PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com

УДК 577.112.387.2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АДСОРБЦИОННОГО И ГЛУТАРАЛЬДЕГИДНОГО МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ НА ЧАСТИЦАХ FE_3O_4

Солдатова Л.С., Бабич О.О., Просеков А.Ю.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, e-mail: soldatovals@rambler.ru

Рассмотрены два различных метода иммобилизации L-фенилаланин-аммоний-лиазы на поверхности наночастиц Fe_3O_4: адсорбционный и глутаральдегидный. Установлено, что наиболее эффективным способом иммобилизации L-фенилаланин-аммоний-лиазы на частицах Fe_3O_4 является глутаральдегидный метод, позволяющий ковалентно присоединить 77% фермента. Показано, что оптимальными условиями функционирования иммобилизованного препарата в процессе биотрансформации фенилаланина является более широкий диапазон pH и температур по сравнению с нативным ферментом. Сделан вывод о практически полном сохранении активности иммобилизованной L-фенилаланин-аммоний-лиазы по истечении года хранения.

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

COMPARATIVE ESTIMATION OF ADSORPTION AND GLUTARALDEHYDE METHODS OF IMMOBILIZATION OF L-PHENYLALANINE-AMMONIA-LYASE ON PARTICLES FE_3O_4

Soldatova L.S., Babich O.O., Prosekov A.Y.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Kemerovo, e-mail: soldatovals@rambler.ru

Two various methods of immobilization of L-phenylalanine-ammonia-lyase on nanoparticles Fe_3O_4 are considered: adsorption and glutaraldehyde. It is established that most effective way of immobilization of L-phenylalanine-ammonia-lyase on particles Fe_3O_4 is glutaraldehyde method allowing to attach covalently 77% of enzyme. It is shown that optimum operating conditions of immobilized preparation in the course of a biotransformation of phenylalanine are wider range pH and temperatures in comparison with native enzyme. The conclusion is drawn on almost full preservation of activity by immobilizovan of L-phenylalanine-ammonia-lyase after a year of storage.

Keywords: L-phenylalanine-ammonia-lyase, immobilization, nanoparticles, glutaraldehyde

Фермент L-фенилаланин-аммоний-лиаза (ФАЛ, pal, КФ 4.3.1.5) катализирует неокислительное дезаминирование L-фенилаланина с образованием транс-коричной кислоты и свободного иона аммония. В настоящее время ФАЛ привлекает широкое внимание исследователей в связи с ее важной ролью в метаболизме растений [1].

ФАЛ является ключевым ферментом метаболизма фенилпропаноидов в растениях и грибах, где она принимает участие в биосинтезе вторичных метаболитов (флавоноидов, фуранокумаринов, компонентов клеточной стенки) и существует в виде множественных изоформ [2]. Первая трехмерная структура ФАЛ из дрожжей рода *Rhodosporidium toruloides* была определена с разрешением 2,1 А. На рис. 1 представлена пространственная структура ФАЛ, выделенной из дрожжей рода *R. toruloides* [3].

Молекулярная масса ФАЛ составляет 76880 Да. Молекула ФАЛ состоит из 716 аминокислотных остатков [3]. Оптимум pH для ФАЛ обычно находится в диапазоне от 8,2 до 9,0. Температурный оптимум составляет от 35 до 55 °С в зависимости от источника получения фермента [3].

Накоплены убедительные аналитические и экспериментальные данные о возможности использования ФАЛ при разработке специализированных продуктов для больных фенилкетонурией [4]. Емкость российского рынка на данный препарат составляет более 1 млн евро.

