

УДК 577.151.36

К.Г. ДЮКОВА*, А.А. АМБАРЦУМЯН, Г.П. АЛЕБЯН

ЗАО НИИ «Биотехнологии», Ереван, Армения, 0056

e-mail: karina_dukova@yahoo.com

Ковалентная иммобилизация очищенной тирозин-фенол-лиазы из *Citrobacter freundii* на неорганических носителях

Осуществлена иммобилизация очищенного препарата тирозин-фенол-лиазы (ТФЛ) из *Citrobacter freundii* на неорганических носителях на основе силикагеля и силихрома методом ковалентного связывания, и исследованы свойства иммобилизованного фермента. В качестве сшивающего агента для связывания модифицированного γ -аминопропилтриэтоксисилоном носителя и очищенного фермента использовали глутаровый альдегид. В результате указанной процедуры иммобилизации стабилизировалась активная форма фермента, время полуинактивации ТФЛ увеличилось до 25 сут, что значительно (в 5—20 раз) превосходит соответствующий показатель для интактных клеток, очищенного фермента, а также клеток, иммобилизованных в различные гели. Суммарная продуктивность иммобилизованной ТФЛ (количество продукта, синтезированного в течение 38 сут) составила ~207 г тирозина на 1 г протеина, что в 5 раз выше, чем продуктивность интактных клеток. Биокатализатор удобен в использовании и может быть легко отделен от кристаллического продукта.

Ключевые слова: биотрансформация, ковалентная иммобилизация, L-тирозин, тирозин-фенол-лиаза.

Ароматическая аминокислота L-тирозин является важной составляющей структуры почти всех природных белков. Она широко используется в качестве пищевой добавки и ценного продукта фармацевтической промышленности. В организме L-тирозин участвует в синтезе катехоламиновых гормонов адреналина и норадреналина, гормона щитовидной железы тироксина, ростового гормона растений индолилуксусной кислоты и мощного сосудосуживающего и нейрогуморального агента серотонина. L-Тирозин является предшественником многих алкалоидов, в частности морфина, кодеина и папаверина, соединений, представляющих собой короткие пептиды, например глутатиона, а также пептидных гормонов — брадикинина, окситоцина, ангиотензина и вазоп-

рессина [1]. В медицине применяют такие его производные, как иодтирозин, дибромтирозин. L-Тирозин и его ароматические производные используют для лечения заболеваний головного мозга, таких как Базедова болезнь и болезнь Паркинсона, фенилкетонурии (ФКУ) у пациентов, находящихся на строгой антифенилаланиновой диете и испытывающих тирозиновое голодание [2].

Число людей, нуждающихся в препаратах L-тирозина, растет из года в год [3]. На сегодняшний день для удовлетворения потребности республики Армения в L-тирозине необходимо осуществлять собственное производство данной аминокислоты. Реальным для небольшой страны может стать биотехнологическое производство L-тирозина, основанное на микробной трансформации,

Дюкова Карина Георгиевна, Амбарцумян Артур Альбертович, Алебян Гукас Петросович.

Список сокращений: ДЭАЭ — диэтиламиноэтил; МЭ — меркаптоэтанол; ПЛФ — пиридоксаль-5'-фосфат; ТФЛ — тирозин-фенол-лиаза; ФКУ — фенилкетонурия.

* Автор для переписки.

которое не требует больших капитальных вложений (сверхъемких ферментеров и крупных производственных площадей).

У большинства живых организмов L-тирозин синтезируется из L-фенилаланина. Однако промышленное производство L-тирозина и его производных в основном было сосредоточено на ферментативном синтезе из фенольных смол с помощью реакции, катализируемой ферментом тирозин-фенол-лиазой [4—6]. В настоящее время ТФЛ была обнаружена в различных мезофильных бактериях, таких как *Erwinia herbicola* [7, 8], *Escherichia intermedia* [6] и *Citrobacter freundii* [5], а также в термофильных бактериях *Symbiobacterium thermophilum* [9] и *Symbiobacterium toebii* [10].

