

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ
L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ ИЗ *RHODOSPORIDIUM TORULOIDES*
НА СИЛОХРОМЕ С-80

© 2012 О.О. Бабич, Л.С. Солдатова

Кемеровский технологический институт пищевой промышленности

Поступила 22.03.2011

L-фенилаланин-аммоний-лиаза из *Rhodospiridium toruloides* иммобилизована при помощи глутарового альдегида на силанизированном силохроме С-80. Изучена термо- и рН-стабильность свободного и иммобилизованного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы, рассмотрено изменение его активности в процессе хранения. Исследована зависимость активности свободного и иммобилизованного ферментного препарата от концентрации белка в реакционной смеси и концентрации буфера. Проведена оценка влияния концентрации L-фенилаланина на количество образующейся транс-коричной кислоты. Проанализирована скорость дезаминирования L-фенилаланина при увеличении температуры инкубации.

Ключевые слова: L-фенилаланин-аммоний-лиаза, иммобилизация, глутаровый альдегид, фенилаланин, термостабильность.

В последние годы все больше исследователей посвящают свои работы изучению процессов привязывания ферментов к твердой основе [1].

Свойства иммобилизованных ферментных препаратов часто значительно отличаются от свойств исходных растворимых ферментов, и их особенности зависят от вида фермента, источника его получения и способа пришивки на твердый носитель и условий реакционной среды [2].

При иммобилизации активность фермента может значительно снижаться за счет диффузионного сопротивления, экранирования активного центра, конформационной модификации [2, 3]. С другой стороны, активность иммобилизованных ферментов, пришитых методом ковалентной фиксации, может полностью сохраняться и даже повышаться [4]. За счет повышения стабильности фермента при иммобилизации количество превращенного с его помощью субстрата возрастает во много раз [5].

L-фенилаланин-аммоний-лиаза (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) катализирует реакцию обратимого дезаминирования аминокислоты L-фенилаланина до транс-коричной кислоты и аммиака [6]. Основным источником данного фермента являются клетки дрожжей. Фермент представляет интерес в качестве терапевтического средства для лечения фенилкетонурии, может быть использован как для прямой терапии фенилкетонурии, так и для производства полноценных продуктов питания, не содержащих фенилаланин [7].

Целью настоящей работы являлось изучение оптимальных условий иммобилизации L-фенилаланин-аммоний-лиазы из *Rhodospiridium toruloides* методом ковалентного связывания на силохроме С-80. Использование силохрома для получения иммобилизованных препаратов L-фенилаланин-аммоний-лиазы имеет ряд преимуществ по сравнению с другими носителями [8]. Си-

лохром является дешевым и доступным материалом, что создает перспективы внедрения иммобилизованных на нем ферментов в крупномасштабных промышленных процессах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований являлся фермент L-фенилаланин-аммоний-лиаза, выделенный из клеток дрожжей *Rhodotorula glutinis* (Sigma-Aldrich-Louis, США). Удельная активность препарата составляла в среднем 0,87 ед./мг белка.

В качестве носителя использовался силохром марки С-80 (ТУ 6-09-17-48-82) с радиусом пор от 250 до 1000 А и удельную площадь поверхности от 20 до 98 м²/г. Силохром предварительно обрабатывался γ-аминопропилтриэтоксисиланом для введения аминогрупп и затем глутаровым альдегидом.

Для иммобилизации к влажному модифицированному носителю добавляли 30%-ный раствор исходного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы в количестве 10-15 ед. удельной активности на мг носителя. Процесс привязки фермента осуществлялся при перемешивании в ледяной бане в течение заданного промежутка времени при рН 7,4-7,5, после чего носитель отделяли на пористом фильтре от жидкости. Фильтрат проверяли на присутствие белка. Промывку иммобилизованного препарата вели до исчезновения в промывных водах следов белка. Отмытый иммобилизованный ферментный препарат сушили на стеклянном фильтре под вакуумом и в дальнейшем использовали для изучения свойств.

