

Фагозависимый суперсинтез β -галактозидазы *Escherichia coli* и разработка способа ее очистки

С. И. Черных, И. Ю. Славченко, Ю. И. Горлов, А. Г. Терентьев,
Т. Г. Гавриш, В. А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

*Разработан способ получения фермента β -галактозидазы (ЕС 3.2.1.23) в клетках *E. coli* с использованием бактериофага. Выход фермента составлял 700 ед. активности в 1 мл культуральной среды. Накопление фермента в культуральной среде позволило использовать для предварительной очистки β -галактозидазы мембранную технику. Сконцентрированный и частично очищенный препарат β -галактозидазы доочищали методом лиганд-аффинной хроматографии. Конечный препарат β -галактозидазы характеризовался высокой степенью очистки и нативности. Процессы получения и очистки фермента β -галактозидазы были выполнены в опытно-промышленном варианте.*

Введение. β -Галактозидаза — фермент, расщепляющий молочный сахар лактозу на глюкозу и галактозу. Основной областью использования β -галактозидазы является пищевая промышленность, в частности молочная, для гидролиза лактозы молока [1].

Утилизация лактозы ограничена ее низкими растворимостью и сладостью. Кроме этого, часть населения земного шара (количество таких людей возрастает с севера на юг) страдает непереносимостью молока из-за низкого содержания в их организме β -галактозидазы и неспособностью утилизировать лактозу молока [2]. Гидролиз лактозы с помощью β -галактозидазы снимает вышеперечисленные ограничения использования молока и его продуктов.

Другая область применения бактериальной β -галактозидазы — это иммуноферментный анализ, являющийся основой диагностикумов для идентификации болезней человека, животных и растений [3]. β -Галактозидаза в качестве маркера входит в состав конъюгатов — комплексов с антителом или

антигеном. Использование β -галактозидазы в иммуноферментном анализе обусловлено следующим [4]:

1. Фермент характеризуется очень высокой эффективностью катализа (число оборотов $> 450000 \text{ мин}^{-1}$).

2. В структуре β -галактозидазы присутствует большое количество свободных SH-групп (20), которые могут быть вовлечены в образование ковалентных связей с молекулами антител или антигенов без потери ферментативной активности.

3. Легкость и простота тестирования β -галактозидазы с помощью как хромогенных, так и флюорогенных субстратов.

4. Отсутствие аналогичной активности в большинстве анализируемых биологических материалов.

Существующие способы получения β -галактозидазы чаще всего основаны на методах старой классической биотехнологии, когда в клетке работает один ген целевого продукта, и поэтому выход β -галактозидазы в таких системах достаточно низкий.

Разработана и генноинженерная биотехнология получения β -галактозидазы, но она основана на плазмидозависимой технологии, при которой β -га-

лактозидаза образует нерастворимые кристаллоподобные тельца включений [5, 6]. Чтобы получить из таких телец активный белок, их необходимо денатурировать и ренатурировать. В результате значительно снижается выход целевого продукта и при этом появляются молекулы с альтернативной конформацией, что отрицательно сказывается на его биологической активности.

Нами разработана генноинженерная биотехнология суперсинтеза β -галактозидазы в клетках кишечной палочки с использованием бактериофага λ . Фаг λ , размножаясь в бактериальной клетке, амплифицирует встроенный в него ген β -галактозидазы, что ведет к увеличенному синтезу фермента β -галактозидазы. Процесс суперсинтеза организован таким образом, что белки, синтезируемые клеткой, накапливаются вне клетки в растворимом виде. Последнее позволяет увеличить продуктивность системы. Кроме того, отпадает необходимость сепарации клеток и их дезинтеграции. Нахождение β -галактозидазы в культуральной среде требует специальных подходов в разработке способа ее очистки. Привлекательным в данном случае является использование мембранной технологии. Поскольку β -галактозидаза *E. coli* имеет большую молекулярную массу (м. м.) (около 550 кДа), то использование ультрафильтрации позволяет удалить многие белки с более низкой м. м., а последующая доочистка на сорбентах может быть выполнена в упрощенном варианте.

