



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12244

### **Применение ионообменной хроматографии для очистки глиоксилатредуктазы из листьев кукурузы и исследование ее характеристик**

**Марина Олеговна Гатауллина, Александр Трофимович Епринцев**

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru

**Аннотация.** Глиоксилатредуктаза (ГР, КФ 1.1.1.79) катализирует восстановление глиоксилата до гликолата с использованием никотинамидадениннуклеотидфосфата или никотинамидадениннуклеотида в качестве кофермента. Целью данного исследования было получение очищенного препарата исследуемого фермента из листьев кукурузы и изучение его характеристик.

В данной работе кинетические и регуляторные параметры глиоксилатредуктазы рассчитывались для листьев 14-дневных проростков кукурузы (*Zea mays*), выращенных гидропонным способом при 25°C. В процессе исследования были применены следующие методы: гомогенизация образцов, четырехэтапная очистка, включающая использование сульфата аммония для высаливания, гель-фильтрацию на колонках G-25 и ионообменную хроматографию с применением DEAE-SEPACEL, а также электрофорез на полиакриламидных гелях и количественное определение белка. Для изучения свойств фермента использовали электрофоретически гомогенные препараты. Влияние pH, концентрации субстрата и кофактора на скорость ферментативной реакции определяли серией измерений при различных значениях скорости ферментативной реакции.

В результате четырехстадийной очистки был получен гомогенный препарат с удельной активностью 167 Е/мг белка. Важную роль в очистке играла ионообменная хроматография, был получен 1 пик ферментной активности при десорбции в 104 мМ хлорида натрия. Исследование свойств глиоксилатредуктазы показало значительную зависимость активности от величины pH. Значение оптимального pH составило 6.5 единиц. Было показано, что значения  $K_m$  были определены методом Лайнуивера-Берка как 5.3 мМ для гликолата натрия, 0.15 мМ для НАД<sup>+</sup> и 0.07 мМ для НАДФ<sup>+</sup>.

Исследования глиоксилатредуктазы, выделенной из листьев кукурузы, открывают хорошие перспективы для изучения роли этого фермента в адаптации метаболизма клетки к стрессовым условиям.

**Ключевые слова:** глиоксилатредуктаза, гликолат, НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup> *Zea mays*, ионообменная хроматография.  
**Для цитирования:** Гатауллина М.О., Епринцев А.Т. Применение ионообменной хроматографии для очистки глиоксилатредуктазы из листьев кукурузы и исследование ее характеристик // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 426-431. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12244>

Original article

### **Using ion exchange chromatography for the purification of glyoxylate reductase from corn leaves and studying its characteristics**

**Marina O. Gataullina, Alexander T. Eprintsev**

Voronezh State University, Voronezh, Russia, bc366@bio.vsu.ru

**Abstract.** The purpose of this study was to obtain a purified preparation of the studied enzyme from corn leaves and to study its characteristics. In this work, kinetic and regulatory parameters of glyoxylate reductase were calculated for leaves of 14-day-old corn (*Zea mays*) seedlings grown hydroponically at 25°C. The following methods were used during the study: sample homogenisation, four-step purification including ammonium sulphate for desalting, gel filtration on G-25 columns, and ion exchange chromatography using DEAE-



sephacel, as well as electrophoresis on polyacrylamide gels and quantitative analysis of protein. To study the properties of the enzyme, we used electrophoretically homogenous preparations. The influence of pH, substrate concentration, and cofactor on the rate of the enzymatic reaction was determined by a series of measurements with different values of the enzymatic reaction rate.

As a result of four-stage purification, we obtained a homogeneous preparation with a specific activity of 167 E/mg of protein. Ion exchange chromatography was important for purification; we obtained 1 peak of enzyme activity upon desorption in 104 mM sodium chloride. Studying the properties of glyoxylate reductase showed a significant dependence of activity on pH. The optimal pH value was 6.5 units.

It was shown that  $K_m$  values were determined by the Lineweaver–Burk method as 5.3 mM for sodium glycolate, 0.15 mM for  $NAD^+$ , and 0.07 mM for  $NADP^+$ . Studies of glyoxylate reductase isolated from corn leaves are promising for studying the role of this enzyme in the adaptation of cell metabolism to stressful conditions.

