

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *RHODOVULUM STEPPENSE* ДЛЯ ПРЯМОЙ РЕАКЦИИ

В. М. Ларченков, Н. Р. Комарова, Е. В. Ковалёва, А. В. Миткевич,
М. И. Фалалеева, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 10.04.2018 г.

Аннотация. Бактерии *Rhodovulum steppense*, обитающие в содовых озерах Центральной Азии и Забайкалья, характеризуются высокой устойчивостью к значительным концентрациям соли. Их относят к филуму α -протеобактерий. Метаболизм данного таксона характеризуется наличием альтернативных путей окислительного метаболизма. Из галоалкалофильных бактерий *Rhodovulum steppense* штамма А-20s с помощью разработанной многостадийной схемы очистки, включающей ионообменную хроматографию на DEAE-Sephacel и гель-хроматографию на сефадексе G-200 получен электрофоретически гомогенный препарат L-лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27). Для культивирования микроорганизмов был создан фотоорганогетеротрофный тип питания. Ионообменная хроматография являлась ключевой стадией, позволившей разделить белки по заряду поверхности их молекулы. При этом десорбцию лактатдегидрогеназы осуществляли градиентом концентрации NaCl (420 мМ). Гель-хроматография на колонке с сефадексом G-200 позволила получить электрофоретически гомогенный препарат с относительной электрофоретической подвижностью 0,33. Успешная очистка лактатдегидрогеназы из исследуемых бактерий позволила изучить регуляторные особенности данного фермента. На очищенном препарате фермента получены значения констант Михаэлиса для разных субстратов. Установлено, что величина этой важной характеристики равнялась 0,164 мМ для пирувата и 0,158 мМ для NADH. Полученные величины характеризуют уровень сродства бактериальной лактатдегидрогеназы как высокий. В статье проводится краткий анализ величин константы Михаэлиса для лактатдегидрогеназы из разных источников. На основании анализа полученных кинетических характеристик делается вывод о физиологической роли лактатдегидрогеназы в бактериях *Rh. steppense*. Сравнительный анализ значений констант Михаэлиса, полученных для лактатдегидрогеназы и L-лактат: цитохром с-оксидоредуктазы, показал возможность их сопряженного функционирования в бактериальной клетке. Предположительно, у *Rh. steppense* такая форма взаимодействия этих ферментов осуществляется при фотоорганогетеротрофном типе питания. Данный тип взаимодействия ферментных систем обеспечивает дополнительное получение энергии электронов (трансмембранный потенциал) путем обеспечения работы ЭТЦ. Механизм данного пути осуществляется за счет передачи электронов на цитохром с. Несмотря на «укороченный» вариант функционирования электротранспортной цепи в бактериях происходит эффективная трансформация разных форм энергии.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, константа Михаэлиса, очистка фермента, ионообменная хроматография, *Rhodovulum steppense*

Пурпурные бактерии относятся к экологической группе фотосинтезирующих прокариот, объединяющей ряд представителей филумов Альфа-, Бета- и Гамма-протеобактерии, которым свойственен бескислородный фотосинтез с использованием соединений серы в качестве доноров электронов. Эти бактерии представляют большой интерес для изучения в связи со своей эволюционной древностью и возможным большим значением в формировании современных ор-

ганизмов, а также в связи с определённой практической значимостью отдельных представителей пурпурных бактерий. В частности, в последнее время изучается возможность использования бактерий *Rhodovulum sulphidophilum* для получения терапевтических микро-РНК [1, 2].

В данной работе объектом исследований являлся галоалкалофильный микроорганизм *Rh. steppense* штамма А-20s. При изучении обмена веществ этих бактерий внимание было обращено на лактатдегидрогеназу, играющую важную роль в анаэробном метаболизме многих организмов. Це-

лью нашей работы было изучение кинетических характеристик данного фермента при катализе им прямой реакции — превращения пирувата в лактат.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Чистая культура бактерий *Rh. steppense* штамма А-20s была получена из коллекции DSMZ. Для выращивания микроорганизмов использовали питательная среда следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.33, MgCl_2 – 0.33, NH_4Cl – 0.33, Na_2SO_4 – 0.33, KCl – 0.33, NaCl – 30, CaCl_2 – 0.1, Na_2S – 0.1, дрожжевой экстракт – 0.1, CH_3COONa – 0.5. В среду добавлялся раствор витаминов и микроэлементов в количестве 0.1 мл на 100 мл питательной среды [3].