В ранних исследованиях в качестве биокатализатора для синтеза L-тирозина были исследованы свободные и иммобилизованные мезофильные ТФЛ [4, 11], которые проявляли низкую активность и устойчивость к фенольным субстратам, а также нуждались в непрерывной подаче дорогостоящего пиридоксаль-5'-фосфата (ПДФ). Применение свободных клеток *C. freundii*, проявляющих стабильность даже в присутствии высоких концентраций фенольных веществ, в качестве биокатализатора привело к повышению производительности процесса по L-тироzinу (60—85 г/л) [12], хотя и создало другие проблемы. К их числу относится образование больших скоплений агрегатов клеток и осадка L-тирозина в среде, что приводило к потере активности фермента и постепенному снижению скорости реакции ($t_{1/2}$ — 12 ч). В этом случае повторное использование клеток исключалось вследствие невозможности отделения их от реакционной смеси.

Наконец, использование иммобилизованных в различных гелях (каррагинан, агар, желатина [13], полиакриламид [6, 14], влажный силикатный гель [15]) клеток, обладающих активностью ТФЛ показало, что гранулы низкоконтрированных гелей быстро разрушались и клетки бактерий легко вымывались из них, а при использовании концентрированных гелей значительно возрастали диффузионные затруднения для субстратов и продукта ферментативной реакции. Существенным недостатком применения таких биокатализаторов в синтезе тирозина являлась быстрая закупорка гранул геля осадком тирозина [13, 14], что в дальнейшем приводило к их разрушению. Данные биокатализаторы не нашли широкого применения, так как оказались нетехнологичными по причине низкой стабильности иммобилизованного фермента, недостаточной механической прочности, а также высокого содержания клеток бактерий в носителе.

Ни в одной работе с использованием иммобилизованного биокатализатора не был достигнут уровень накопления тирозина в реакционной смеси, сопоставимый или превышающий аналогичный показатель для растворимой ТФЛ, а такая важная характеристика, как t_S , не превышала 24 ч.

Методы генетической инженерии позволили в последнее время провести генетические манипуляции, увеличивающие продуктивность штаммов, синтезирующих L-тирозин, до 130 г/л [16]. Однако процессу с применением в качестве биокатализатора частично очищенной термо- и хемофильной ТФЛ из *Symbiobacterium thermophilum* присущи все те же вышеперечисленные недостатки, которые характерны для процесса с использованием в качестве биокатализатора нативных клеток ТФЛ ($t_{1/2}$ — 15 ч).

Несмотря на активные усилия в последние десятилетия только ограниченное число биокатализаторов успешно применяют для биотехнологического производства. Чтобы реализовать перспективный экологически чистый процесс, биокатализаторы для синтеза L-тирозина должны обладать не только высокой активностью и селективностью, но быть экономически эффективными, а также иметь высокий показатель оперативной стабильности и суммарной продуктивности. Кроме того, успешный биокаталитический процесс должен быть стабильным при высоких концентрациях субстрата и продукта. Хотя биокаталитический синтез L-тирозина растворимыми и иммобилизованными ТФЛ широко представлен в литературе [4, 11—17], остаются серьезные проблемы, которые должны быть решены для организации эффективного производства данной аминокислоты.

Целью данной работы являлась максимальная стабилизация активности ТФЛ в реакции синтеза тирозина при высоких концентрациях фенола (100 мМ). Кроме того, необходимо было решить проблему образования агрегатов клеток с осадком тирозина посредством ковалентной иммобилизации очищенной ТФЛ из *C. freundii* на поверхности носителей силикатной природы, которые обладают большой удельной поверхностью и размером пор, намного превышающим размеры как низкомолекулярных продуктов, так и белковой молекулы фермента.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы. В работе использованы аминокислоты L-тирозин (Reanal, Венгрия) и D,L-тирозин (Serva, США), глутаровый альдегид фирмы Reanal, пиридоксаль-5'-фосфат, пируват натрия

фирмы Serva (Германия), меркаптоэтанол (МЭ) фирмы LOBA Reinchemie (Австрия), силикагель (диаметр пор 231 Å, размер частиц 0,2—0,3 мм, удельная поверхность 200—220 м²/г, Chemapol) и силохром С-80 (диаметр пор 400—600 Å, размер частиц 0,35—0,5 мм, удельная поверхность 60—120 м²/г, Ставропольский завод химреактивов). Поливинилбутираль марки ПП и все остальные реактивы и препараты были производства стран СНГ и Республики Армения (квалификация х.ч.). CH₃(CH₂)₇Si(CH₃)₂Cl (диметилотилхлорсилан) и (C₂H₅O)₃Si(CH₃)NH₂ (γ-аминопропилтриэтоксисилан) синтезированы Н.А. Григорян в лаборатории инженерной энзимологии ЗАО НИИ «Биотехнологии».