**Key words:** glyoxylate reductase, glycolate,  $NAD^+$ ,  $NADP^+$  *Zea mays*, ion exchange chromatography.

**For citation:** Gataullina M.O., Eprintsev A.T. Using ion exchange chromatography for the purification of glyoxylate reductase from corn leaves and studying its characteristics. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 426-431. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12244>

## Введение

Одним из ферментов, отвечающих за формирование адаптаций растительной клетки к стрессовым условиям, является глиоксилатредуктаза. Глиоксилатредуктаза (ГР, КФ 1.1.1.79) – фермент класса оксидоредуктаз, который катализирует восстановление глиоксилата до гликолата. Коферментом ГР является никотинамидадениннуклеотидфосфат (НАДН) или никотинамидадениннуклеотид (НАДФН). Таким образом, исследуемый фермент ускоряет перенос гидрида от НАД(Ф)Н к глиоксилату. В ходе данных процессов происходит регенерация субстрата в гликолат и окисление кофактора до  $НАД(Ф)^+$  [1]. Глиоксилатредуктаза высококонсервативна и присутствует практически во всех организмах. Множество исследуемых глиоксилатредуктаз также катализируют превращение гидроксипирувата в D-глицерат [2].

Субстрат ГР, глиоксилат, является метаболитом при фотодыхании растений и синтезируется в пероксисомах [3], что обуславливает функции фермента. Глиоксилатредуктаза является челноком глиоксилата-гликолата, что помогает освободиться от избыточных восстановительных эквивалентов в результате фотосинтеза [4]. С другой стороны, накопление высоких концентраций гликолата может приводить к неблагоприятным последствиям для растений, таким как торможение метаболических процессов и

ухудшение ассимиляции  $CO_2$  [5]. Кроме того, уровень активности глиоксилатредуктазы может использоваться как маркер стрессового воздействия для растений [6]. Целью данного исследования было получение очищенного препарата исследуемого фермента из листьев кукурузы и изучение его характеристик.

## Экспериментальная часть

В работе использовали листья 14-дневных проростков *Zea mays L* (сорт Воронежская 76). Выращивание растений осуществлялось гидропонным способом при 10-ти часовом световом дне, температуре  $25^\circ C$  и интенсивности света 100 Ватт/м<sup>2</sup>. Определение активности ГР производилось спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм по изменению оптической плотности реакционного фотометрического раствора. Реакционная смесь для определения скорости восстановления глиоксилата была приготовлена на основе 100 мМ Tris-HCl буфера с pH 6.5. В качестве субстрата использовался 20 мМ гликолат натрия, коферментом и кофактором выступали 0.6 мМ  $НАД(Ф)^+$  и 100 мМ хлорида калия соответственно.

Единицей ферментативной активности глиоксилатредуктазы считали такое количество фермента, которое восстанавливает 1 мкмоль  $НАД(Ф)^+$  за 1 мин при  $25^\circ C$  [7].

Последовательность из 4 этапов была использована для проведения процедуры

Таблица 1. Этапы очистки глиоксилатредуктазы из листьев кукурузы (n=3, p≤0.05)  
Table 1. Steps for purifying glyoxylate reductase from corn leaves (n=3, p≤0.05)

Стадия	V, см <sup>3</sup>	Белок, мг	Общая активность, Е.	Удельная активность, Е/мг белка	Выход%	Степень очистки
1) Гомогенат	11	25.8	150	0.88	100	1
2) Фракционирование (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5	6.1	10.3	1.68	47	1.9
3) Гель-фильтрация через сефадекс G-25	7	5.5	11.8	2.10	54	2.4
4) Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-SEPHACEL	4	0.02	3.3	167	15	189

очистки. На первом этапе растительный материал был подвергнут гомогенизации [8]. Белки осаждали добавлением сульфата аммония при насыщении раствора 25-80%; для очистки фермента от связывающих солей и низкомолекулярных примесей использовали колонку (1.5×35 см), заполненную сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция). Получение фракции белка с глиоксилатредуктазной активностью производилось с применением ионообменной хроматографии на колонке (1.5×40 см) с DEAE Sephacel («GEHealthcare», Швеция). При элюировании применялся хлорид натрия с линейным градиентом в пределах от 0 до 150 мМ [9,10]. Содержание белка определяли по методу Лоури [11].