Активность лактатдегидрогеназы определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм в среде спектрофотометрирования следующего состава: Tris-HCl pH 8.2 – 50 мМ, пируват натрия 1.5 мМ, NADH 2.8 мМ. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ NADH в NAD за 1 минуту при стандартных условиях [4].

Для очистки фермента была применена модифицированная многостадийная схема очистки. Гомогенат бактериальной культуры получали разрушением клеток ультразвуком с частотой 22 кГц 3 раза по 30 секунд на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т. Далее полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g 10 минут с целью освобождения от нерастворимой фракции. Для отделения белков от низкомолекулярных соединений использовали метод гель-фильтрации, при этом супернатант наносили на колонку, заполненную сефадексом G-25, элюентом служил буферный раствор Tris-HCl 50 мМ. Ключевой стадией очистки являлась ионообменная хроматография на DEAE-Sephacel, элюентом служил раствор NaCl концентрации от 415 до 430 мМ. Эта стадия позволила разделить белки по заряду поверхности

молекулы. Для получения гомогенного препарата фермента была использована гель-хроматография на сефадексе G-200, в качестве элюента использовался буферный раствор Tris-HCl 50 мМ [4, 5]. Электрофоретический анализ образцов проводился в полиакриламидном геле по методу Дэвиса с использованием 4% крупнопористого концентрирующего геля и 7% мелкопористого разделяющего геля. Проявление пластинок на гомогенность осуществлялось окрашиванием с помощью нитрата серебра [6]. Специфическое проявление проводилось тетразолиевым методом в среде следующего состава: лактат натрия – 0.5 М, NAD – 0.28 мМ, феназинметасульфат – 0.21 мМ, нитросиний тетразолий – 0.32 мМ [3].

Значения константы Михаэлиса для ферментов определялись методом обратных координат Лайнуивера-Берка. Для определения достоверности результатов исследований применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0.05$ [7]. Для построения графиков использовали данные, обработанные с помощью программ линейной и параболической аппроксимации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для выполнения работы необходимо было получить гомогенный препарат лактатдегидрогеназы с удельной активностью 0.680 Е/мг белка, очищенный в 85 раз (таблица 1).

Электрофоретические исследования показали гомогенность полученных препаратов лактатдегидрогеназы (рис. 1). Значение коэффициента электрофоретической подвижности составило 0.32. Сравнительные данные по очистке ЛДГ из других объектов немногочисленны, на их основании можно констатировать, что наша схема очист-

Таблица 1.

Очистка ЛДГ из *Rhodovulum steppense* ($n=3$, $p \leq 0.05$)

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	2.5	5.60	693.00	0.008	100	1.0
Супернатант	2.3	4.70	20.10	0.240	85.7	30.0
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2.0	2.70	7.85	0.260	35.7	32.5
Ионообменная хроматография на DEAE-Sephacel	1.0	0.94	1.47	0.640	16.8	80.0
Гель-фильтрация через сефадекс G-200	1.0	0.70	1.03	0.680	12.4	85.0

ки ЛДГ из *Rh. steppense* соответствует общепринятым нормам [8, 9, 10].

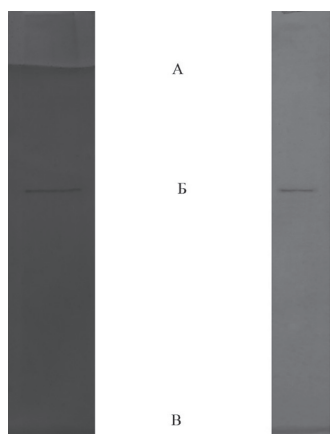


Рис. 1. Электрофоретический анализ очищенного препарата лактатдегидрогеназы *Rhodovulum steppense* штамма А-20s. Обозначения: А – линия старта; Б – проявление лактатдегидрогеназы; В – фронт.

