

УДК 577.152.11:663.11

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ТИАМИНКИНАЗЫ ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

И.П. Черникевич, д.х.н., профессор

Кафедра общей и биоорганической химии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Осуществлена иммобилизация тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) из *Saccharomyces carlsbergensis* в гранулы альгината кальция. Показано, что наибольшей активностью обладают препараты, полученные при применении в качестве исходного раствора 0,4 М хлорида кальция с добавлением этанола и последующей инкубацией гранул в 0,2 М CaCl_2 . Внесение в систему феррицианида калия увеличивает активность препарата на 26 – 30%. Выявлен стабилизирующий эффект бычьего сывороточного альбумина. Наиболее стабильным в реакционных условиях оказался препарат иммобилизованной тиаминкиназы, обработанный дополнительно 0,25% раствором глutarового диальдегида и содержащий в качестве стабилизирующей добавки феррицианид калия. Без заметной потери активности он может храниться не менее 3 месяцев или быть использован более 9 раз.

Ключевые слова: тиаминкиназа, иммобилизация.

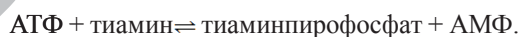
*The immobilization of thiamine kinase (EC 2.7.6.2) from *Saccharomyces carlsbergensis* into calcium alginate granules has been performed. It has been shown that the highest activity is characteristic of those preparations which are obtained with the use of the basic solution of 0.4 M calcium chloride with ethanol addition and subsequent incubation of granules in 0.2 M CaCl_2 solution. The introduction of kalium ferricyanide into the system increases the activity of the preparation by 26 – 30%. The stabilizing effect of bovine serum albumin has been revealed. The highest stability in reactivation state has been shown by the preparation of immobilized thiamine kinase which underwent additional treatment with 0.25% solution of glutaric dialdehyde and which contains kalium ferricyanide as a stabilizing additive. Showing no marked activity loss it can be stored for no less than 3 months or it can be used for more than 9 times.*

Key words: thiamine kinase, immobilization.

В основе разработок по биологическому катализу лежит уникальная способность ферментов в десятки и сотни тысяч раз ускорять реакции, идущие в условиях физиологических температур, pH среды и давления, что заметно удешевляет технологические процессы. Высокая специфичность ферментативного катализа обеспечивает большие выходы продукта и позволяет создавать практически безотходные производства, не загрязняющие окружающую среду.

Как правило, большинство ферментов, будучи извлеченными из своего естественного окружения, становятся весьма лабильными, т.е. быстро инактивируются при хранении, повышении температуры, изменении pH, под действием различных химических агентов. Именно это обстоятельство во многом препятствует технологическому применению биокатализаторов. Существенные успехи в этом направлении были достигнуты при иммобилизации ферментов. Фиксация фермента на водонепроницаемом носителе, либо включение его в структуру носителя позволяет использовать такой препарат многократно и значительно увеличить стабильность, что является экономически выгодным.

В качестве перспективного биокатализатора для промышленного использования выступает тиаминкиназа, катализирующая двухсубстратную реакцию переноса пирофосфатной группировки от молекулы АТФ на тиамин:



К настоящему времени фермент выделен в высокоочищенном состоянии из печени крысы [1], мозга свиньи [9], листьев петрушки [12], пивных дрожжей [3]. Описаны кинетическая модель функционирования тиаминкиназы, ее субстратная специфичность, аллостерическая регуляция ионами металлов, механизм действия, пространственная организация [7]. Однако высокоочищенная молекула в водном растворе теряет до 40% исходной активности уже в первые трое суток хранения. Обычно низкую стабильность имеют аллостерические ферменты, обладающие четвертичной структурой со слабо свя-

занными субъединицами, легко диссоциирующими и подвергающимися быстрым необратимым изменениям после диссоциации [6]. Тиаминкиназа относится к классу регуляторных диссоциирующих ферментов [4]. Нарушение четвертичной структуры фермента зависит от его концентрации в растворе, pH, ионной силы раствора. Реассоциировать отдельные диссоциированные субъединицы при этом не удается [4]. Неустойчивость тиаминкиназы при ее явном промышленном назначении определила необходимость поиска путей стабилизации фермента введением в водонерастворимые матрицы.