Полиакриламидный гель применялся в процессе электрофоретических исследований нативного фермента. Гомогенность препарата подтверждалась окрашиванием нитрата серебра, а специфичность фермента – тетразолиевым методом [8]. Аналитические определения для каждой из проб осуществлялись в трех повторностях. Статистическая обработка проводилась с применением критерия Стьюдента и поправки Бонферрони для учета множественных сравнений.

### Обсуждение результатов

В ходе четырехстадийной очистки ГР из 14-х-дневных проростков кукурузы

был получен электрофоретически гомогенный препарат одной изоформы ГР. Степень очистки составила 189 раз; выход 15% (табл.1). Важным этапом процесса очистки было проведение высаливания с помощью сульфата аммония, при котором осаждение фермента производилось в диапазоне от 25 до 80% насыщения. При этом увеличивалась его концентрация и удельная активность. После этого следовал этап обессоливания с помощью колонки с сефадексом G-25. В результате проведенных процедур удалось освободить фермент от как низкомолекулярных примесей, так и от присутствующего сульфата аммония, который негативно влиял на его активность. Затем фермент был десорбирован с ДЭАЭ-SEPHACEL с использованием линейного градиента концентраций NaCl от 50 до 150 мМ в среде элюции.

Таким образом, в ходе элюции ГР из листьев кукурузы получили 1 пик ферментной активности при концентрации 104 мМ NaCl (рис. 1).

При электрофоретическом анализе в ПААГ фермент проявился по одной полосе (R<sub>f</sub> – 0.55) при специфическом проявлении и универсальном окрашивании (рис. 2). Стоит отметить, что электрофореграммы с проявлением НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup> в качестве кофакторов были одинаковы. рН среды влияет на активность ферментов, распределяя заряд внутри молекулы. Для большинства энзимов характерен определенный интервал рН, при котором

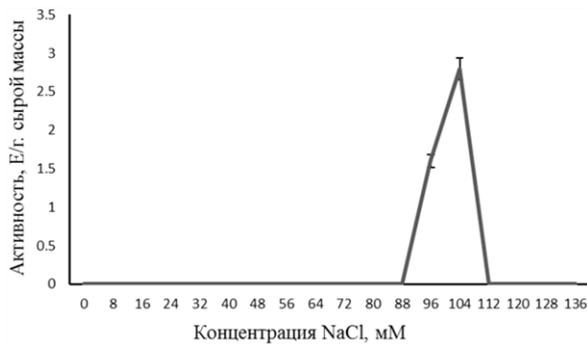


Рис. 1. Элюция глиоксилатредуктазы кукурузы при ионообменной хроматографии на DEAE Sephacel-колонке в градиенте 0-150 мМ хлорида натрия

Fig. 1. Elution of corn glyoxylate reductase by ion exchange chromatography on a DEAE Sephacel column in a gradient of 0-150 mM sodium chloride

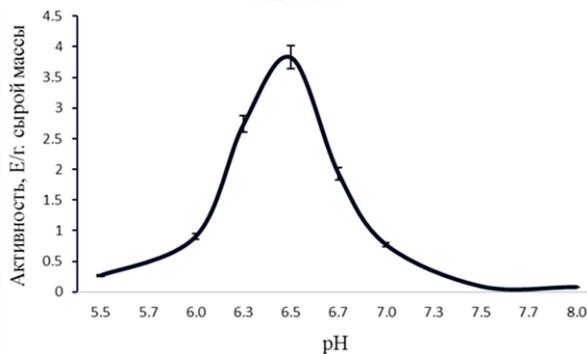


Рис. 3. pH-оптимум НАДФ<sup>+</sup>-глиоксилатредуктазы по реакции окисления гликолата натрия

Рис. 3. pH-оптимум НАДФ<sup>+</sup>-глиоксилатредуктазы по реакции окисления гликолата натрия

они могут работать. Полученное оптимальное значение pH-6.5 (рис. 3) согласуется с литературными данными, из которых известно, что оно находится в пределах от 6.5 до 7.5 [12].

Используя метод Лайнуивера-Берка, было проведено определение константы Михаэлиса для прямой и обратной реакций фермента.