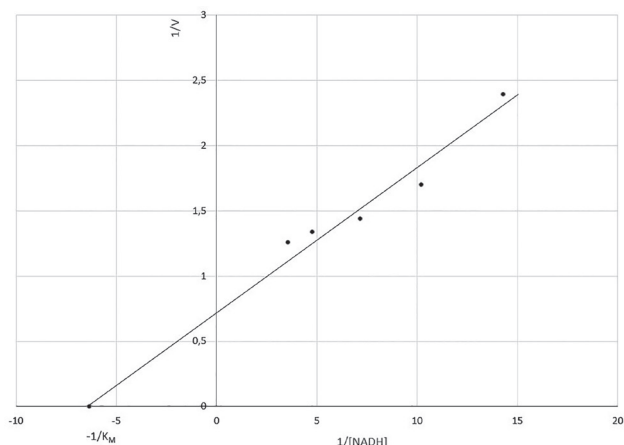


Рис. 2. Определение значения константы Михаэлиса по NADH для лактатдегидрогеназы *Rhodovulum steppense* штамма А-20s.

Значения константы Михаэлиса по пирувату и NADH для полученного препарата фермента составили 0.164 мМ и 0.158 мМ соответственно (рис. 2 и 3). Из литературных данных известны как меньшие, так и большие значения этого показателя для обоих субстратов (таблица 2) [8-12].

Значения констант Михаэлиса для NADH и пирувата у лактатдегидрогеназ различных организмов по литературным данным

Организм	K_M , мМ (пируват)	K_M , мМ (NADH)	Источник
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	0.060	0.050	[8, 9]
<i>Sus scrofa</i> (изоформа H2M2)	0.065	0.013	[10]
<i>Sus scrofa</i> (изоформа M4)	0.130	0.016	[10]
<i>Thermus thermophilus</i>	0.160	-	[11]
<i>Lactobacillus helveticus</i>	0.250	-	[12]

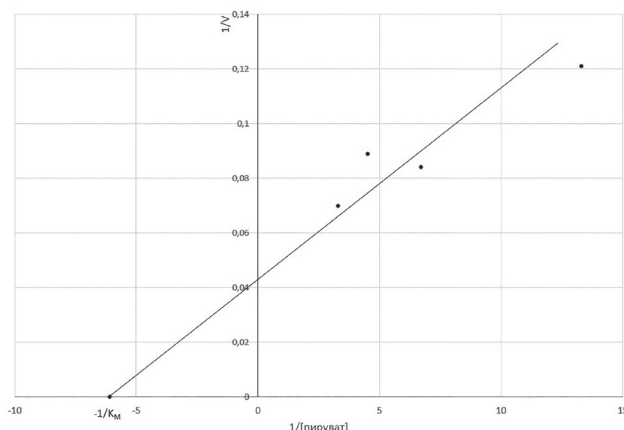


Рис. 3. Определение значения константы Михаэлиса по пирувату для лактатдегидрогеназы *Rhodovulum steppense* штамма А-20s.

Таким образом, L-лактатдегидрогеназа *Rhodovulum steppense* имеет типичные характеристики для ферментов данного типа и полностью соответствует кинетике Михаэлиса-Ментен.

На низкое сродство к лактату указывает проявление активности фермента только при концентрации субстрата 0.5 М. Близкие значения константы Михаэлиса лактатдегидрогеназы по лактату у бактерий подтверждены литературными данными [13, 14]. Это указывает на то, что в физиологических условиях катализируемая лактатдегидрогеназой реакция по превращению пирувата в лактат является необратимой.

Ранние исследования показали наличие у *Rhodovulum steppense* фермента L-лактат: цитохром с-оксидоредуктазы [15-18]. Необратимость катализируемой L-лактатдегидрогеназой реакции превращения пирувата в лактат в физиологических условиях указывает на то, что эти два фермента могут функционировать сопряжённо [19, 20], обеспечивая передачу электронов с восстановленных соединений на цитохром с, который далее участвует в работе электронтранспортной цепи (рис. 4).

ВЫВОДЫ

Таким образом, получение в электрофоретически гомогенном состоянии лактатдегидрогеназы из *Rh. steppense* позволило провести сравнитель-

Таблица 2.