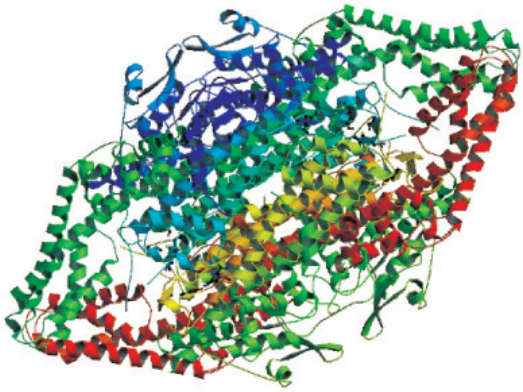


Рис. 1. Пространственная структура L-фенилаланин-аммоний-лиазы

Важное значение, которое в настоящее время приобрели ферментные препараты ФАЛ в процессе биотрансформации фенилаланина, делает весьма актуальной задачу разработки простых и эффективных методов их иммобилизации на различных носи-

PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com

телях с максимальным сохранением активности в твердой фазе.

Иммобилизация, как правило, приводит к снижению активности фермента за счет диффузионного сопротивления, экранирования активного центра, конформационной модификации белка [5]. С другой стороны, активность иммобилизованных ферментов может полностью сохраняться или повышаться. За счет повышения стабильности фермента при иммобилизации количество превращенного с его помощью субстрата существенно возрастает [5, 6].

Известен метод иммобилизации ФАЛ на полиэфирных пленках. [7]. Рассчитанная величина удельной активности иммобилизованного фермента составила $1{,}4 \cdot 10^{-1}$ ед./мг. В данном случае иммобилизованный фермент используется для определения фенилаланина в моче при диагностике фенилкетонурии. Однако данный метод иммобилизации обладает рядом недостатков (низкая механическая прочность носителя, нестабильность препарата), которые препятствуют широкому использованию иммобилизованной ФАЛ в производстве.

Целью настоящего исследования являлась сравнительная характеристика физического (адсорбционного) и химического (глутаральдегидного) способов иммобилизации ФАЛ на магнитных наночастицах Fe_3O_4. Выбор наноразмерного носителя для иммобилизации фермента обусловлен ценными для биотехнологического применения физико-химическими свойствами нанообъектов. Наночастицы имеют размеры, соизмеримые с размерами клеток (10–100 нм), вирусов (20–450 нм), белков (5–50 нм) или генов (2 нм в ширину и 10–100 нм в длину) [8]. Кроме того, наночастицы характеризуются высокоразвитой активной поверхностью и высокой сорбционной емкостью, благодаря чему могут быть модифицированы органическими молекулами, что создает возможности для последующего присоединения биообъектов.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлся фермент L-фенилаланин-аммоний-лиаза, выделенный из *Rhodotorula glutinis* (11,9 мг белка/мл; 0,87 ед./мг), из Sigma-Aldrich-Louis (США), который использовался без дополнительной очистки и хранился при температуре – (20 ± 1) °С.

Для получения наночастиц Fe_3O_4 использовали методику Массарта – взаимодействие 0,25 М растворов хлоридов железа (II) и (III) в соотношении 1:2 при комнатной температуре с добавлением 30 %-го водного раствора NH_4OH [9]:

$$FeCl_2 + 2FeCl_3 + 8NH_3 \cdot H_2O \rightarrow Fe_3O_4 + 8NH_4Cl + 4H_2O.$$

Применяли следующие методы иммобилизации L-фенилаланин-аммоний-лиазы на частицах Fe_3O_4:

1. Сорбция фермента на поверхности наночастиц Fe_3O_4. Готовили 500 мкл суспензии наночастиц Fe_3O_4 в 10 мМ боратном буферном растворе (pH 8,5). К 500 мкл полученной суспензии наночастиц Fe_3O_4 добавляли 20 мкл ФАЛ (11,9 мг белка/мл; 0,87 ед./мг) и перемешивали в колбе с помощью магнитной мешалки в течение 2 ч при температуре 25 °С. Полученную смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин, осадок промывали 10 мМ боратным буфером, затем дистиллированной водой до отсутствия белка в промывных водах.