Значение  $K_m$  по гликолату составило 5.3 мМ (рис. 4). Фермент показал более низкое сродство к НАД<sup>+</sup> (0.15 мМ), чем к

НАДФ<sup>+</sup> (0.07 мМ) (рис. 5-6). Таким образом, предпочтительным кофактором для глиоксилатредуктазы из кукурузы, несмотря на способность использовать оба кофермента, является НАДФ<sup>+</sup> [13,14].

### Заключение

Гомогенный препарат с удельной активностью 167 был получен благодаря четырёхстадийной очистке. Очень важную роль в очистке играла ионообменная хроматография, был получен 1 пик ферментной активности при десорбции

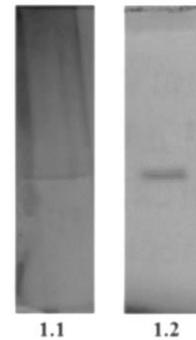


Рис. 2. Электрофореграмма глиоксилатредуктазы в ПААГ (1.1- проявление нитратом серебра; 1.2- окрашивание тетразолиевым методом).

Fig. 2. Electropherogram of glyoxylate reductase in PAGE (1.1. Development with silver nitrate; 1.2. Tetrazolium staining).

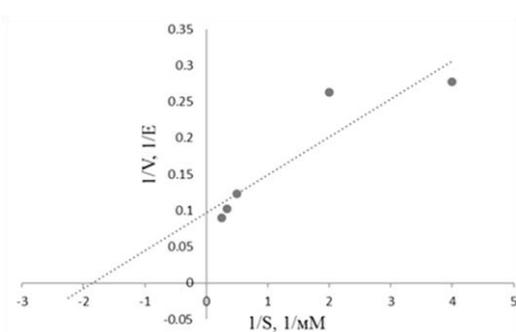


Рис. 4. Линеаризация зависимости активности глиоксилатредуктазы от концентрации гликолата в реакционной среде в координатах Лайнуивера-Берка  
Fig. 4. Linearisation of the dependence of glyoxylate reductase activity on the concentration of glycolate in the reaction medium in Lineweaver-Burk coordinates.

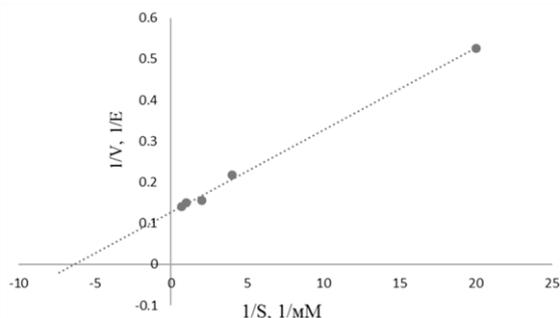


Рис. 5. Линеаризация зависимости активности глиоксилатредуктазы от концентрации НАД<sup>+</sup> в реакционной среде в координатах Лайнуивера-Берка.

Fig. 5. Linearization of the dependence of glyoxylate reductase activity on the concentration of NAD<sup>+</sup> in the reaction medium in Lineweaver-Burk coordinates

в 104 мМ хлорида калия. Исследование показало, что активность глиоксилатредуктазы значительно зависит от величины рН. Значение оптимального рН составило 6.5 единиц.

Для исследуемого гликолата натрия были получены следующие данные: значение К<sub>м</sub>, определенное методом Лайнуивера-Берка, составило 5.3 мМ для гликолата натрия, 150 мкМ – для НАД<sup>+</sup> и 70 мкМ – для НАДФ<sup>+</sup>.

Изучение глиоксилатредуктазы и ее роли в адаптации клеточного метабо-

#### Список литературы/References

1. Eisenhut M., Roell M.S., Weber A.P.M., Mechanistic understanding of photorespiration paves the way to a new green revolution. *New Phytol.*, 2019; 223(4): 1762-1769. <https://doi.org/10.1111/nph.15872>
2. Zemljanuhin A.A., Zemljanuhin L.A., Eprincev A.T., Igamberdiev A.U., Glioksilatnyj cikl rastenij. Voronezh: Izd-vo VGU, 1986, 148 p. (In Russ.)
3. Westhoff P, Gowik U., Evolution of C4 photosynthesis-looking for the master switch. *Plant Physiol.* 2010; 154(2): 598-601. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161729>
4. Kawai S., Mori S., Mukai T., Hashimoto W., Murata K., Molecular characterization of Escherichia coli NAD kinase. *Eur.*