Материалы и методы. Для выращивания культур-продуцентов использовали стандартную богатую питательную среду с пептоном и дрожжевым экстрактом. Синтез фермента по фагозависимой технологии проводили, как описано ранее [7].

Штамм-продуцент *E. coli* CA 77 (pZ56).

Источник фага — лизогенный штамм *E. coli* λ plac CI₈₅₇Q_{am117}R_{am54}.

Активность β -галактозидазы определяли по методу, описанному Миллером [8]. За единицу активности принято количество фермента, гидролизующее 1 мкМ орто-нитрофенил- β -D-галактозида до орто-нитрофенола за 1 мин при 30 °С, pH 7,0.

Культуру-продуцент выращивали в ферментере «Electrolux» объемом 50 л; лизогенную культуру — в 10-л ферментере «ЛКВ» (Швеция).

Микрофильтрацию осуществляли на каскадной системе «Pellicon» («Millipore», США) в режиме тангенциального потока (кассеты Dugarone, размер пор 0,45 мкм). Микрофильтрат концентрировали ультрафильтрацией на этой же фильтрационной системе (кассеты Polysulfon 100000).

Колонка 3,0 × 30,0 см, содержащая 200 мл ДЭАЭ-целлюлозы («Whatman», Англия), колонка

3,0 × 30,0 см, содержащая 100 мл аффинного сорбента.

Буфер А: 0,01 М Na-фосфатный буфер, pH 7,1, 2 мМ MgCl₂, 0,04 М NaCl, 1 мМ 2-меркаптоэтанол.

Для получения аффинных сорбентов в качестве матрицы использовали сефарозу 4В («Pharmacia», Швеция), TSK-гель («ТОУО», Япония) и мелкокристаллическую целлюлозу («Chemapol», Чехословакия). Матрицу активировали бромцианом, эпихлоргидрином, согласно стандартным методикам [9]. Спейсерами служили гексаметилендиамин и 3,3'-бисдиаминодипропиламин, модифицированные янтарным ангидридом, а также полиглицин и поли-L-лизин. В качестве лигандов использовали *n*-аминофенил- β -D-тиогалактопиранозид, *n*-амино-фенил- β -D-галактопиранозид и 1-галактозамин. Для ковалентного связывания лигандов со спейсером применяли водорастворимый карбодиимид-N-(диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимид хлоргидрат.

Результаты и обсуждение. Культуру-продуцент *E. coli* CA 77 (pZ56) выращивали в ферментере «Electrolux» объемом 50 л до плотности клеток $1 \cdot 10^8$ в 1 мл; лизогенную культуру *E. coli* λ plac CI₈₅₇Q_{am117}R_{am54} — в 10-л ферментере «ЛКВ». При достижении плотности клеток $1 \cdot 10^8$ в 1 мл культуральной среды культуру *E. coli* CA 77 (pZ56) заражали фагом λ plac CI₈₅₇Q_{am117}R_{am54} со множественностью 10 корпускул на 1 бактериальную клетку. Динамика накопления β -галактозидазы в культуральной среде приведена на рис. 1.

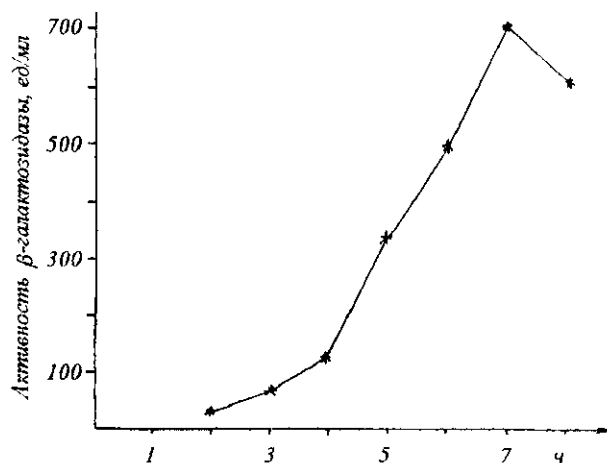


Рис. 1. Динамика накопления β -галактозидазы в культуральной среде

Нахождение β -галактозидазы в культуральной среде позволяет использовать для ее предварительной очистки и концентрирования мембранную технику. На первом этапе получения β -галактозидазы из культуральной среды были подобраны оптимальные режимы микро- и ультрафильтрации, а также частичной очистки фермента путем отмывки в режиме диафильтрации.