Содержание белка определяли методом Дюма, основанным на измерении теплопроводности молекулярного азота, образующегося после сжигания анализируемого образца при температуре около 1000°С в атмосфере кислорода и последующего восстановления всех образующихся оксидов азота при помощи восстанавливающего агента, с использованием прибора «Rapid N Cube» (Германия).

Активность нативного и иммобилизованного фермента оценивали по образованию транс-коричной кислоты при 290 нм (рН 8,7; 30°С) [9].

Бабич Ольга Олеговна, к.т. н., e-mail: olich.43@rambler.ru;
Солдатова Любовь Сергеевна, асп., e-mail: soldatovals@rambler.ru

Количество образующейся транс-коричной кислоты рассчитывали по увеличению светопоглощения с использованием молярного коэффициента экстинкции, равного $10^4 \text{ дм}^3 \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ [10].

$$\text{Ед./мл фермента} = \frac{(\Delta A_{270} \text{ nm/min Test} - \Delta A_{270} \text{ nm/min Blank}) \times (3) \times (\text{df})}{(19,73) \times (0,01)}$$

где 3 - суммарный объем (в мл) испытания; df – фактор растворения; 19,73 – миллимолярный коэффициент экстинкции транс-коричной кислоты при длине волны 270 нм.

$$\text{Ед./мг белка} = \frac{\text{ед./мл фермента}}{\text{мг белка}}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения термостабильности свободного и иммобилизованного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы реакционную смесь без L-фенилаланина прогревали в течение 5 минут при температуре от 20°C до 80°C. Нагревание проводили в 0,05 М трис-НСI буфере, рН 8,5. После этого добавляли L-фенилаланин, инкубировали реакционные смеси при 30°C на качалке и определяли L-фенилаланин-аммоний-лиазную активность.

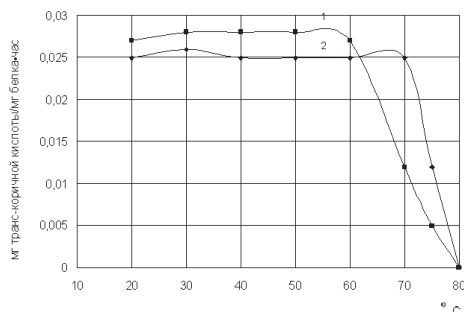


Рис. 1. Зависимость удельной активности L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides* от температуры: 1 - свободный препарат, 2 – иммобилизованный препарат

Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что свободная L-фенилаланин-аммоний-лиаза *Rhodospiridium toruloides* сохраняет свою активность при нагревании реакционных смесей вплоть до 60°C, а иммобилизованные препараты – до 65°C. Дальнейшее увеличение температуры приводит к падению L-фенилаланин-аммоний-лиазной активности. Полная инактивация фермента обнаружена при 75°C как у свободной, так и у иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы.

Дальнейшие исследования направлены на изучение изменения активности свободной и иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы в процессе хранения. Результаты полученных исследований представлены в таблице 1.

Анализ данных таблицы 1 свидетельствует о том, что иммобилизованная L-фенилаланин-аммоний-лиаза в течение длительного времени сохраняет более высокую активность, чем свободная. За 8 месяцев хранения при +4°C или +6°C в 0,15 М трис-НСI буфере (рН 8,8) свободная L-фенилаланин-аммоний-

лиаза теряет 50% своей активности, тогда как иммобилизованная сохраняет первоначальный уровень активности фермента.

Таблица 1. Изменение активности свободной и иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы в процессе хранения (в мг транс-коричной кислоты/мг белка·час)

Варианты	Время хранения, месяцы				
	0	3	4	6	8
Свободная	0,02 7	0,02 7	0,02 2	0,01 2	0,01 2
Иммобилизованная	0,04 0	0,04 0	0,04 0	0,04 0	0,03 7