2. Ковалентное связывание фермента с поверхностью наночастиц Fe_3O_4 посредством глутарового альдегида. Готовили 500 мкл суспензии наночастиц Fe_3O_4 в 10 мМ боратном буферном растворе (pH 8,5), которую предварительно обрабатывали γ-аминопропилтриэтоксисиланом для введения аминогрупп, а затем инкубировали с 200 мкл 50 %-го глутарового альдегида в течение 2 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании, после чего промывали три раза 10 мМ боратным буферным раствором. На следующем этапе иммобилизации инкубировали 500 мкл суспензии наночастиц в 10 мМ боратном буферном растворе (pH 8,5) с 50 мкл ФАЛ (11,9 мг белка/мл; 0,87 ед./мг) при комнатной температуре в течение 6 чв. Для определения количества иммобилизованного фермента измеряли концентрацию белка в контактном растворе. По окончании иммобилизации наночастицы промывали буферным раствором до исчезновения активности в промывных водах.

Анализ гранулометрического состава синтезированных наночастиц Fe_3O_4 осуществляли с использованием лазерного дифракционного анализатора размеров частиц «Shimadzu SALD 7101» (Япония).

Для изучения морфологии частиц Fe_3O_4 методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) использовали растровый электронный микроскоп «JSM-7500 FA» (Япония).

Энергодисперсионный элементный анализ порошка Fe_3O_4 проводили в процессе исследования морфологии частиц при помощи специализированной приставки к СЭМ (Япония).

Анализ гранулометрического состава, морфологии и энергодисперсионный анализ наночастиц осуществляли на базе Научно-образовательного инновационного центра «Наноматериалы и нанотехнологии» Томского политехнического университета.

Эффективность иммобилизации ФАЛ оценивали по разности концентраций белка в реакционной смеси до и после инкубирования фермента с наночастицами. 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 (pH 8,7; 30 °С) [10]. Количество образующейся транс-коричной кислоты рассчитывали по увеличению светопоглощения с использованием молярного коэффициента экстинкции, равного 10^4 дм$^3 \cdot$см$^{-1} \cdot$моль$^{-1}$ [11]. Одна единица активности определяется как количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль транс-коричной кислоты за 1 мин в условиях реакции.

PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com

Результаты исследования и их обсуждение

Рассматриваемые методы иммобилизации ФАЛ включают предварительную стадию подготовки материала носителя – наночастиц Fe_3O_4.

В ходе исследования были получены частицы сферической формы, представляющие собой жесткие агломераты размером от 0,2 до 6,0 мкм, состоящие из наночастиц размером от 10 до 100 нм (рис. 2).