Выделение и очистка ТФЛ из *C. freundii*. Все работы по выделению и очистке ТФЛ из *C. freundii* проводили при температуре 4°.

Разрушение клеток. Дезинтеграцию клеток осуществляли ультразвуковой обработкой в течение 20 мин при частоте звука 20 кГц и мощности 300 Вт (Labsonic 2000, В. Braun, Германия) в буфере А (50 мМ К,Na-фосфат, рН 8,0, 10 мМ МЭ). Осадок удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин (центрифуга К-24, Германия).

Фракционирование ферментного экстракта на ДЭАЭ-тойоперл 650 М. Грубый ферментный экстракт подавали на колонку (2,5×15 см) анионита — ДЭАЭ-тойоперл 650 М, уравновешенную буфером Б. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0—0,4 М) в буфере Б. Собирали фракции по 8—10 мл с помощью автоматического коллектора (Isco, США); активные фракции объединяли и использовали на следующем этапе.

Фракционирование на гидроксиапатите. Объединенный раствор активных фракций наносили на колонку (2,5×7 см) гидроксиапатита (Pharmacia, Швеция). Адсорбированные белки элюировали линейным градиентом концентрации К,Na-фосфатного буфера (0—0,3 М), рН 7,3, с 10 мМ меркаптоэтанолом. Фракции, обладающие активностью, объединяли, и белок осаждали сульфатом аммония при 75%-ном насыщении. Осадок отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме буфера А.

Гель-фильтрация. Полученный концентрированный раствор белков пропускали через колонку (1,5×54 см) тойоперла 55F (Toyo Soda, Япония), уравновешенную буфером А. Калибровку колонки проводили, используя следующие белки: ферритин (450 кДа), каталаза (240 кДа), альдолаза (60 кДа) и цитохром с (12,4 кДа) (все фирмы

Serva, США). Фракции белков, обладающие ТФЛ-активностью, объединяли и обессоливали на колонке (4,5×24 см) сефадекса G-25 С (Pharmacia), уравновешенной буфером Б (50 мМ трис-фосфатный буфер с различными значениями рН), после чего концентрировали на маленькой колонке (1×5 см) ДЭАЭ-тойоперла 650 М (Toyo Soda) [18].

Подготовка носителя. В качестве носителя для иммобилизации ТФЛ использовали силикагель и силохром (пористое стекло). Указанные носители дешевы, доступны и удобны в применении. Для удаления органических примесей и термической активации поверхности силикагель и силохром предварительно подвергали прокаливанию в течение 5 ч при температуре 500° [19].

Обработку носителя 3%-ным раствором поливинилбутираля в 96%-ном этиловом спирте с целью предохранения фермента от отрицательного воздействия поверхности носителя проводили при непрерывном перемешивании в течение 5—6 ч при температуре 25°. Полученную суспензию отфильтровывали на воронке Бюхнера, осадок промывали при комнатной температуре 96%-ным этиловым спиртом и подсушивали при температуре 80°.

Обработку носителя диметилотилхлорсиланом осуществляли при кипячении в толуольном растворе диметилотилхлорсилана с пиридином в течение 6 ч при температуре 105°. После промывки ацетоном обработанный носитель высушивали при температуре 80°.

Активацию носителей (модифицированных и необработанных) осуществляли 2%-ным раствором γ-аминопропилтриэтоксисилана в ацетоне при температуре 45° в течение 24 ч [19]. Содержание аминокрупп после активации, определенное методом титрования на поверхности носителя, для полученных препаратов составляло 80—100 микромолей NH₂/г носителя [20].

Иммобилизацию ТФЛ проводили следующим образом: 1 г активированного носителя перемешивали при температуре ~4° в 2%-ном растворе глутарового альдегида в течение 30 мин. Образовавшийся модифицированный носитель многократно промывали водой, после чего суспендировали в 10 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, рН 8,0, содержащего 20 мг растворенного очищенного препарата ТФЛ с удельной активностью 0,36 ед/мг, и инкубировали в течение 15 ч при температуре ~4°. Полученный биокатализатор промывали 4 раза 1 М раствором хлористого натрия и столько же раз холодной дистиллированной водой. Количество связанного белка оценивали по разности между взятым в реакцию белком и белком, определенным в маточных и промывных водах [21].

