

УДК: 577.152.2:615.014.67

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ТИАМИНКИНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ ПУТЕМ МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЯ

Черникевич И. П. (*chemistry@grsmu.by*), Зиматкина Т. И. (*kge_grsmu@mail.ru*),
Сорокопыт Е. М. (*Mr.darknessoo@gmail.com*)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Работа посвящена иммобилизации тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) из печени свиньи микрокапсулированием в полупроницаемые мембраны, выяснению поведения и устойчивости белка в их составе. Параллельно, методом сублимации, осуществлена лиофилизация фермента. Показано, что микрокапсулированный белок функционирует в кинетически-диффузионном режиме, что влияет на ход кинетических кривых и значения получаемых эффективных констант. При включении фермента в гидрофобные микрокапсулы, на основе бутадиенового каучука, отклонения констант находятся в пределах допустимых расчетных величин, - при включении в гидрофильные, на основе нитрата целлюлозы, - они значительны. Иммобилизация тиаминкиназы резко повышает ее стабильность и термостойкость. В первую очередь это касается препаратов фермента, включенных в гидрофобный носитель. Гидрофильные взаимодействия не столь эффективны. Наиболее высокая стабилизация достигается лиофилизацией тиаминкиназы.

Ключевые слова: тиаминкиназы, печень свиньи, микрокапсулирование, кинетические параметры, устойчивость.

В отличие от других методов иммобилизации ферментов, таких как включение в гель, адсорбционное или ковалентное присоединение к носителям, при микрокапсулировании главным является удержание раствора, окружающего фермент, а не создание физических или химических сил, необходимых для иммобилизации. Иммобилизуется целиком исходный раствор, содержащий фермент, а не отдельные молекулы фермента [3, 5]. При микрокапсулировании можно использовать и искусственные клетки с мембранами, подобными мембранам природных клеток. С помощью мембран осуществляется контроль размеров молекул, проникающих внутрь клетки или выходящих из неё. Большие молекулы, такие как ферменты или белки, удерживаются внутри микрокапсулы, тогда как малые молекулы субстрата и продукта могут свободно диффундировать через синтетическую мембрану. Одним из преимуществ микрокапсулирования перед равновесным включением фермента, например в гель, является большая площадь поверхности, приходящаяся на единицу активности иммобилизованного фермента, что позволяет использовать высокие концентрации его в исходном растворе и достигать высокой эффективности действия иммобилизованного белка [4, 6]. Поскольку присутствие в растворе фермента не влияет на процесс образования мембран, можно одновременно подвергать микрокапсулированию различные белки, клетки или биомолекулы, что позволяет осуществлять многостадийные реакции.

В качестве перспективного биокатализатора медицинского назначения выступает фермент тиаминкиназа (КФ 2.7.6.2) [9], катализирующая одноэтапный перенос пирофосфатной группировки от молекулы АТФ на тиамин:



с получением тиаминпирофосфата (кокарбоксилазы), коферментной формы витамина В1. Тиаминкиназа неустойчива при хранении. Очень низкую стабильность обычно имеют аллостерические ферменты, обладающие четвертичной структурой со слабо связанными субъединицами, легко диссоциирующими и подвергающимися быстрым необратимым изменениям после диссоциации [2]. Тиаминкиназа относится к классу диссоциирующих ферментов [9]. На-

рушение четвертичной структуры фермента зависит от его концентрации в растворе, рН, ионной силы раствора, влияния субстратов и эффекторов. При этом большая устойчивость свойственна ферменту из более низких по организации организмов [11].

Возможность использования высокоочищенных препаратов тиаминкиназы из прокариотических клеток, клеток грибов, простейших сегодня ставится под сомнение из-за низкой конечной активности. Так, удельная активность препарата фермента из пивных дрожжей уступает удельной активности такого же препарата из печени почти на порядок [1]. Таким образом, стабилизация лабильной глобулы белка из животных тканей, включением её в микрокапсулы, в мягких условиях, может оказаться более перспективной, чем аналогичная процедура предпринятого нами ранее включения более устойчивого, но менее активного фермента из пивных дрожжей в структуру жёсткого носителя – альгината кальция [10].

Задача настоящей работы – разработка путей микрокапсулирования и лиофилизации тиаминкиназы, выяснение устойчивости и термостабильности иммобилизованного фермента, поведения в составе полупроницаемых мембран.

Материалы и методы

Гомогенный белок из печени свиньи выделяли методом, разработанным ранее для тиаминкиназы из печени крыс [1]. На конечном этапе выход фермента составлял 12-15%, средняя степень очистки 3120 раз при удельной активности 2,16 Е. Полученный препарат по активности намного превышает аналогичные препараты, выделенные ранее из сердца (0,5 Е) [12], мозга свиньи (0,1 Е) [14], листьев петрушки (0,083 Е) [13], пивных дрожжей (0,5 Е) [9] и сопоставим с ферментом из печени крыс (2 Е) [1].

Высокоочищенная тиаминкиназа нестабильна при хранении – активность оставалась без изменения не более 3 суток при температуре 4-5°С. Фермент на стадии ионообменной хроматографии сохранял свою активность более недели.