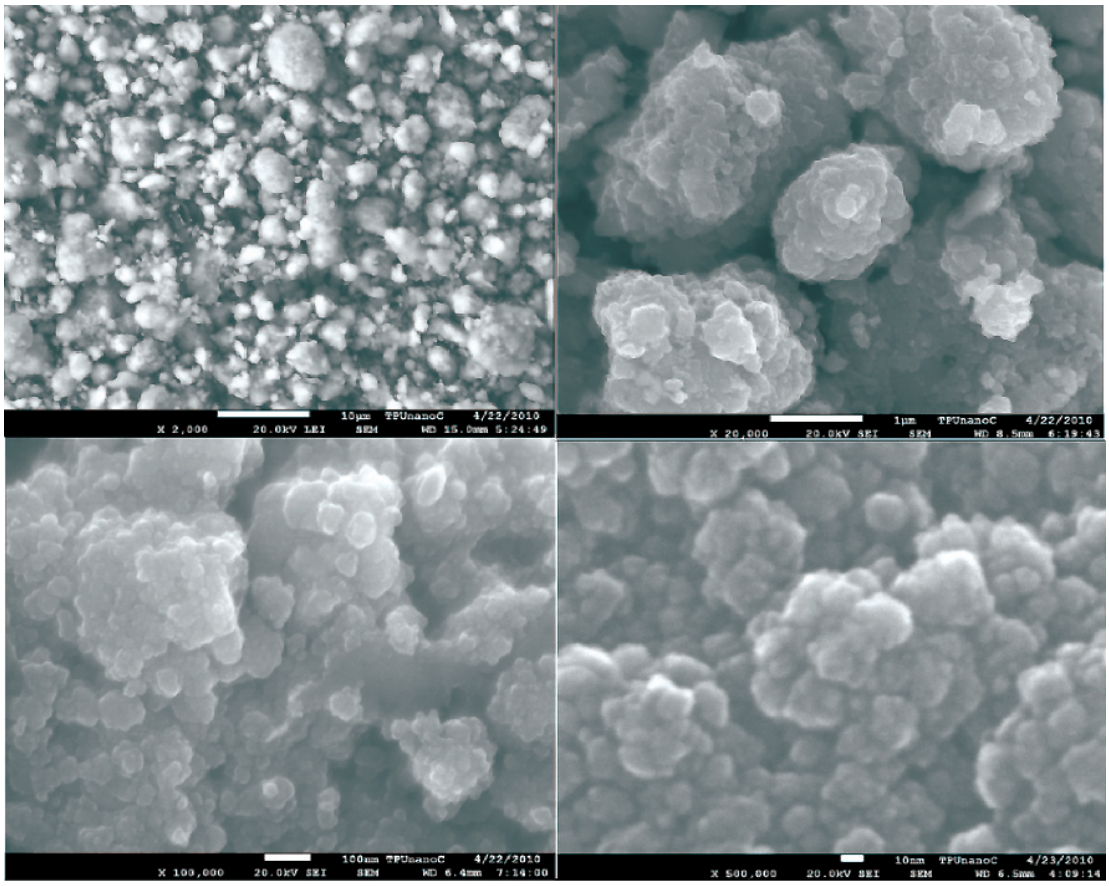


Рис. 2. Микрофотография наночастиц Fe_3O_4, полученная с использованием сканирующей электронной микроскопии (снимки с разным увеличением)

Результаты энергодисперсионного элементного анализа порошка Fe_3O_4, представленные в виде таблицы списка идентифицированных элементов и их кислородных соединений, а также в виде спектров характеристического излучения, на основе которых проводилось качественное и количественное определение содержания элементов на анализируемой поверхности, свидетельствуют о том, что химический состав полученного порошка действительно соответствует формуле Fe_3O_4 (рис. 3, табл. 1).

Метод картирования позволил выявить в порошке Fe_3O_4 наличие редких включений кремния и алюминия (оксиды) в виде частиц размером 5–20 мкм, а также частиц углерода размером до 15 мкм.

Удельная активность исходного нативного препарата составляла 0,87 ед./мг, pH-оптимум 8,0; температурный оптимум 30,0 ± 2,0ºС; изоэлектрическая точка 5,20 ± 0,05.

Таблица 1

Идентифицированные компоненты в составе порошка Fe_3O_4

Химическая формула	Массовый процент	Молярный процент
C	46,66	0,00
O	-	-
Al_2O_3	0,88	1,34
SiO_2	3,65	5,33
Fe_3O_4	81,79	46,67

Сравнительная характеристика ФАЛ, иммобилизованной на наночастицах Fe_3O_4 различными способами, представлена в табл. 2.

PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com

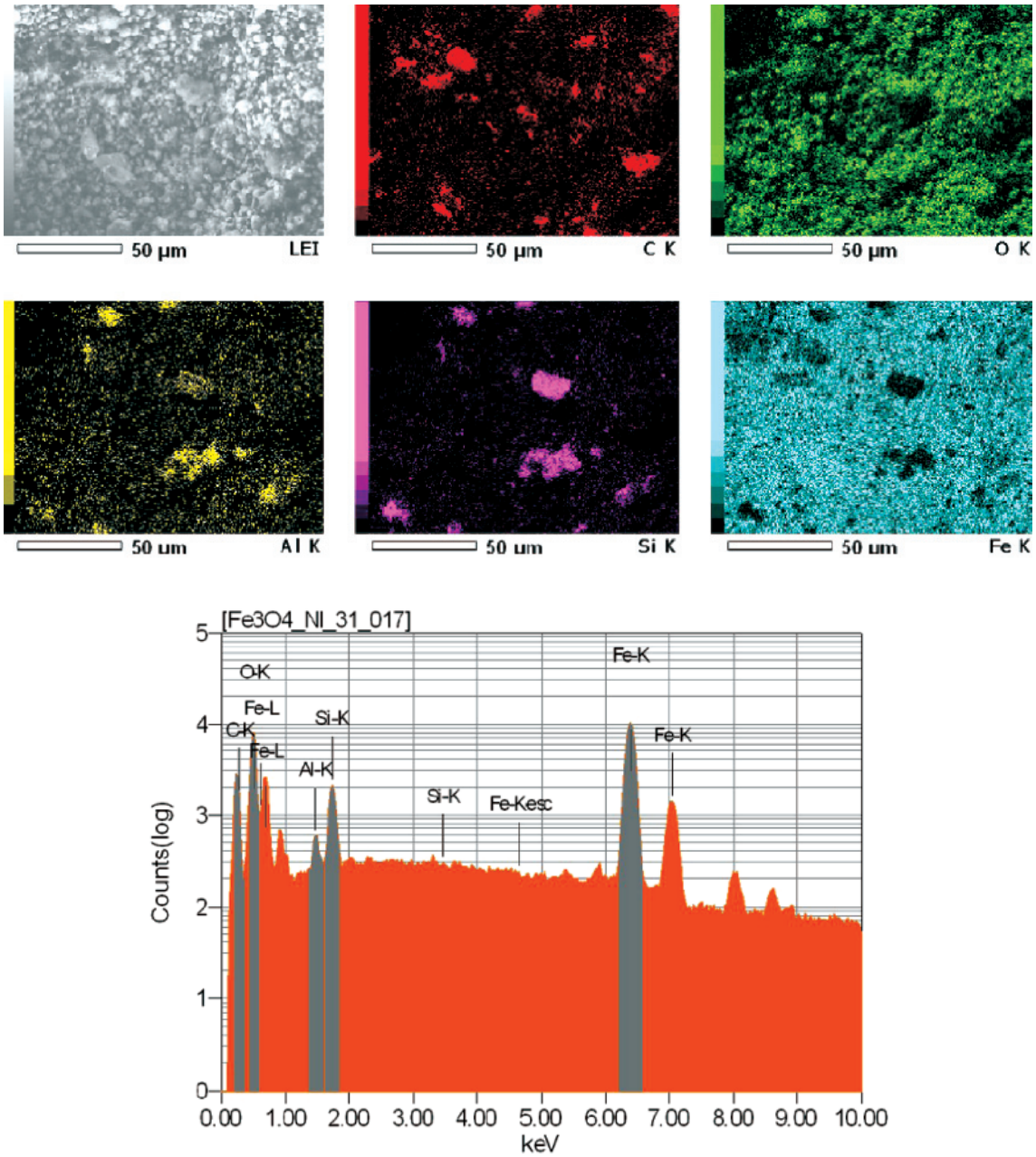


Рис. 3. Результаты энергодисперсионного элементного анализа порошка Fe_3O_4

Таблица 2

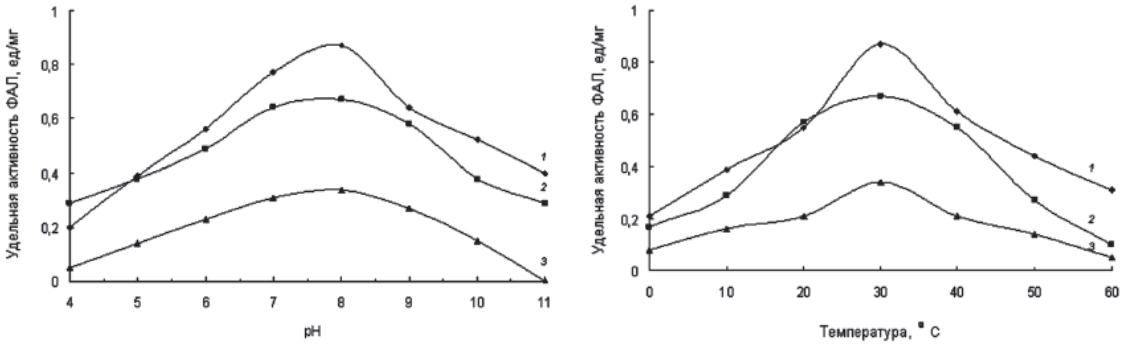
Характеристики ФАЛ, иммобилизованной на наночастицах Fe_3O_4 с использованием физического и химического способов

Способ иммобилизации фермента	Удельная активность препарата, ед./мг	Активность иммобилизованного препарата, % от нативного	Оптимальный диапазон pH	Температурный оптимум, °C
Нативный фермент	0,87	100,0	8,0 – 8,2	28,0 – 32,0
Адсорбционный	0,34	39,1	7,0 – 8,0	28,0 – 32,0
Глутаральдегидный	0,67	77,0	7,0 – 8,0	25,0 – 35,0

PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com
PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com

Как следует из данных табл. 2, в случае использования обоих рассматриваемых вариантов иммобилизации (адсорбционного и глутаральдегидного) инкубация ФАЛ с наночастицами Fe_3O_4, модифицированными глутаровым альдегидом, в течение шести часов приводит к переходу 39% изучаемого фермента в твердую фазу, в случае адсорбционного метода этот показатель составляет 77%. Представленные данные свидетельствуют об относительно слабом воздействии частиц Fe_3O_4 на конформационные молекулы фермента при ковалентной иммобилизации и о незначительном сорбционном взаимодействии фермента с наноразмерной матрицей. Следовательно, более предпочтительным методом иммобилизации ФАЛ на магнитных наночастицах Fe_3O_4 является ковалентное связывание посредством глутарового альдегида.