Материалы и методы

Выделение и очистку тиаминкиназы проводили описанным ранее методом [3]. Ферментативную активность определяли по методу [10] с модификациями, описанными в работе [3]. Количество образовавшегося в тиаминкиназной реакции тиаминпирофосфата находили при помощи апопируватдекарбоксилазы [13]. Активность рекомбинированной в течение 30 мин при 20°C и pH 6,8 холопируватдекарбоксилазы, пропорциональную содержанию тиаминпирофосфата в пробах, определяли по убыли НАДН в присутствии алкогольдегидрогеназы [11]. Калибровочный график строили с хроматографически чистым препаратом тиаминпирофосфата. Белок определяли по методу Брэдфорд [8] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Удельную активность тиаминкиназы выражали в нмоль тиаминпирофосфата, образовавшегося за 1 ч при 40°C в расчете на 1 мг белка ферментного препарата.

Для иммобилизации использовали модифицированный метод Кирстена и Бьюка [5]. Осторожно смешивали равные объемы (по 1 мл) раствора альгината натрия (в связи с тем, что проводилась иммобилизация фермента, а не клеток, была взята максимально возможная концентрация альгината – 5% раствор) и раствора фермента. Полученную смесь капали с высоты около 20 см из шприца емкостью 2 мл с иглой диаметром 1 мм в избыток раствора CaCl_2 различной концентрации. При этом соблюдалось соотношение между объемами смеси фер-

мент-альгинат натрия и раствора CaCl_2 равное 1:10. Сформированные гранулы геля альгината кальция, с включённым в них ферментом, оставляли в растворе CaCl_2 на 20 мин для затвердевания. Полученные частицы подвергали дополнительной инкубации в течение разного периода времени в 0,2 М хлориде кальция, взятом в объёме в два раза меньше, чем исходный раствор CaCl_2 , использовавшийся для формирования гранул. При промывке и хранении альгинатных гранул применяли раствор, имеющий следующий состав: 0,01 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,5, + 0,01 М CaCl_2 .

С целью уменьшения диаметра гранул в смесь фермент / альгинат натрия добавляли этанол в количестве 10% объёма от объёма смеси и исследовали активность препаратов иммобилизованного фермента, полученных с добавлением или без добавления этанола.

Влияние способа иммобилизации на активность иммобилизованного фермента изучали в диапазоне концентраций раствора CaCl_2 , использовавшегося для формирования гранул: 0,25–0,5 М, с шагом 0,05 М, при условии наличия и отсутствия этанола в смеси раствор фермента/ альгинат натрия. При этом рассчитывалась сохранённая активность (%), равная отношению активности иммобилизованного фермента к активности свободного, взятого для иммобилизации. Определялась также активность (%), потерянная при иммобилизации с не включившимся в гранулы белком, в растворах, использовавшихся для формирования, стабилизации и промывки гранул. Одновременно рассчитывалась потерянная только при иммобилизации активность (%), без учёта активности, утраченной с не включившейся в гранулы тиаминокиназой. За 100% принималась общая активность свободного фермента, взятого для иммобилизации.

Дополнительная стабилизация гранул осуществлялась добавлением к смеси фермент / альгинат стабилизирующих агентов: полиэтиленгликоля разной концентрации, бычьего сывороточного альбумина (1%), глутарового диальдегида (2,5%) и /или феррицианида калия (0,02 М).

Операционную стабильность иммобилизованной тиаминокиназы определяли по числу реакционных циклов. Когда количество образовавшегося продукта реакции достигало 50%, реакционную смесь декантировали, гранулы отмывали 0,01 М натрий-ацетатным буфером, pH 5,5, содержащим 0,01 М CaCl_2 , и использовали для повторного определения активности. Концентрацию белка в гранулах находили как разность между количеством белка, взятым до иммобилизации, и количеством его в растворах, в которых обрабатывались гранулы. Для полноты элюции макромолекул из гранул последние разрушали с помощью гомогенизатора в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,5, с дальнейшим центрифугированием смеси в течение 7 мин при 7000 об/мин и определением количества белка в супернатанте. Результаты прямого и косвенного методов экстракции тиаминокиназы практически совпадали.

Приведенные в работе данные рассчитаны при уровне значимости 0,05 для не менее трёх измерений. Обработка и построение графических зависимостей осуществлялась с помощью программы «Microsoft Excel».