ный анализ кинетических и регуляторных характеристик этой ферментной системы и сделать предположение о сопряженном функционировании лактатдегидрогеназы с L-лактат: цитохром-с-оксидоредуктазой. Данный механизм может способствовать ускорению утилизации избытка NADH и регуляции окислительно-восстановительного потенциала клеток.

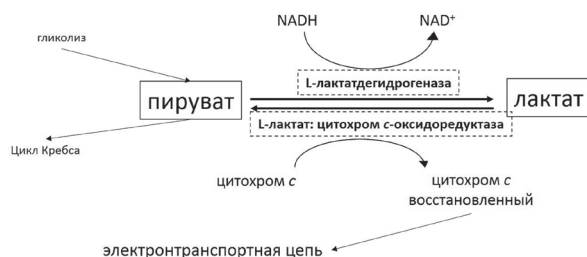


Рис. 4. Гипотетическая схема сопряженного функционирования ферментов L-лактатдегидрогеназы и L-лактат: цитохром с-оксидоредуктазы у *Rhodovulum steppense*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ № 14-14-00721).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pereira P., Pedro A.Q., Queiroz J.A., Fiquerias A.R., Sousa F. // Bioengineered. – 2017, V. 8, No. 5., pp. 670-677.
- Nishimura S., Tanaka T., Fujita K., Itaya M., Hiraishi A., Kikuchi Y. // Nucleic Acids Res Suppl. – 2003, No. 3, pp. 279-280.
- Kompantseva E.I., Komova A.V., N.A. Kostrikina // Int J Syst Evol Microbiol. — 2010, Vol. 60, No. 5. pp. 1210–1214.
- Ларченков В.М., Сорокина Т.В., Ахмед А.Х., Целуйко Ж.А., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т. 15. – №5. – С. 714 -719.
- Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Лященко М.С., Гатауллина М.О., Компанцева Е.И. // Прикладная биохимия и микробиология – 2016. – Т. 52. – №2. – С. 168-173.
- Епринцев А.Т., Арабцева М.А., Парфёнова И.В. Фалалеева М.И. // Известия РАН: Серия биологическая. – 2009. – № 3. – С.283-289.
- Лакин Г.Ф. Биометрия / Ред. Г.Ф. Лакин. – М: Высшая школа, 1990. – 32 с.
- N.G. Karagueler N.G. // Appl Biochem Biotechnol. – 2007, Vol. 141, pp. 265-272.
- Flores H., Ellington A.D. // Protein Eng. Des. Sel. – 2005, Vol. 18., pp. 369-377.
- Marhat L., Loiseau P.M., Petek F. // Parasitol Res. – 1996, Vol. 82, No. 8., pp. 672-680.
- Goto T., Sugawara K., Nakamura S., Kidokoro S.I., Wakui H., Nuromura W. // Biochem Biophys. Res. Commun. – 2016, Vol. 479, pp. 860-867.
- Coquelle N., Fioravanti E., Weik M., Vellineux F., Madern D. // J Mol Biol. – 2007, Vol. 374, pp. 547-562.
- Savijoki L., Palva A. // Appl. Environ. Microbiol. – 1997, Vol. 63, pp. 2850-2856.
- Zhao R., Zheng S., Duan C., Liu F., Yang L., Huo G. // FEBS Open Bio. – 2013, Vol. 3., pp. 379-386.
- Caspar P., Neves A.R., Shearman C.A., Gasson M.J., Baptista A.M., Turner D.L., Soares C.M., Santos H. // FEBS J. – 2007. Vol. 274, No. 22., pp. 5924-5936.
- Ларченков В.М., Ахмед А.Х., Сорокина Т.В., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: вып. 17. – Воронеж: 2015 г.
- Whole-Genome sequence of the purple photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* strain W4. / S. Masuda [et. al.] // Genome Announcement. – 2013, Vol. 1, №3.
- Nagao N., Hirose Y., Miawa N., Ohtsubo Y., Umekage S., Kikuchi Y. // Genome Announcement. – 2015, Vol. 3., №2.
- Ларченков В.М., Ковалёва Е.В., Миткевич А.В., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: выпуск 19. Воронеж: 2017 г. С. 100-103.
- Епринцев А.Т., Ларченков В.М., Комарова Н.Р., Ковалёва Е.В., Миткевич А.В., Фалалеева М.И., Компанцева Е.И. // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 54, №4. С. 1 — 5.