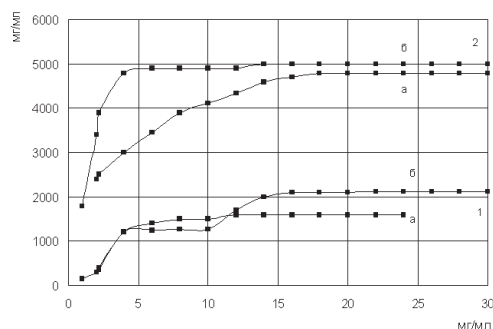


Рис. 2. Зависимость L-фенилаланин-аммоний-лиазной активности *Rhodospiridium toruloides* от концентрации белка: 1-4 часа инкубации; а – свободный препарат, 2 – 20 часов инкубации; б – иммобилизованный препарат

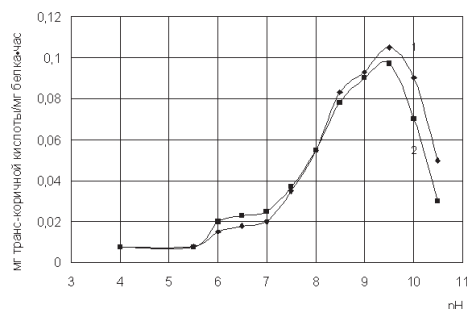


Рис. 3. Зависимость L-фенилаланин-аммоний-лиазной активности *Rhodospiridium toruloides* от значений рН буфера (инкубация 4 часа): 1 – свободный препарат, 2 – иммобилизованный препарат

Также выяснили, что L-фенилаланин-аммоний-лиазная активность *Rhodospiridium toruloides* зависит от концентрации белка в реакционной смеси. Наибольшая активность фермента обнаружена при содержании белка от 3,0 мг/мл и выше в случае им-

мобилизованной и от 7,0 мг/мл и выше в случае свободной (рис. 2).

Для определения оптимального значения pH действия свободной и иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы величину pH варьировали от 4 до 10,5. Результаты определения активности ферментов представлены на рис. 3.

В ходе исследований выяснили, что L-фенилаланин-аммоний-лиаза активна в пределах значений pH от 5,0 до 10,0. Оптимальное значение pH для проявления активности свободной и иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы одинаково и лежит в пределах от 8,8 до 9,1.

Кроме того, определили, что L-фенилаланин-аммоний-лиазная активность зависит от концентрации буфера (рис. 4). Максимальное значение ферментативной активности свободной и иммобилизо-

ванной L-фенилаланин-аммоний-лиазы обнаруживается при концентрациях буфера от 0,2 М и сохраняется до 1,0 М. Низкие концентрации буфера нежелательны, поскольку не обеспечивают поддержания постоянных значений pH. При концентрации буфера ниже 0,1 М значения pH уменьшались до 8,8-8,2 (исходное значение pH 9,1).

Далее в работе изучалось влияние концентрации L-фенилаланина на количество образующейся транс-коричной кислоты. Результаты исследований представлены на рис. 5.

Определили, что количество транс-коричной кислоты, образуемой как свободной, так и иммобилизованной

L-фенилаланин-аммоний-лиазой *Rhodospiridium toruloides*, увеличивается при повышении исходной концентрации L-фенилаланина в реакционной смеси.

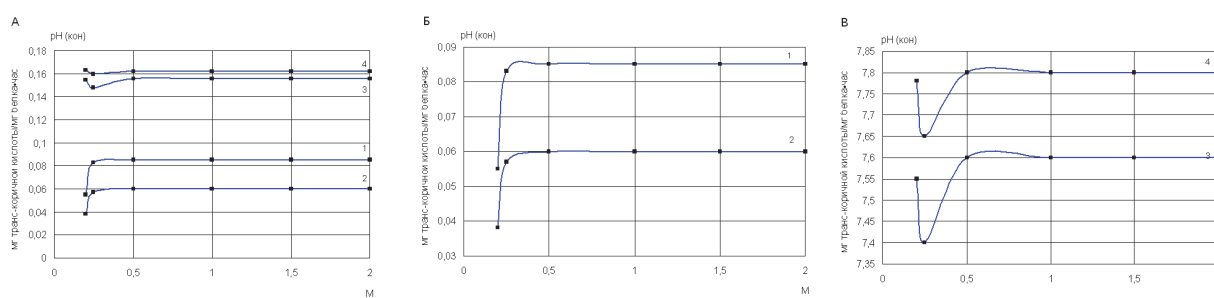


Рис. 4. Зависимость L-фенилаланин-аммоний-лиазной активности *Rhodospiridium toruloides* от концентрации буфера (инкубация 4 часа): А – трис-НСl буфер с pH 9,1, Б – боратный буфер с pH 9,1. Удельная ФАЛ-активность: 1 – свободный препарат, 2 – иммобилизованный препарат. pH конечный: 3 – свободный препарат, 4 – иммобилизованный препарат