Иммобилизованные препараты хранили в 50 мМ К,Na-фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 5 мМ МЭ, при температуре 4°.

Измерение активности иммобилизованной ТФЛ производили в реакции α,β -элиминирования тирозина по накоплению образующегося пирувата [5]. Среда инкубации для определения активности ТФЛ имела следующий состав: 2,5 мМ L-тирозин, 0,1 мМ пиридоксальфосфат, 50 мМ К,Na-фосфатный буфер, рН 8. Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл, температура 30°. Реакцию начинали добавлением 0,1 г иммобилизованного препарата, через 10 мин реакционную смесь отделяли декантацией и кипятили в течение 3 мин на водяной бане. Концентрацию образующегося пирувата определяли по убыли поглощения NADH при λ 340 нм в реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой, на спектрофотометре UV-VIS (Perkin Elmer 340, США). За единицу ТФЛ-активности принимали количество фермента, обеспечивающее прирост пирувата, равный 1 мкмоль за 1 мин при температуре 30°.

Синтез тирозина. Реакционная смесь (общий объем 10 мл) содержала 0,1 М фенол, 0,45 М пируват натрия, 0,6 М ацетат аммония и 10^{-4} М пиридоксальфосфат. Реакцию проводили при постоянном интенсивном перемешивании, рН 8, температуре 30° и содержании связанного фермента в реакционной смеси 1—1,2 мг/мл. Через определенные промежутки времени, начиная с нулевого, из смеси отбирали аликвоты по 0,1 мл, осадок тирозина отделяли центрифугированием. Концентрацию фенола в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически по поглощению при λ 268 нм [22]. Количественное определение тирозина проводили на аминокислотном анализаторе Microtechna T 339 (Чехословакия).

Определение стабильности иммобилизованной ТФЛ осуществляли с помощью реакции синтеза тирозина, как описано выше.

Реакционную смесь непрерывно и интенсивно перемешивали и через каждые 24 ч (продолжительность одного цикла) декантировали; частицы катализатора (осадок) промывали небольшим количеством дистиллированной воды и повторно вводили в соответствующую реакционную среду. Через определенные промежутки времени определяли текущую ТФЛ-активность приготовленного биокатализатора.

Определение температурного и рН оптимумов. Активность иммобилизованного фермента измеряли при температуре от 20° до 60°, а также при значениях рН от 5 до 10, используя 50 мМ трис-фосфатный буфер с соответствующими значениями рН.

Стабилизация ТФЛ-активности. В качестве стабилизаторов ТФЛ-активности в процессе иммобилизации использовали субстраты и продукт синтеза (пируват натрия, ацетат аммония, L-тирозин, D,L-тирозин, глицерин и бычий сывороточный альбумин). Раствор очищенной ТФЛ в 50 мМ фосфатном буфере, рН 8,0, инкубировали с соответствующим стабилизатором при температуре 30° в течение 15 мин, после чего добавляли активированный глутаровым альдегидом носитель и проводили процедуру связывания фермента с носителем, как описано выше в соответствующем разделе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики иммобилизованной ТФЛ

Используя очищенную ТФЛ из клеток бактерии *C. freundii*, нами получено 5 образцов иммобилизованного фермента (1а, 1б, 2а, 2б, 2с). Некоторые характеристики полученных препаратов приведены в табл. 1.

Сравнение характеристик полученных образцов, приведенных в табл. 1, показывает, что иммобилизованные препараты ТФЛ сохраняют невысокую активность: на силихроме — 3—10 %, на силикагеле — 2—4 %. Полученные результаты можно объяснить или слишком жесткой фиксацией фермента на носителе, ограничивающей его конформационную подвижность и, следовательно, затрудняющей доступ к нему субстрата, или тем, что при фиксации фермента через аминокислотные группы затрагиваются структуры, входящие в состав его каталитического центра. Последнее предположение наиболее вероятно, так как хорошо согласуется с литературными данными о том, что в каталитический центр фермента входят именно аминокислотные группы [23]. Количество связанного белка в случае модифицированных носителей больше, однако при этом наблюдается не увеличение активности фермента в результате иммобилизации, а ее снижение. Анализ полученных данных показывает, что модификация поверхности носителя не способствовала увеличению активности полученных биокатализаторов, а наиболее высокая ТФЛ-активность наблюдается у биокатализатора 2а. Как следует из представленных результатов (см. табл. 1), за 24 ч реакции синтеза наибольшая глубина превращения фенола составляет 90,6 % (соответственно самое высокое значение накопленного количества тирозина) и принадлежит препарату 2а.