В результате подобрана следующая схема проведения процесса. После ферментации культуральную среду, содержащую β -галактозидазу, охлаждали до 6—8 °С, затем удаляли клеточный дебрис сепарированием (5—6 тыс. г). Далее супернатант осветляли микрофильтрацией на касетной системе «Pelicon» в режиме тангенциального потока (кассеты Dugaroге с размером пор 0,45 мкм). Микроконцентрат с незначительным количеством фермента отбрасывали, микрофильтрат концентрировали ультрафильтрацией на этой же фильтрационной системе (кассеты Polysulfon 100000). По достижении кратности концентрирования 20—25 раз процесс останавливали и переключали систему в режим диафильтрации. Для отмывки использовали 0,01 М фосфатный буфер, рН 7,1, содержащий 2 мМ MgCl₂. В этих условиях концентрат практически полностью очищался от низкомолекулярных компонентов, в том числе и низкомолекулярных белков. В табл. 1 представлены данные, характеризующие типичный процесс обработки культуральной среды, содержащей β -галактозидазу, на этапах микро-, ультра- и диафильтрации.

Выход фермента после конечного этапа (получение диаконцентрата) составил 78,4 %. Видно, что, кроме концентрирования препарата в 20 раз по объему, достигается очистка β -галактозидазы по белку в 1,5 раза, содержание фермента увеличива-

ется с 27 % от общего содержания белка в отсепарированной культуральной среде до 40 % в диаконцентрате. В диаконцентрат сразу после получения добавляли 2-меркаптоэтанол и хлористый натрий до конечной концентрации 1 мМ и 0,004 М соответственно и в дальнейшем использовали для хроматографической очистки β -галактозидазы.

На первом этапе очистки использовали ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. На колонку, содержащую около 200 мл ДЭАЭ-целлюлозы, уравновешенной буфером А, наносили 500 мл диаконцентрата (11 г белка). Затем колонку промывали буфером А и сразу после этого тем же буфером, но с более высокой концентрацией NaCl (0,1 М). β -Галактозидазу элюировали буфером А, содержащим 0,3 М NaCl. Хроматография на этом сорбенте позволяет вдвое очистить β -галактозидазу по белку и достичь ее содержания в элюате до 79 % от общего белка.

На конечном этапе очистки β -галактозидазы были опробованы разные варианты лиганд-аффинной хроматографии. Для этого синтезировали ряд сорбентов, различающихся природой лиганда, спейсера и матрицы. В частности, в качестве лигандов использовали такие известные в литературе ингибиторы β -галактозидазы, как *n*-аминофенил- β -D-тиогаляктопиранозид, 1-галактозамин, *n*-аминофенил- β -D-галактопиранозид. Метод аффинной очистки β -галактозидазы основан на сродстве этого фермента к указанным аналогам субстрата. Лиганд ковалентно присоединяется к нерастворимой матрице и поэтому при пропускании ферментного препарата через колонку, содержащую аффинный сорбент, β -галактозидаза взаимодействует с лигандом и остается на сорбенте, а примесный материал выходит с промывным объемом.