В результате исследования физико-химических свойств нативного и иммобилизованного различными методами фермента показано, что и нативная, и иммобилизованная ФАЛ проявляют максимальную каталитическую активность при pH 8,0 в случае всех рассмотренных методов иммобилизации (рис. 4-а), однако диапазон оптимальных значений pH для иммобилизованного фермента значительно шире (7,0–8,0), чем для свободной ФАЛ (наблюдается существенное снижение ферментативной активности при pH ниже 7,5 и выше 8,0).



а б

Рис. 4. Зависимость удельной активности нативной и иммобилизованной ФАЛ от pH (а) и температуры (б) реакции:
1 – нативный фермент; 2 – фермент, иммобилизованный глутаральдегидным способом;
3 – фермент, иммобилизованный адсорбционным способом

Оптимальная температура действия нативной и иммобилизованной ФАЛ составляет 30 °С, однако ковалентная иммобилизация позволяет расширить диапазон оптимальных температур по сравнению с нативным ферментом (рис. 4,б). Стабилизирующее действие наночастиц Fe_3O_4 на ФАЛ, вероятно, обусловлено стабилизацией конформационной структуры молекулы белка в результате его взаимодействия с нанообъектами.

На основании данных, полученных при исследовании стабильности ферментных препаратов при хранении в сухом, защищенном от света месте при температуре – (20 ± 2) °С (рис. 5), можно сделать вывод о стабилизации ФАЛ за счет иммобилизации на частицах Fe_3O_4. Препараты нативной ФАЛ практически полностью инактивировались через 8 месяцев хранения, в то время как фермент, иммобилизованный адсорбционным методом, через 10 месяцев сохранял 90% активности. С другой стороны, для фермента, ковалентно связанного с наночастицами Fe_3O_4, через год сохранялось 95% активности.