Синтез тирозина

Проведенные эксперименты показывают, что все образцы иммобилизованной ТФЛ способ-

Характеристики иммобилизованных препаратов ТФЛ

Иммобилизованные препараты ТФЛ		Связанный белок, мг/г _{кат}	Активность иммобилизованной ТФЛ, ед/г _{кат}	Активность иммобилизованной ТФЛ, % от исходной	Глубина конверсии фенола за 24 ч реакции синтеза тирозина, %
Название	Состав				
1а	Фермент, иммобилизованный на силикагеле	12,7	0,200	4,3	72,2
1b	Фермент, иммобилизованный на силикагеле с полимерным покрытием	14,9	0,098	1,8	48,7
2а	Фермент, иммобилизованный на силохроме	10,1	0,363	10,0	90,6
2b	Фермент, иммобилизованный на силохроме с полимерным покрытием	11,2	0,192	4,8	71,2
2с	Фермент, иммобилизованный на силохроме, обработанном диметил-октилхлорсиланом	17,5	0,147	3,4	78,0

ны синтезировать тирозин из фенола, пирувата и аммония. На рис. 1 представлены кинетические кривые, полученные в идентичных условиях, характеризующие снижение концентрации фенола в процессе реакции, обусловленное его потреблением в синтезе тирозина, для растворимой (см. рис. 1, 1) и иммобилизованной (образец 2а, см. рис. 1, 2) ТФЛ. Из графика видно, что в обоих случаях реакция протекает с большой глубиной конверсии фенола, равной ~ 90%. Для растворимого фермента такая конверсия достигается через 5 ч после нача-

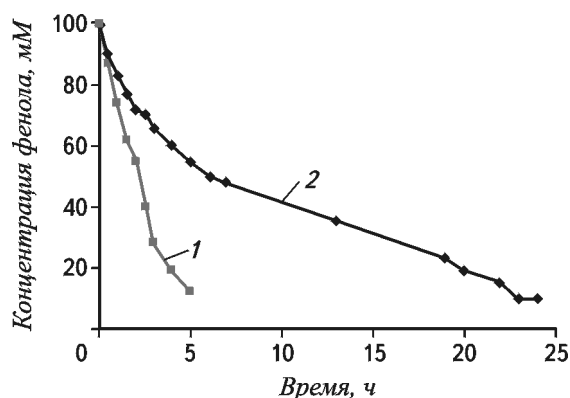


Рис. 1. Скорости потребления фенола в реакции синтеза тирозина, катализируемого свободной (1) и иммобилизованной (образец 2а, 2) ТФЛ. Концентрация растворенного и иммобилизованного фермента в реакционной смеси равна 2 и 1 мг/мл, соответственно

ла синтеза. Иммобилизованная ТФЛ осуществляет синтез тирозина медленнее, и скорость потребления фенола оказывается значительно ниже, чем у свободного фермента, а 90%-ная глубина конверсии достигается через 24 ч реакции.

Определение стабильности иммобилизованной ТФЛ

Результаты исследования динамики инактивации иммобилизованной ТФЛ в условиях синтеза тирозина в периодическом режиме приведены рис. 2.

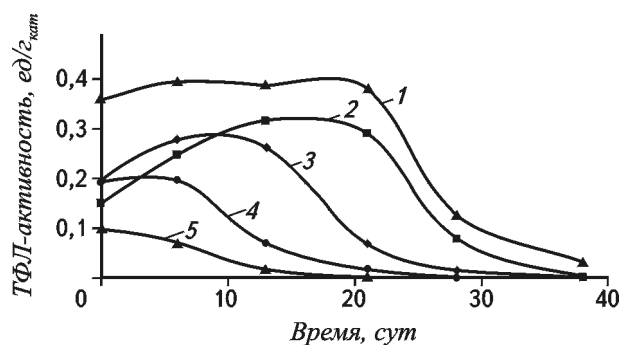


Рис. 2. Динамика инактивации различных образцов иммобилизованной ТФЛ в условиях синтеза тирозина в периодическом режиме (1 цикл — 1 сут): 1 — 1а; 2 — 1б; 3 — 2а; 4 — 2б; 5 — 2с