С увеличением исходного содержания L-фенилаланина возрастает и количество трансформированной аминокислоты, этот процесс сопровождается образованием аммиака и транс-коричной кислоты (рис. 6).

Максимальное количество L-фенилаланина, которое может быть трансформировано за 20 часов при 30°C, составляет для свободной L-фенилаланин-аммоний-лиазы 15,0 г/л (90 мкМ/мл), а для иммобилизованной – 12,5 г/л (73 мкМ/мл) при начальном содержании аминокислоты 45 г/л. Однако при этом иммобилизованный фермент по сравнению со свободным обладает большей удельной L-фенилаланин-аммоний-лиазной активностью (0,07 и 0,05 мг транс – коричной кислоты/мг белка·час, соответственно).

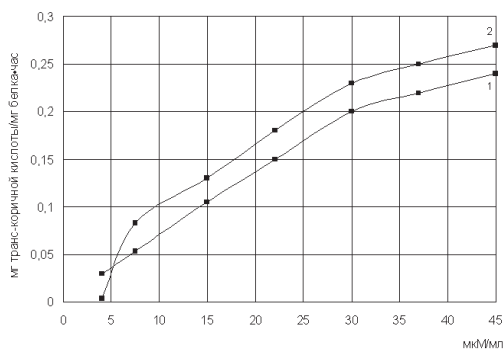


Рис. 5. Зависимость образования транс-коричной кислоты клетками от концентрации L-фенилаланина в реакционной смеси (инкубация 4 часа) 1 – свободный препарат, 2 –

иммобилизованный препарат L-фенилаланин-аммоний-лиазы *Rhodospiridium toruloides*

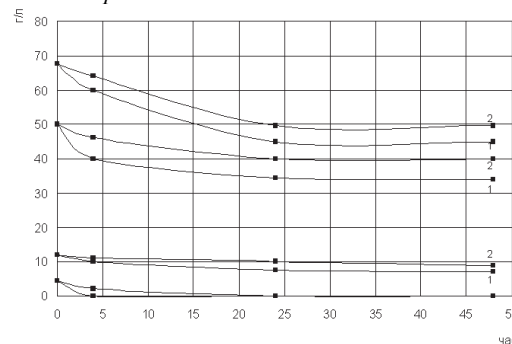


Рис. 6. Трансформация L-фенилаланина L-фенилаланин-аммоний-лиазой *Rhodospiridium toruloides*. 1 – свободный препарат (13 мг/мл белка), 2 – иммобилизованный препарат (12,5 мг/мл белка)

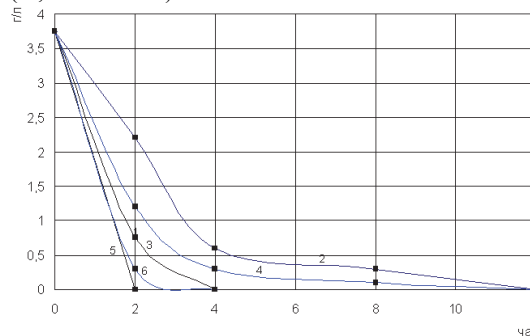


Рис. 7. Трансформация L-фенилаланина L-фенилаланин-аммоний-лиазой при разной температуре.

свободный препарат, ————— - иммобилизованный препарат. 1, 2 – 28°C; 3,4 – 37°C; 5,6 – 45°C

Количество трансформированного L-фенилаланина увеличивается при повышении температуры инкубации реакционных смесей (рис. 7).