Таблица 1

Характеристика процесса обработки культуральной среды, содержащей β -галактозидазу, на стадиях микро-, ультра- и диафильтрации

Этап обработки	Объем, л	Белок, мг/мл	Активность β галактозидазы, ед/мл	Удельная активность β -галактозидазы, ед/мг белка	Содержание β -галактозидазы, % от суммарной активности
Культуральная среда после сепарации	21	1,0	243	243	100
Микрофильтрат	20	0,9	225	250	88,2
Микроконцентрат	1	1,3	460	354	9,0
Ультрафильтрат	19	0,05	1,4	28	0,5
Ультраконцентрат	1	17	4400	259	86,3
Диафильтрат	10	0,12	3,2	27	0,63
Диаконцентрат	1	11	3960	360	78,4

Существенным моментом здесь является то, что для эффективной сорбции фермента необходимо, чтобы лиганд был не непосредственно связан с матрицей (в этом случае аффинного взаимодействия не происходит вследствие стерических ограничений), а через промежуточное звено (спейсер). От природы и длины спейсера зависит сила взаимодействия фермента с лигандом, что в значительной степени определяет параметры хроматографического процесса.

Нами была проверена эффективность сорбентов с различными спейсерами, в частности, использовали 3,3'-бисдиаминодипропиламин, полиглицин, поли-L-лизин, гексаметилен-диамин.

В качестве матриц были опробованы целлюлоза, сефароза 4В, TSK-гель. Наилучшие результаты получены при следующем сочетании компонентов аффинного сорбента: лиганд — *p*-аминофенил- β -D-галактозид, спейсер — гексаметилен-диамин, матрица — TSK-гель или сефароза 4В. Сорбент на основе данных компонентов характеризовался низкой неспецифической сорбцией, высокой силой взаимодействия с β -галактозидазой (при нейтральном значении pH фермент не смывается с сорбента в присутствии 1 М NaCl). Эти свойства аффинного сорбента обеспечивали высокую эффективность хроматографического разделения и позволили получить высокоактивный и высокоочищенный препарат β -галактозидазы (рис. 2).

Процесс очистки на аффинном сорбенте проводили при следующих условиях: колонку, содержащую около 100 мл сорбента, уравнивали буфером А, содержащим 0,3 М NaCl, и наносили элюат с ДЭАЭ-целлюлозы. Для удаления неспецифически сорбированных белков колонку промывали этим же буфером, но с более высокой концентрацией NaCl (1 М). Элюцию β -галактозидазы осуществляли 0,01 М боратным буфером, pH

9,8—10,0, содержащим 1 М NaCl, 1 мМ MgCl₂ и 1 мМ 2-меркаптоэтанол.

В табл. 2 приведены данные, характеризующие процесс очистки на каждом этапе хроматографии. Видно, что конечный препарат β -галактозидазы отличается не только высокой степенью чистоты, но и нативности, его удельная активность составляет в данном случае 875 ед/мг белка. В различных экспериментах последний показатель варьировал от 800 до 900 ед/мг белка.

Таким образом, фермент, полученный по вышеописанной технологии, по всем показателям удовлетворяет требованиям иммуноферментного анализа, что было в последующем подтверждено при получении конъюгатов на основе этого фер-

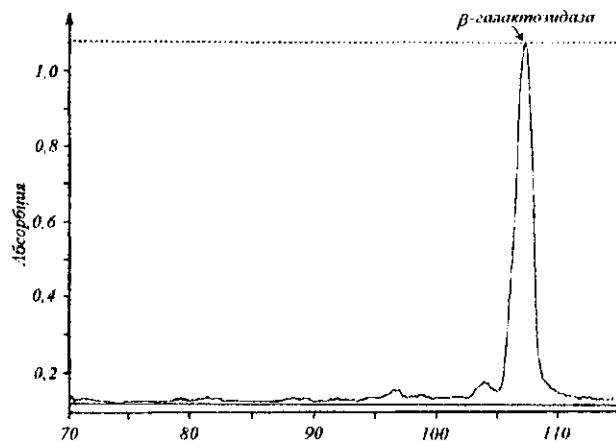


Рис. 2. Денситограмма с электрофорезом препарата β -галактозидазы после очистки лиганд-аффинной хроматографией. Содержание β -галактозидазы в препарате составляет 98 % от общего белка

Таблица 2

Характеристика процесса очистки β -галактозидазы из диаконцентрата ионообменной и лиганд-аффинной хроматографией

Этап очистки	Объем фракции, мл	Белок, мг/мл	Активность β -галактозидазы, ед/мл	Удельная активность β -галактозидазы, ед/мг белка	Выход β -галактозидазы, %
Диаконцентрат	500	11	3960	360	100
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе*	1250	2,2	1280	582	80,8
Лиганд-аффинная хроматография*	920	1,8	1576	875	73,2

*Приведены данные относительно элюатов.