Из рис. 2 видно, что период полуинактивации иммобилизованных биокатализаторов равен 190—600 ч или 8—25 сут, в то время как показатель для фермента в растворе составляет 12—15 ч [12, 16]. Следует отметить, что практически для всех образцов иммобилизованного биокатализатора в первые несколько дней работы наблюдали некоторое увеличение активности от цикла к циклу, что, возможно, объясняется увеличением доступности фермента для субстрата, после чего активность постепенно снижалась. Препарат 2а (см. рис. 2, 3) синтезировал тирозин с конверсией 90,6 % в течение более чем 20 сут. Инактивация биокатализатора 2а происходит после 38 циклов использования. Суммарная производительность иммобилизованной ТФЛ за указанное время составила ~207 г тирозина/ г белка (табл. 2).

Определение температурного и рН оптимумов

Для исследования свойств иммобилизованной ТФЛ нами был выбран препарат 2а, обладающий наилучшим сочетанием активности и стабильности.

Зависимость каталитической активности иммобилизованного фермента от рН имеет отчетливо выраженный максимум при значении рН=9. Данный оптимум рН по сравнению с таковым нативного фермента примерно на 0,5 ед. смещен в щелочную область. Температурный оптимум действия иммобилизованной ТФЛ был смещен на 15° в область более высоких температур по сравнению с аналогичным показателем для растворенного фермента и составил 50°, что характерно для всех иммобилизованных ферментов и объясняется повышением устойчивости к тепловой денатурации

за счет ограничения степеней свободы в их молекуле.

Стабилизация ТФЛ-активности

Известно, что субстрат или продукт в составе реагентов в процессе иммобилизации могут оказывать стабилизирующее действие на активность фермента. Как видно из данных табл. 3, исследованные вещества оказывают различный стабилизирующий эффект при иммобилизации ТФЛ. Наиболее высокой ТФЛ-активностью (21,9 % от исходной) обладает иммобилизованный ферментный препарат, получение которого проведено в присутствии D,L-тирозина. Вероятно, D-тирозин выступает в качестве обратимого ингибитора ТФЛ, предохраняющего аминокетильную группу ее активного центра от инактивирующего действия глутарового альдегида.

При хранении приготовленного биокатализатора 2а в 50 мМ К,Na-фосфатном буфере (рН 8) в течение 4 мес при 4° его активность снизилась в 15 раз. Однако после его инкубации в реакционной среде в течение 24 ч активность частично восстановилась и составила 78,4 % от активности свежеиммобилизованного ферментного препарата. В течение еще 2 мес препарат периодически использовали для синтеза тирозина. Через 6 мес от момента иммобилизации активность препарата составила 7,9 % от активности свежеприготовленного биокатализатора.

Повторная иммобилизация

Отработанный биокатализатор использовали как основу для повторной иммобилизации свежего фермента, в результате которой ТФЛ-активность препарата оказалась не меньше, чем при

Таблица 2

Производительность иммобилизованной ТФЛ в реакции синтеза L-тирозина (продолжительность одного цикла 24 ч)

Иммобилизованные препараты ТФЛ	Количество циклов синтеза	Суммарное количество синтезированного L-тирозина, г/г _{белка}	Суммарное количество синтезированного L-тирозина, г/г _{кат}
1а	26	86,6	1,1
1b	11	13,4	0,2
2а	38	207,9	2,1
2b	15	53,5	0,6
2с	28	80,0	1,4

Таблица 3

Иммобилизация очищенной ТФЛ из клеток *C. freundii* в присутствии различных стабилизаторов

Стабилизатор	ТФЛ-активность*, % от исходной
L-Тирозин (2,5 мМ)	11,0
D, L-Тирозин (2,5 мМ)	21,9
Пируват натрия (0,15 М), ацетат аммония (0,5 М)	10,7
Глицерин (20 %)	12,8
Альбумин (5мг/мл)	15,7
Контроль (в отсутствии стабилизатора)	10,0

* Сохраненная активность после иммобилизации в присутствии стабилизатора.