Выводы

Таким образом, в ходе исследования показаны преимущества ковалентной иммобилизации ФАЛ на магнитных наночастицах Fe_3O_4 перед адсорбционной иммобилизацией. Полученный иммобилизованный ферментный препарат ФАЛ отличается высокой удельной активностью и стабильностью, что позволяет многократно осуществлять процесс биотрансформации фенилаланина с сохранением каталитической активности. Данная работа открывает перспективы последующего использования предлагаемого метода иммобилизации ФАЛ при биотрансформации фенилаланина с целью разработки технологии специализированных продуктов питания для больных фенилкетонурией.

PDF-TOOLS Click to buy NOW! www.docu-track.com

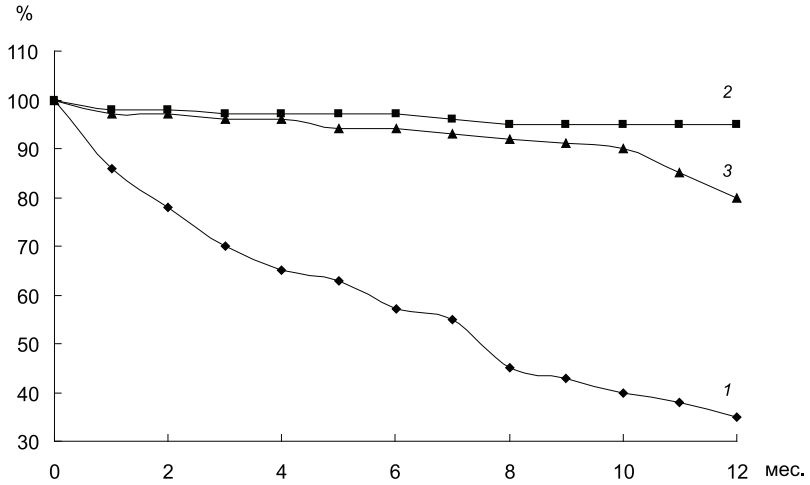


Рис. 5. Зависимость каталитической активности ФАЛ от продолжительности хранения: 1 – нативный фермент; 2 – фермент, иммобилизованный глутаральдегидным методом; 3 – фермент, иммобилизованный адсорбционным методом

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. Dale Y., Mackey V., Mushi R., Naynda A., Maleque M., Ike J. // J. Chrotogr. – 2003. – №788. – P. 1–8.

2. Wibrand F. // Clin. Chim. Acta. – 2004. – №37. – P. 89–96.

3. MacDonald M.J., D´Gunha G. // Biochem. Cell Biol. – 2007. – 5. – P. 273–282.

4. Cochrane F.C., Davin L.B., Lewis N.G. // Phytochemistry. – 2004. – №8. – P. 1557–1564.

5. Hong J., Xu D., Gong P. et al // Microporous Mesoporous Mater. – 2008. – 109. – №6. – P. 470–477.

6. Johnson A.K., Zawadzka A.M., Deobald L.A. et al // J. Nanopart. Res. – 2008. – №10. – P. 1009–1025.

7. Selma A., Nergiz S.D. // Turkish journal of biochemistry. – 2010. – №35. – P. 58–62.

8. Гусев А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. – М.: Физматлит, 2005. – 416 с.

9. Massart R. // IEEE Trans. Magn. – 1981. – 17. – P. 1247–1248.

10. Havir E.A. // Arch. Biochem. Biophys. – 1981. – № 211. – P. 556–563.

11. Zucker M. // Plant. Physiol. – 1969. – № 49. – P. 912–922.

Рецензенты:

Майоров А.А., д.т.н., профессор, директор ГНУ «Сибирский НИИ сыроделия Сибирского отделения Россельхозакадемии», г. Барнаул;

Гаврилов Г.Б., д.т.н., профессор, директор ГУ ЯО ЯГИКСПП, г. Ярославль.

Работа поступила в редакцию 24.06.2011.