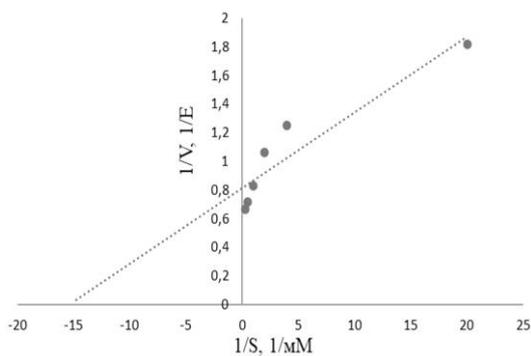


Рис. 6. Линеаризация зависимости активности глиоксилатредуктазы от концентрации НАДФ<sup>+</sup> в реакционной среде в координатах Лайнуивера-Берка.

Fig. 6. Linearization of the dependence of glyoxylate reductase activity on the concentration of NADP<sup>+</sup> in the reaction medium in Lineweaver-Burk coordinates

лизма к стрессовым условиям станет более понятным после глубоких исследований строения и функций молекулы глиоксилатредуктазы, выделенной из листьев кукурузы.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

*J. Biochem.* 2001; 268: 4359-4365. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02358.x>

5. Dellerо Y., Jossier M., Schmitz J., Maurino V. G., Hodges, M., Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism *Journal of Experimental Botany*, 2016; 67(10): 3041-3052. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw090>

6. Oberschall A., Deák M., Török K., Sass L., Vass I., Kovács I., Fehér A., Dudits D., Horváth G.V. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *The Plant Journal.* 2000; 24(4): 437-446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2000.00885.x>



7. Givan C. V., Kleczkowski L. A., The enzymatic reduction of glyoxylate and hydroxypyruvate in leaves of higher plants. *Plant Physiol.* 1992; 100: 552-556. <https://doi.org/10.1104/pp.100.2.552>
8. Gataullina M.O., Eprincev A.T., Vydelenie izoform NAD<sup>+</sup>-zavisimoy malatdehidrogenazy kukuruzy hromatograficheskimi metodami. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2018; 18(1): 111-117. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3475> (In Russ.)
9. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A., Nazarova A.A., Fosfolipidy na fone prirodnyh matric. *Voronezh. Novaya kniga.* 2020. 318 p. (In Russ.)
10. Bondareva L.P., Astapov A.V., Selemenev V.F., Il'ina A.YU., Celektivnost' ionnogo obmena na iminokarboksil'noj smole i jenergija gidratacii ee ionnyh form. *ZHurnal fizicheskoy himii.* 2018; 92 (8): 1323-1328. <https://doi.org/10.7868/S0044453718080186>
11. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biologi.* 1951; 193: 265-275.
12. Hoover G.J., Prentice G.A., Merrill A.R., Shelp B.J. Kinetic mechanism of an Arabidopsis glyoxylate reductase: studies of initial velocity, dead-end inhibition and product inhibition. *Can. Bot.* 2007; 95:896-902. <https://doi.org/10.1139/B07-082>
13. Zhang Z., Liang X., Lu L., Xu Z., Huang J., He H., Peng X. Two glyoxylate reductase isoforms are functionally redundant but required under high photorespiration conditions in rice. *BMC Plant Biology.* 2020; 20(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02568-0>.
14. Hoover G.J., Jørgensen R., Rochon A., Bajwa V.S., Merrill A.R., Shelp B.J. Identification of catalytically important amino acid residues for enzymatic reduction of glyoxylate in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2013; 1834(12): 2663-2671. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.09.013>

### Информация об авторах / Information about the authors

**Гатауллина Марина Олеговна** – ассистент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел.(473)2208877

**Епринцев Александр Трофимович** – д.б.н., проф., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. (473)2208877

**Gataullina Marina O.** – assistant, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail:marina.gataullina@gmail.com

**Eprintsev Alexander T.** – Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh E-mail: bc366@bio.vsu.ru

*Статья поступила в редакцию 15.01.2024; одобрена после рецензирования 10.05.2024; принята к публикации 15.05.2024.*

*The article was submitted 15.01.2024; approved after reviewing 10.05.2024; accepted for publication 15.05.2024.*