Воронежский государственный университет
Ларченков В. М., Аспирант
Тел.: +7 951 560-40-98
e-mail: larchenkoff.vladimir@yandex.ru

Комарова Н. Р., Аспирант
Тел. +7 952 104-93-05

Voronezh State University
Larchenkov V. M., Post-graduate student
Ph.: +7 951 560-40-98
E-mail: larchenkoff.vladimir@yandex.ru

Komarova N. R., Post-graduate student
Phone: +7 952 104-93-05

Ларченков В. М., Комарова Н. Р., Ковалёва Е. В., Миткевич А. В., Фалалеева М. И., Епринцев А. Т.

Ковалёва Е. В., Студент (магистратура)
Тел. +7 952 557-38-54

Kovaleva E. V., Student
Ph.: +7 952 557-38-54

Миткевич А. В., Студент (магистратура)
Тел. +7 950 753-44-89

Mitkevich A. V., Student
Ph.: +7-950-753-44-89

Фалалеева М. И., Кандидат биологических наук, Доцент
Телефон: +7 909 215-34-95
E-mail: falaleeva-m-i@yandex.ru

Falaleeva M. I., PhD., Associate Professor
Ph.: +7 909 215-34-95
E-mail: falaleeva-m-i@yandex.ru

Епринцев А. Т., Доктор биологических наук, Профессор, Заведующий кафедрой
Телефон: +7 (473) 255-05-63
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Eprintsev A. T., PhD, DSci., Full Professor
Ph.: +7 (473) 255-05-63
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

KINETIC CHARACTERISTICS OF LACTATE DEHYDROGENASE FROM *RHODOVULUM STEPPENSE* FOR FORWARD REACTION

V. M. Larchenkov, N. R. Komarova, E. V. Kovaleva, A. V. Mitkevich, M. I. Falaleeva, A. T. Eprintsev
Voronezh State University

Abstract. Bacteria *Rhodovulum steppense* living in soda lakes of Central Asia and the Baikal region, characterized by high resistance to significant concentrations of salt. They are referred to the phylum of α -proteobacteria. The metabolism of this taxon is characterized by the presence of alternative routes of oxidative metabolism. From haloalkaliphilic bacteria *Rhodovulum steppense* strain A-20s obtained electrophoretic homogeneous preparation of L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) using the developed multi-stage purification scheme involving ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel and gel-chromatography on Sephadex G-200. The studied bacteria were cultured in photogravitational the type of food. Ion exchange chromatography was a key stage that allowed proteins to be divided by the charge of the surface of their molecules. The desorption of lactate dehydrogenase was carried out by the concentration gradient of NaCl (420 mm). Gel chromatography on a column with Sephadex G-200 allowed to obtain an electrophoretically homogeneous drug with a relative electrophoretic mobility of 0.33. Successful purification of lactate dehydrogenase from the studied bacteria allowed to study the regulatory features of this enzyme. The values of the Michaelis constant for different substrates are obtained on the purified enzyme preparation. It was found that the value of this important characteristic when using pyruvate was equal to 0.164 mm and 0.158 mm - for NADH. The obtained values characterize the level of affinity of bacterial lactate dehydrogenase as high. The article provides a brief analysis of the values of the Michaelis constant for lactate dehydrogenase from different sources. Based on the analysis of the obtained kinetic characteristics, the conclusion is made about the physiological role of lactate dehydrogenase in *Rh. steppense*. Comparative analysis of the values of Michaelis constants obtained for lactate dehydrogenase and L-lactate: cytochrome C-oxidoreductase showed the possibility of their conjugate functioning in the bacterial cell. It is known that the work of these enzyme systems can have a conjugate form in *Rh. steppense* when cultured photogravitational the type of growth. This type of interaction of enzyme systems provides additional electron energy (transmembrane potential) by ensuring the operation of electron-transfer chain. The mechanism of this pathway is carried out by the transfer of electrons to the cytochrome C. Despite the "shortened" version of the functioning of the electronic transport chain, there is an effective transformation of different forms of energy.