Результаты и их обсуждение

Результаты по изучению зависимости активности иммобилизованных препаратов частично очищенного и высокоочищенного фермента от концентрации CaCl_2 и наличия этанола приведены в таблице 1. Известно, что увеличение поверхности катализатора при проведении гетерогенного катализа и, в частности, катализа иммоби-

лизированными ферментами, часто влияет на скорость реакции. Как видно из таблицы, внесение этанола при проведении иммобилизации в количестве 10% от объёма смеси фермент/альгинат натрия вызвало уменьшение объёма гранул, что наблюдалось как в случае частично очищенного, так и высокоочищенного препарата фермента. Однако активность иммобилизованной тиаминокиназы увеличивается только в случае частично очищенного фермента. Меньший размер гранул обеспечивает лучший доступ субстрата к ферменту - эффективность использования биокатализатора повышается. Снижение активности препарата высокоочищенной тиаминокиназы в присутствии этанола может быть следствием большей чувствительности гомогенного фермента к денатурирующему действию органического реагента.

Увеличение концентрации матричного раствора CaCl_2 (табл. 1) также вызывает уменьшение объёма гранул, но после концентрации 0,4 М для частично и 0,35 М для высокоочищенной тиаминокиназы активность иммобилизованного фермента практически не возрастает.

Таблица 1 – Влияние концентрации CaCl_2 и наличия этанола на активность иммобилизованных препаратов частично очищенной (ЧО) и высокоочищенной (ВО) тиаминокиназы

[CaCl_2], М	Наличие этанола	Объём гранул, мкл		Активность иммобилизованной тиаминакиназы, нмоль/(ч·мг)	
		ЧО	ВО	ЧО	ВО
0,25	-	12,0±0,3	11,7±0,1	72,6±2,1	310,2±3,4
0,25	+	11,4±0,4	11,3±0,1	84,0±2,9	245,0±4,7
0,3	-	11,5±0,2	11,0±0,1	79,1±6,7	391,8±3,9
0,3	+	11,2±0,4	10,1±0,2	106,3±5,0	357,2±4,4
0,35	-	11,6±0,3	10,3±0,1	119,0±6,2	604,0±5,0
0,35	+	10,9±0,2	9,9±0,1	141,7±7,4	556,1±2,8
0,4	-	10,0±0,1	9,0±0,2	133,2±3,8	541,0±4,3
0,4	+	9,1±0,2	8,3±0,1	158,6±6,7	398,4±2,3
0,5	-	9,0±0,2	8,4±0,1	80,4±4,8	476,2±8,9
0,5	+	8,3±0,2	8,0±0,1	96,1±2,4	403,1±6,2

Таким образом, исходя из полученных данных, лучшими вариантами иммобилизации является использование в качестве матричного раствора 0,4 М хлорида кальция с добавлением этанола в смесь альгинат/фермент для частично очищенного препарата фермента, а для высокоочищенного - 0,35 М хлорида кальция при отсутствии этанола.

Таблица 2 – Влияние условий иммобилизации тиаминокиназы на эффективность способа иммобилизации

[CaCl_2], М	Наличие этанола	Количество иммобилизованного белка, %, ⁺	Сохранённая активность, %	Потерянная активность, %, ⁺⁺
0,2	-	14	12	47
0,2	+	9	15	40
0,25	-	30	39	36
0,25	+	24	44	38
0,35	-	26	42	31
0,35	+	22	43	29
0,4	-	23	45	33
0,4	+	20	49	26
0,5	-	36	8	37
0,5	+	32	15	32

Примечание: ⁺ за 100% принято количество белка, взятое для иммобилизации; ⁺⁺ без учёта активности, потерянной с не включившимся в гранулы белком.

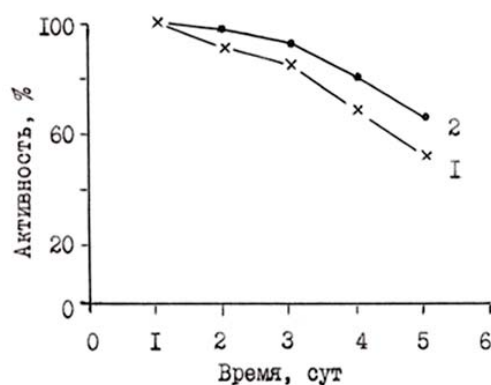


Рисунок 1 – Стабильность иммобилизованного (1 – без этанола, 2 – с этанолом) препарата частично очищенной тиаминкиназы при хранении