первичной иммобилизации. Так, с помощью этих экспериментов показана возможность продления срока службы носителя путем повторной иммобилизации фермента на отработанном биокатализаторе без дополнительной активации носителя.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что из числа исследованных наиболее эффективным носителем для иммобилизации ТФЛ является силихром. В результате иммобилизации ТФЛ на поверхности силанизированного силихрома нам удалось стабилизировать ее активность в реакции синтеза тирозина при высоких концентрациях фенола (~100 мМ) и разрешить проблему образования агрегатов клеток с осадком тирозина, что в совокупности привело к значительному увеличению времени инактивации полученного биокатализатора и уменьшению расхода фермента. Период полуинактивации ТФЛ, иммобилизованной на силихроме, достигает 25 сут (600 ч), что намного (5—20 раз) превышает аналогичный показатель для очищенного фермента, клеток, иммобилизованных в различных гелях и интактных клеток [6, 12—16]. Суммарная производительность за 38 циклов составила ~207 г тирозина/г белка, что в 5 раз превышает суммарную производительность биокатализаторов в виде интактных клеток [12, 16], а максимальная продуктивность биокатализатора оказалась равна 5 кг тирозина/1 кг биокатализатора, что свидетельствует об экономической целесообразности его коммер-

ческого использования. Данный катализатор удобен в применении и легко отделяется от кристаллов продукта, что особенно важно для получения продукта высокой степени чистоты.

Получено 10.12.10

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ленинджер А.* Основы биохимии. — М.: Мир, 1985. — С. 392, 580, 787, 803.
2. *Rohr, F.* Tyrosine supplementation in the treatment of material phenylketonuria / F. Rohr, D. Lobbregi, H. Levy // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1998. — V. 67. — P. 473—476.
3. *Матевосян А.А.* Фенилкетонурия // *Медицинский информационный вестник.* — 1999. — Т. 10 (16). — С. 6—7.
4. *Enei, H.* Synthesis of L-tyrosine or 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine from pyruvic acid, ammonia and phenol or pyrocatechol / H. Enei, H. Matsui, H. Nakazawa, S. Okumura, H. Yamada // *Agric. Biol. Chem.* — 1973. — V. 37(3). — P. 493.
5. *Куплетская М.Б.* Синтез тирозина и 3,4-диоксифенилаланина бактерий *Citrobakter freundii* // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1979. — Т. 15(6). — С. 827.
6. *Para, G.* Synthesis of L-tyrosine by immobilized *Escherichia intermedia* cells / G. Para, P. Lucciardi, J. Baratti // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1985. — V. 21. — P. 273—279.
7. *Foor, F.* Production of dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenyl-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola* / F. Foor, N. Morin, K. Bostian // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — V. 59. — P. 3070—3075.
8. *Koyanagi, T.* Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR / T. Koyanagi, T. Katayama, H. Suzuki, H. Nakazawa, K. Yokozeki, H. Kumagai // *J. Biotechnol.* — 2005. — V. 115. — P. 303—306.
9. *Suzuki, S.* Grow of a tryptophanase-producing thermophile *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. Nov., is dependant on coculture with a *Bacillus sp.* / S. Suzuki, S. Hori-nouchi, T. Beppu // *J. Gen. Microbiol.* — 1988. — V. 134. — P. 2353—2362.
10. *Lee, S.G.* Thermostable tyrosine phenol-lyase of *Symbiobacterium sp.* SC-1: Gene cloning, sequence determination, and overproduction in *Escherichia coli* / S.G. Lee, S.P. Hong, Y.H. Choi, Y.J. Chung, M.H. Sung // *Protein Expr. Purif.* — 1997. — V. 11. — P. 263—270.
11. *Fukui, S.* Production of L-tryptophan, L-tyrosine and their analogues by use of immobilized tryptophanases and immobilized β -tyrosinase / S. Fukui, M. Ikeda, M. Fujimura, H. Yamada, H. Kumagai // *Eur. J. Appl. Microbiol.* — 1975. — V. 1. — P. 25—39.
12. *Куплетская М.Б.* Исследование условий синтеза тирозина и 3, 4-диоксифенилаланина бактерий *Citrobakter freundii* штамм 62 // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1981. — Т. 17(2). — С. 278—283.
13. *Тысячная И.В.* Иммобилизация клеток *Citrobakter freundii* с тирозин-фенол-лиазной активностью методом вклю-