Keywords: lactate dehydrogenase, Michaelis constant, purification of enzyme, ion-exchange chromatography, *Rhodovulum steppense*.

REFERENCES

1. Pereira P., Pedro A.Q., Queiroz J.A., Fiquerias A.R., Sousa F. // *Bioengineered*. – 2017, V. 8, No. 5., pp. 670-677. DOI: 10.1080/21655979.2017.1284710
2. Nishimura S., Tanaka T., Fujita K., Itaya M., Hiraishi A., Kikuchi Y. // *Nucleic Acids Res Suppl.* – 2003, No. 3, pp. 279-280.
3. Kompantseva E.I., Komova A.V., N.A. Kostrikina // *Int J Syst Evol Microbiol.* — 2010, Vol. 60, No. 5. pp. 1210–1214.
4. Larchenkov V.M., Sorokina T.V., Akhmed A.H., Tseluiko Z. A., Falaleeva M.I., Eprintsev A.T. // *Sorption and Chromatographic processes*. – 2015, Vol. 15. No. 5., pp. 714 -719.
5. Eprintsev A.T., Falaleeva M.I., Lyashchenko M.S., Gataullina M.O., Kompantseva E.I. // *Applied Biochemistry nad Microbiology*. 2016., Vol. 52., No. 2., pp. 168-173.
6. Eprintsev A.T., Arabtseva M.A., Parfenova I.V., Falaleeva M.I. // *News of RAS*. 2009, No. 3, pp. 283-289.
7. Lakin G.F. *Biometry* / G.F. Lakin. – М: Высшая школа, 1990. – 32 с.
8. N.G. Karagueler N.G. // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2007, Vol. 141, pp. 265-272.
9. Flores H., Ellington A.D. // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2005, Vol. 18., pp. 369-377. DOI: 10.1093/protein/qzi043
10. Marhat L., Loiseau P.M., Petek F. // *Parasitol Res.* - 1996, Vol. 82, No. 8., pp. 672-680.
11. Goto T., Sugawara K., Nakamura S., Kikukoro S.I., Wakui H., Nuromura W. // *Biochem Biophys. Res. Commun.* – 2016, Vol. 479, pp. 860-867. DOI: 10. 1016/j.bbrc.2016.09..118.
12. Coquelle N., Fioravanti E., Weik M., Vel-lineux F., Madern D. // *J Mol Biol.* – 2007, Vol. 374, pp. 547-562. DOI: 10.106/j.imb.2007.09.049
13. Savijoki L, Palva A. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997, Vol. 63, pp. 2850-2856.
14. Zhao R., Zheng S., Duan C., Liu F., Yang L., Huo G. // *FEBS Open Bio.* – 2013, Vol. 3., pp. 379-386.
15. Caspar P., Neves A.R., Shearman C.A., Gasson M.J., Baptista A.M., Turner D.L., Soares C.M., Santos H. // *FEBS J.* – 2007. Vol. 274, No. 22., pp. 5924-5936. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06115.x.
16. Larchenkov V.M., Akhmed A.H., Sorokina T.V., Falaleeva M.I., Eprintsev A.T. // *Organization and regulation of physiological and biochemical processes: issue 17. Voronezh: 2015*, pp. 120-123.
17. Masuda S., Hori K., Maruyama F., Ren S., Sugimoto S., Yamamoto N., Mori H., Yamada T., Sato S., Tabata S., Ohta H., Kurokawa K. // *Genome Announcement.* – 2013, Vol. 1, №3. DOI: 10.1128/genomeA.00577-13.
18. Nagao N., Hirose Y., Miawa N., Ohtsubo Y., Umekage S., Kikuchi Y. // *Genome Announcement.* – 2015, V. 3., №2. DOI: 10.1128/genomeA.00388-15.
19. Larchenkov V.M., Kovaleva E.V., Mitkevitsch A.V., Falaleeva M.I., Eprintsev A.T. // *Organization and regulation of physiological and biochemical processes: issue 19. Voronezh: 2017*, pp. 100-103.
20. Eprintsev A.T., Larchenkov V.M., Komarova N.R., Kovaleva E.V., Mitkevitsch A.V., Falaleeva M.I., Kompantseva E.I. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018, Vol. 54, No. 4, pp. 1-5.