При определении эффективности способа иммобилизации было установлено, что наименьшее влияние на активность иммобилизованного фермента оказывает иммобилизация в гранулах, образованных с использованием 0,4 М CaCl_2 и этанола (табл. 2). В этих условиях наблюдается наименьшая доля потерянной при иммобилизации активности, при наибольшей доле сохранённой. Количество иммобилизованного белка непосредственно влияет на эффективность способа иммобилизации. После достижения определённой концентрации белковых молекул внутри гранулы геля увеличение количества молекул фермента начинает лимитировать доступ субстрата к активным центрам. В результате процент сохранённой при иммобилизации активности будет уменьшаться, что и наблюдалось в нашем случае при начальной концентрации матричного раствора хлорида натрия 0,4 М.

Для наиболее оптимальных вариантов иммобилизации были проведены исследования по стабильности иммобилизованных препаратов тиаминкиназы. Как оказалось, добавление этанола, кроме увеличения активности, способствует увеличению стабильности при хранении иммобилизованных препаратов частично очищенного фермента (рис. 1).

Обнаружено также, что дополнительная инкубация полученных гранул в 0,2 М растворе хлорида кальция ведет к увеличению операционной стабильности в зависимости от времени инкубации (табл. 3). Под операционной стабильностью понималась возможность многократно

Таблица 3 – Зависимость операционной стабильности гранул от времени дополнительной инкубации в 0,2 М CaCl_2

Время инкубации, мин	Исходная активность тиаминкиназы, нмоль/(ч·мг)	Остаточная активность, %	
		во втором полуцикле	в третьем полуцикле
[CaCl_2], нач. = 0,35 М, ВО тиаминкиназа, без этанола			
0	601,7 ± 2,6	19	4
20	570,3 ± 2,1	25	7
30	534,0 ± 1,9	36	11
45	172,1 ± 7,4	44	11
[CaCl_2], нач. = 0,4 М, ЧО тиаминкиназа, с этанолом			
0	79,0 ± 2,4	30	6
20	76,9 ± 2,7	54	10
30	71,0 ± 1,8	62	15
45	32,7 ± 4,3	65	16

Примечание: $p < 0,05$ по сравнению с контролями без инкубации.

го использования гранул. Начальную активность принимали за 100% (активность первого цикла), операционную стабильность иммобилизованного препарата оценивали в процентах от начальной.

При инкубации как частично очищенной, так и высокоочищенной иммобилизованной тиаминкиназы в течение 30 мин в 0,2 М CaCl_2 остаточная активность во 2-м полуцикле повышается почти вдвое, при этом уменьшение исходной активности не превышает 15%.

Исходная активность иммобилизованной тиаминкиназы с увеличением продолжительности инкубации в 0,2 М CaCl_2 постепенно снижается, а при инкубации в течение 45 мин ее уменьшение весьма значительно – для высокоочищенного препарата фермента в 3,1 раза, по сравнению с таковой при инкубации в течение 30 мин, для частично очищенной тиаминкиназы – в 2,2 раза. Сохранение 65% активности гранул дает возможность использовать их ещё раз, что важно для практического применения (табл. 3).

Таблица 4 – Активность иммобилизованной тиаминкиназы в присутствии стабилизирующих агентов

Стабилизатор	Активность, %	Стабильность, %
-	100	59
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	127	31
БСА	102	56
ПЭГ	104	43
БСА + $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	107	42
ГА	88	37
ГА + $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	131	18

Примечание: Стабильность иммобилизованного препарата определялась по количеству потерянной активности после первого цикла использования

Известно, что бычий сывороточный альбумин (БСА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), феррицианид калия и глутаровый диальдегид (ГА) являются стабилизаторами некоторых белков [2]. В таблице 4 приведены данные по влиянию указанных реагентов на активность и стабильность иммобилизованных препаратов тиаминкиназы.

Феррицианид калия увеличивает активность иммобилизованного фермента на 26-30%, по сравнению с гранулами без добавки, при этом во втором цикле использования сохраняется не менее 69% активности. Вероятно, прочный комплексный ион способен образовывать дополнительные координационные связи с молекулой фермента, стабилизируя таким образом его нативную конформацию. Наибольшую устойчивость тиаминкиназа проявляла при комбинированном воздействии на нее феррицианида калия с поперечносшивающим агентом – глутаровым диальдегидом. В этом случае активность оставалась достаточно высокой (около 40% активности к 9 полуциклу).

