной каталазой. Кроме того, процедура очистки белка была проще и удельная активность рекомбинантной каталазы (24 287 ед./мг) была выше, чем у нативного фермента (215.6 ед./мг). Несмотря на некоторые нежелательные особенности рекомбинантной каталазы, такие как узкий оптимум pH, низкая pH-стабильность и высокая чувствительность к H₂O₂, они могут быть улучшены путем генетических манипуляций, так как каталаза из *H. polymorpha* — эффективный фермент, который, по-видимому, определяет способность организма к выживанию. Фермент несомненно представляет интерес для фармацевтической промышленности и других отраслей.

Работа выполнена при поддержке фонда “Ключевые проекты Шанхайского городского комитета сельского хозяйства” (№ 2009-6-4, № 2011-1-8) и Международного фонда научно-технического сотрудничества (2010DFA62320, 11230705900); Государственного фонда естественных наук (31071486) Китая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chelikani P., Ramana T., Radhakrishnan T.M. // *Ind. J. Clin. Biochem.* 2005. V. 20. № 2. P. 131–135.
- Puig Muset P., Laporte J., Martin J., Valdecasas F.G. // *Med. Clin. (Barc).* 1962. V. 38. P. 199–212.
- Wang R.F., Wennerstrom D., Cao W.W., Khan A.A., Cerniglia C.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 10. P. 4300–4304.
- Gross J., Scherz B., Wyss S., Kunzel W., Maiwald H.J., Hartwig A., Polster H. // *Kinderarztl. Prax.* 1977. V. 45. № 4. P. 168–175.
- Niebel A., Heungens K., Barthels N., Inze D., Van Montagu M., Gheysen G. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1995. V. 8. № 3. P. 371–378.
- Shi X.L., Feng M.Q., Shi J., Shi Z.H., Zhong J., Zhou P. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 54. № 1. P. 24–29.
- Lin K.H., Huang H.C., Lin C.Y. // *Plant Cell Rep.* 2010. V. 29. № 6. P. 575–593.
- Potapovich M.V., Eryomin A.N., Artzukevich I.M., Chernikevich I.P., Metelitz D.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2001. V. 66. № 6. P. 646–657.
- Yumoto I.I., Iwata H., Sawabe T., Ueno K., Ichise N., Matsuyama H., Okuyama H., Kawasaki K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. № 1. P. 67–72.
- Yumoto I., Ichihashi D., Iwata H., Istokovics A., Ichise N., Matsuyama H. et al. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 7. P. 1903–1909.
- An H., Zhou H., Huang Y., Wang G., Luan C., Mou J. et al. // *Mol. Biotechnol.* 2010. V. 45. № 2. P. 155–160.
- Nakayama M., Nakajima-Kambe T., Katayama H., Higuchi K., Kawasaki Y., Fuji R. // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 106. № 6. P. 554–558.
- Brown-Peterson N.J., Salin M.L. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. № 13. P. 4197–4202.
- Brown-Peterson N.J., Salin M.L. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 2. P. 378–384.
- Kobayashi I., Tamura T., Sghaier H., Narumi I., Yamaguchi S., Umeda K., Inagaki K. // *J. Biosci. Bioeng.* 2006. V. 101. № 4. P. 315–321.
- Hicks D.B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1229. № 3. P. 347–355.
- Yumoto I., Fukumori Y., Yamanaka T. // *J. Biochem.* 1990. V. 108. № 4. P. 583–587.
- Nakagawa T., Yoshida K., Takeuchi A., Ito T., Fujimura S., Matsufuji Y. et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010. V. 74. № 8. P. 1733–1735.
- van Dijken J.P., Otto R., Harder W. // *Arch. Microbiol.* 1975. V. 106. № 3. P. 221–226.
- Sysoev O.V., Gruzman M.B., Ivanov E.V., Trotsenko Y.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 1991. V. 56. № 10. P. 1313–1316.
- Didion T., Roggenkamp R. // *FEBS Lett.* 1992. V. 303. № 2–3. P. 113–116.
- Keizer I., Roggenkamp R., Harder W., Veenhuis M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 72. № 1. P. 7–11.
- Macaulay-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. // *Yeast.* 2005. V. 22. № 4. P. 249–270.
- Daly R., Hearn M.T. // *J. Mol. Recognit.* 2005. V. 18. № 2. P. 119–138.
- Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Li X., Fan H.Q., Guo M.J., Zhang S.L. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2004. V. 37. № 3. P. 282–291.
- Gellissen G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 54. № 6. P. 741–750.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
- Aminova L.R., Kyslikova E., Volfova O., Trotsenko Y.A. // *Folia Microbiol. (Praha)*. 1991. V. 36. № 2. P. 158–163.
- Verduyn C., Giuseppin M.L., Scheffers W.A., van Dijken J.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 54. № 8. P. 2086–2090.
- Kengen S.W., Bikker F.J., Hagen W.R., de Vos W.M., van der Oost J. // *Extremophiles*. 2001. V. 5. № 5. P. 323–332.
- Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. // *Cell Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 2. P. 192–208.
- Nadler V., Goldberg I., Hochman A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 882. № 2. P. 234–241.
- Kim H., Lee J.S., Hah Y.C., Roe J.H. // *Microbiology*. 1994. V. 140. № 12. P. 3391–3397.
- Xiong A.S., Peng R.H., Cheng Z.M., Li Y., Liu J.G., Zhuang J. et al. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2007. V. 20. № 7. P. 319–325.
- Frederick J.R., Elkins J.G., Bollinger N., Hassett D.J., McDermott T.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 3. P. 1375–1379.

Heterologous Extracellular Expression and Initial Characterization of the Peroxisomal Catalase from the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* in *Pichia pastoris*¹

Y.-S. Tian, H. Xu, J. Xu, R.-H. Peng, and Q.-H. Yao

Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Biotechnological Research Institute,
Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

e-mail: yaoquanhong_sh@yahoo.com.cn

Received September 24, 2012

Abstract—Catalase is well known to eliminate H₂O₂ in cells and reduces the toxicity of peroxide compounds. A catalase gene *HpCat1* of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* without the part coding the native signal peptide was cloned into expression vector pYM3165 and then integrated into genome of *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The result of the enzyme activity assay and SDS-PAGE demonstrated that the recombinant protein (HpCAT1) of *H. polymorpha* was extracellularly expressed in *P. pastoris*. The expressed catalase was recovered from the culture supernatant of *P. pastoris* GS115 and purified by (NH₄)₂SO₄ fractionation and Ni-NTA affinity chromatography. The main biochemical properties of the recombinant protein HpCAT1, such as thermostability and thermostability, pH optimum and pH stability, as well as the effect of metal ions and chemicals, were characterized. With H₂O₂ as the substrate, HpCAT1 displayed pH and temperature optima of ~2.6 and 45°C, respectively. The recombinant HpCAT1 activity was inhibited by 1 mM Hg²⁺ and Cu²⁺, but was highly enhanced by 1.0 mM Fe²⁺.