мента и их использования в различных системах тестирования.

Технология очистки β -галактозидазы успешно апробирована в условиях опытно-промышленного производства, в результате чего были получены опытные партии лиофилизированного препарата высокоочищенной β -галактозидазы.

S. I. Chernikh, I. Yu. Slavchenko, Yu. I. Gorlov, A. G. Terent'ev, T. G. Gavrish, V. A. Kordyum

Фагозалежный суперсинтез β -галактозидазы *Escherichia coli* та розробка способу її очистки

Резюме

Розроблено спосіб одержання ферменту β -галактозидази (EC 3.2.1.23) у клітинах *E. coli* з використанням бактеріофага. Вихід ферменту складає 700 од. активності в 1 мл культурального середовища. Накопичення ферменту в культуральному середовищі дозволило використати для попередньої очистки β -галактозидази мембранну техніку. Сконцентрований та частково очищений препарат β -галактозидази доочищували методом ліганд-афінної хроматографії. Кінцевий препарат β -галактозидази характеризувався високим ступенем очистки і нативності. Процеси отримання і очистки ферменту β -галактозидази були здійснені у дослідно-промисловому варіанті.

S. I. Chernykh, I. Yu. Slavchenko, Yu. I. Gorlov, A. G. Terent'ev, T. G. Gavrish, V. A. Kordyum

Phagedependent overproduction of β -galactosidase *Escherichia coli* and working out its purification

Summary

The phagedependent method of obtaining of β -galactosidase (EC 3.2.1.23) *E. coli* has been worked out. The yield was up 700 U of enzyme activity per ml of cultural fluid. Accumulation of enzyme in

cultural medium has permitted to use membrane method for preliminary purification of β -galactosidase. Concentrated and partially purified preparation of β -galactosidase has been purified by ligand-affinity chromatography. Pure preparation of β -galactosidase has characterized by high purity and nativeness. The process of obtaining and purification of β -galactosidase were made in pilot scale.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaul R., D'Souza S. F., Nadkarni G. B. Hydrolysis of milk lactose by immobilized β -galactosidase hen egg white powder // *Biotechnol. and Bioeng.*—1984.—26, N 8.—P. 901—904.
2. Houts Sandra S. Lactose intolerance // *Food Technol.*—1988.—42, N 3.—P. 110—113.
3. Gibbons I., Skold C., Rowley G. L., Ullman E. F. Homogeneous enzyme immunoassay for proteins employs β -galactosidase // *Anal. Biochem.*—1980.—102, N 2.—P. 167—170.
4. Фреймаг Д. У. Ферментативный иммунометрический анализ с применением аффинных колонок // *Иммуноферментный анализ* / Под ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхоффа.—М.: Мир, 1988.—С. 244—256.
5. Li Xiaoli, Robbins J. W., Jr Taylor K. B. The production of recombinant beta-galactosidase in *Escherichia coli* in yeast extract enriched medium // *J. Ind. Microbiol.*—1990.—5, N 2—3.—P. 85—93.
6. Kane James F., Hartley Donna L. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* // *Trends Biotechnol.*—1988.—6, N 5.—P. 95—101.
7. А. с. СССР № 1593232 А1. Способ получения β -галактозидазы / В. А. Кордюм, С. И. Черных, И. Ю. Славченко, В. Г. Коробко. 15.05.1990 г.
8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—436 с.
9. Аффинная хроматография. Методы / Под ред. П. Дин, У. Джонсон, Ф. Мидл.—М.: Мир, 1988.—278 с.

Поступила в редакцию 23.04.97