Гранулы, содержащие БСА и ПЭГ, обладают низкой стабильностью, а активность их изменялась незначительно. При внесении в гранулы с БСА феррицианида калия стабильность препарата возросла на 25% без существенного изменения активности.

Гранулы, содержащие феррицианид и ГА, оказались более устойчивыми и при хранении (рис. 2). Их можно хранить в течение 90 суток с потерей не более 36% активности, в то время как без стабилизатора – только 30 суток.

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы:

- иммобилизация тиаминкиназы в гранулы альгината кальция с внесением в систему феррицианида калия позволяет получать полупромышленные препараты фермента;

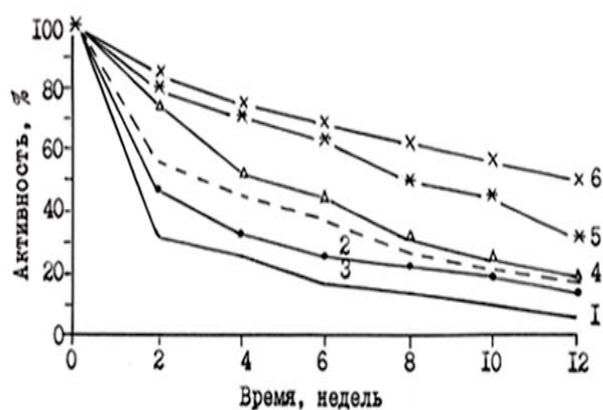


Рисунок 2 – Стабильность препаратов иммобилизованной тиаминкиназы, содержащей стабилизирующие белок агенты, во времени.
 Препараты тиаминкиназы: 1 – без стабилизирующих агентов; 2 – с феррицианидом калия; 3 – с БСА; 4 – с феррицианидом калия и БСА; 5 – с ГА; 6 – с феррицианидом калия и ГА

- для получения образцов промышленного назначения необходимо более жесткое связывание с матрицей с помощью бифункциональных реагентов, о чём свидетельствуют опыты с глутаровым диальдегидом, или, возможно, включение в полупроницаемые мембраны.

Литература

1. Арцукевич, И.М. Очистка и некоторые свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крыс / И.М. Арцукевич, А.И. Воскобоев // *Вопр. мед. химии.* – 1977. – Т.23, №2. – С. 203-210.

2. Березин, И.В. Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин. – М.: Высш. шк., 1987. – 224 с.
3. Воскобоев, А.И. Очистка и характеристика тиаминпирофосфокиназы из живых дрожжей / А.И. Воскобоев, Ю.М. Островский // *Биоорган. химия.* – 1975. – Т.1, №10. – С. 1489-1497.
4. Воскобоев, А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамина / А.И. Воскобоев, И.П. Черникович. – Минск.: Наука и техника, 1987. – 200 с.
5. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 543 с.
6. Курганов, Б.И. Аллостерические ферменты / Б.И. Курганов. – М.: Наука, 1978. – 248 с.
7. Черникович, И.П. Влияние субстратов, кофакторов и эффекторов на структуру и динамику тиаминкиназы из пивных дрожжей / И.П. Черникович, А.А. Маскевич // *Биоорган. химия.* – 1992. – Т.18, №4. – С. 509-530.
8. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – V.72, №2. – P. 248-254.
9. Hamada, M. Studies on thiamine pyrophosphokinase from heard muscle / M. Hamada // *J. Jap. Biochem. Soc.* – 1969. – V.41. – P. 837-842.
10. Mano, Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue / Y. Mano // *J. Biochem.* – 1960. – V.47. – P. 283-290.
11. Naveke, R. Wirkungsmechanismus von Thiaminpyrophosphat / R. Naveke, H. Holzapf // *Arch. Mikrobiol.* – 1962. – V.44. – P. 93-104.
12. Purification of and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsle leaf / H. Mitsuda [et al.] // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 1975. – V.21, №2. – P. 103-115.
13. Ullrich, J. Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylase, EC 4.1.1.1). Assay of thiamine pyrophosphate / J. Ullrich // *Method. Enzymol.* – 1970. – V.18A. – P. 109-228.

Поступила 10.02.10