Свободная и иммобилизованная L-фенилаланин-аммоний-лиаза при 30°C полностью трансформирует 2,5 г/л L-фенилаланина (15 мкМ/мл), а при 37°C и 45°C - 3,75 г/л (20 мкМ/мл). Скорость дезаминирования L-фенилаланина также возрастает при увеличении температуры инкубации. Например, при 37°C свободная L-фенилаланин-аммоний-лиаза трансформирует 3,75 г/л L-фенилаланина за 12 часов, а при 45°C - за 4 часа. Иммобилизованная L-фенилаланин-аммоний-лиаза в первые часы инкубации проводит трансформацию L-фенилаланина несколько медленнее, а затем так же интенсивно, как и свободная.

ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы были подобраны условия, при которых свободная и иммобилизованная L-фенилаланин-аммоний-лиаза полностью трансформирует 15-20 мкМ/мл (2,5-3,75 г/л) L-фенилаланина.

Впервые получены препараты иммобилизованной на силихроме С-80 L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Сопоставление данных по свободному и иммобилизованному ферменту свидетельствует о том, что иммобилизация L-фенилаланин-аммоний-лиазы на силихроме С-80 благоприятно сказывается на свойствах фермента. Иммобилизованная L-фенилаланин-аммоний-лиаза в течение длительного времени сохраняет более высокую активность, чем свободная. При термообработке препараты иммобилизованного фермента обнаруживают более высокую L-фенилаланин-аммоний-лиазную активность по сравнению со свободным. Однако полная инактивация как свободной, так и иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы наступает при одина-

ковых условиях. Кроме того, показано повышение pH-стабильности фермента после иммобилизации.

Сравнение свойств свободной и иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы показало, что процесс иммобилизации не оказывает значительного влияния на действие фермента. Иммобилизованный фермент так же хорошо, как свободный, осуществляет неокислительное дезаминирование L-фенилаланина.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, госконтракт № 02.740.11.5133.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева И.Н., Пантюхин А.В., Сысоев Б.Б. Иммобилизация ферментов и других биологически активных веществ. Учебное пособие. Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2001. 340 с.
2. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменов В.Ф. и др. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах // Журнал физической химии. 2001. Т. 75, №11. С. 2080-2010.
3. Berry C., Curtis A. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D. Appl. Phys. 2003. V. 3. P. 36.
4. Bruce I.J., Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations // Langmuir. 2005. V. 21. P. 7029-7035.
5. Johnson A., Zawadzka A., Deobald L., et al. Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles // Journal of nanoparticle research. 2008. № 10. P. 1009-1025.
6. Sarkissian C.N., Gamez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? // Mol. Genet. Metab. 2005. № 86. P.22-26.
7. Sarkissian C.N., Shao Z., Blain F., et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. № 96. P.2339-2344.
8. Вудворд Дж. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы. М.: Мир, 1988. 215 с.
9. Havir E.A. Phenylalanine ammonia lyase: purification and characterization from soybean suspension cultures // Arch. Biochem. Biophys. 1981. 211. P. 556-563.
10. Zucker M. Induction of phenylalanine ammonia lyase in Xanthium leaf disks: photosynthetic requirement and effect of daylength // Plant. Physiol. 1969. 44. P. 912-922.

STUDYING OF PROPERTIES OF FREE AND IMMOBILIZED L-PHENYLALANINE-AMMONIA-LYASE FROM *RHODOSPORIDIUM TORULOIDES* ON SILOHROME C-80

© 2012 O.O. Babich, L.S. Soldatova

Kemerovo Institute of Food Science and Technology

L-phenylalanine-ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides* immobilized with glutaraldehyde on silochrome C-80. Thermo- and pH-stability of free and immobilized preparation L-phenylalanine-ammonia-lyase, change of its activity at storage is studied. Dependence of activity of free and immobilized enzymatic preparation from a protein concentration in a reactionary mix and concentration of the buffer is investigated. The estimation of influence of concentration of L-phenylalanine on quantity of formed trans-cinnamonic acid is spent. The rate of desamination of L-phenylalanine at increase in temperature of an incubation.

Key words: L-phenylalanine-ammonia-lyase, immobilization, glutaraldehyde, phenylalanine, thermostability.