- чения в природные гели / И.В. Тысячная, М.Х. Родригес, В.И. Яковлева, И.В. Березин // Прикл. биохим. микробиол. — 1984. — Т. 20(1). — С. 79—87.
14. Тысячная И.В. Иммунизация клеток бактерий *Citrobacter freundii* с тирозин фенол-лиазной активностью в полиакриламидном геле / И.В. Тысячная, Е.В. Юнак, К.И. Войводов, Л.С. Губницкий, В.И. Яковлева, И.В. Березин // Прикл. биохим. микробиол. — 1985. — Т. 21(1). — С. 41—46.
 15. Pioselli, B. Tyrosine phenol-lyase and tryptophan indole-lyase encapsulated in wet nanoporous silica gels: Selective stabilization of tertiary conformations / B. Pioselli, S. Bettati, T.V. Demidkina, L.N. Zakomirdina, R.S. Phillips, A. Mozarelli // Protein Sci. — 2004. — V. 13. — P. 913—924.
 16. Kim Do Yang Development of bioreactor system for L-tyrosine synthesis using thermostable tyrosine phenol-lyase / Do Yang Kim, Rha Eugene, Choi Su-Lim, Jun Song Jae, Hong Seung-Pyo, Sung Moon-Hee, Lee Seung-Goo // J. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 17(1). — P. 116—122.
 17. Lutke-Everson, T. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications / T. Lutke-Everson, C.N.S. Santos, G. Stephanopoulos // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 77. — P. 751—762.
 18. Дюкова К.Г. Разработка эффективных условий биосинтеза, выделения и очистки тирозин-фенол-лиазы из *Citrobacter freundii* // Биологический журнал Армении. — 2010. — Т. LXII(2). — С. 6—14.
 19. Robinson, P.J. Porous glass as a solid support for immobilization or affinity chromatography of enzymes / P.J. Robinson, P. Dunnill, D. Lilly // Biochim. Biophys. Acta. — 1971. — V. 242. — P. 659—661.
 20. Губен И.Н. Методы органической химии. Т. 4. — М.: Наука, 1949. — С. 754.
 21. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72. — P. 248—254.
 22. Тысячная И.В. Кинетическое изучение синтеза тирозина в тирозин-фенол-лиазной реакции, катализируемой клетками *Citrobacter freundii* / И.В. Тысячная, В.И. Яковлева, М.Б. Куплетская, И.В. Березин // Биохимия. — 1979. — Т. 44(12). — С. 2201—2207.
 23. Antson, A.A. Three-Dimensional structure of tyrosine phenol-lyase / A.A. Antson, T.V. Demidkina, P. Gollnick, Z. Dauter, R.L. Von Tersch, G. Long, S.N. Berezhnov, R.S. Phillips, E.H. Harutyunyan, K.S. Wilson // Biochemistry. — 1993. — V. 32. — P. 4195—4206.
- K.G. DYUKOVA*, A.A. HAMBARDZUMYAN,
and H.P. HALEBYAN
- The Biotechnology Scientific Research Institute, 0056, Yerevan Armenia
- e-mail: karina_dukova@yahoo.com

Covalent Immobilization of Purified Tyrosine-phenol-lyase from *Citrobacter freundii* on Inorganic Carriers

Immobilization of a purified preparation of tyrosine-phenol-lyase (TPL) from *C. freundii* on silicagel- or silochrom-based inorganic carriers by the method of covalent binding has been carried out, and the properties of the immobilized preparation were investigated. To bind the carrier, modified by γ -aminopropyltriethoxysilane, with the purified enzyme, glutaraldehyde was used as a cross-linking reagent. As a result of the above immobilization, the half-life of TPL was prolonged up to 25 days that considerably exceeds (by 5—20 times) the similar parameters for the cells immobilized into various gels, intact cells and also for the purified enzyme. The summary productivity of the immobilized biocatalyst (the total amount of the product synthesized within 38 days) was ~207 g of tyrosine per 1 g of protein that is 5 fold higher than the productivity of the intact cells. The biocatalyst was convenient in operation due to the opportunity of its easy separation from the product crystals.

Key words: biotransformation, covalent immobilization, L-tyrosine, tyrosine-phenol-lyase.

* Author for correspondence.