При исследовании гомогенности тиаминкиназы методом электрофореза в 7-ном полиакриламидном геле обнаруживаются 2 симметричные полосы, расположенные близко друг от друга. Поэтому раздельно они не анализировались. Характерно, что

при обработке тиаминкиназы додецилсульфатом натрия на электрофореграмме детектируется одна белковая полоса. Это свидетельствует о принадлежности обеих полос одному ферменту. Кроме того, удельная активность элюированного с геля фермента равна удельной активности белка центральных фракций после очистки на конечном этапе на сефадексе G-200. Не исключено, что незначительная гетерогенность тиаминкиназы при электрофорезе в полиакриламидном геле обусловлена наличием множественных молекулярных форм, как это было показано нами для тиаминкиназы из пивных дрожжей [9].

Микрокапсулирование: в литературе описано несколько методов микрокапсулирования для ферментных систем [2, 5, 8], однако чаще всего используют коацервацию, как более щадящий метод. Коацервация включает фазовое разделение коллоидных частиц полимера, которые ассоциированы вокруг маленьких водных капель и затем образуют непрерывную мембрану при их коалесценции. Так как при коацервации не происходит химических реакций, её можно применять для инкапсулирования многих биохимических препаратов и получения очень тонких мембран. Типичными полимерами для коацервации являются нитрат целлюлозы, ацетат целлюлозы и бутадиеновый каучук [4, 6]. Микрокапсулирование тиаминкиназы включало следующие этапы:

1. Растворение фермента в буферном растворе, содержащем для защиты глобулы белка от денатурации альбумин.

2. Приготовление органической фазы, содержащей небольшое количество эмульгирующего агента. При этом органическая фаза не должна смешиваться с водой. В качестве фазы нами использовался циклогексан.

3. Добавление водного раствора тиаминкиназы к органической фазе с перемешиванием в течение определённого времени при заданной скорости вращения мешалки. Скорость перемешивания определяет размер микрокапсул.

4. Добавление к полученной двухфазной смеси второго органического раствора. Этот раствор содержит полимер и органический растворитель – циклогексан. При внесении второго органического раствора осуществляется образование мелкого коллоида, вызванное разбавлением органического растворителя.

5. Упаривание растворителя из органической фазы. При этом происходит дальнейшее формирование микрокапсул и уплотнение мембран. Их толщина зависит от количества полимера, добавленного к органической фазе, и времени преципитации.

6. Выделение маленьких микрокапсул из органической фазы седиментацией или центрифугированием и промывка буферным раствором, содержащим твин 20.

Концентрации веществ и времена протекания процессов являются существенным фактором для эффективного микрокапсулирования. Методика получения микрокапсулированной тиаминкиназы приведена ниже.

Микрокапсулирование тиаминкиназы бутадиеновым каучуком:

1. Готовим следующие 4 смеси:

Смесь А: 2,60 г Спан 85 и 25 мл циклогексана;

Смесь Б: 1,0 мл раствора тиаминкиназы (50 мкг/2,16 Е) в 50 мМ фосфатном буфере рН 7.0. Смесь В: 0,1 г бутадиенового каучука в 50 мл циклогексана (перемешиваем в течение 1-2 часов до полного рас-

творения).

Смесь Г: 15 мл циклогексана и 10 мл льняного масла.

2. В условиях непрерывного перемешивания добавляем смесь А к смеси Б.

3. Не прекращая перемешивания, вносим смесь В.

4. При постоянной, прежде заданной скорости вращения мешалки, добавляем смесь Г.

5. Не прекращая перемешивания, создаём в системе микрокапсулирования вакуум не более 26 мм рт. ст. для упаривания циклогексана. Упаривание не стоит вести слишком быстро, иначе вместо водных микросфер образуются полимерные частицы.

6. Центрифугируем масляную фазу, содержащую микрокапсулы, и удаляем супернатант (масло). Добавляем к осадку 15 мл фосфатного буфера рН 7.0, ресуспендируем частицы и снова центрифугируем. После удаления супернатанта процедуру промывки повторяем ещё несколько раз.

7. Хорошо отмытые микрокапсулы ресуспендируем в 50 мМ фосфатном буфере рН 7.0, содержащем 0,1% твин 20, для предотвращения их агрегации.

Сформированные микрокапсулы из бутадиенового каучука с иммобилизованной тиаминкиназой представлены на рис. 1.

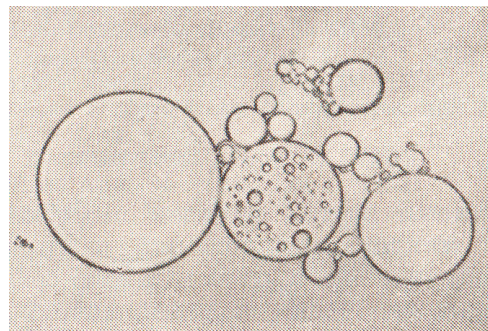


Рисунок 1. – Тиаминкиназа, микрокапсулированная в мембрану (маленькие микрокапсулы находятся внутри большой)

В аналогичных условиях проведено микрокапсулирование тиаминкиназы в мембрану из нитрата целлюлозы. Одновременно с микрокапсулированными препаратами на установке для сублимационной сушки при температуре -35°С и давлении $5 \cdot 10^{-2}$ Па получены лиофилизированные препараты фермента, хорошо растворимые в водной среде.

Результаты и обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что кинетические характеристики включённого в мембрану фермента по ряду параметров существенно отличаются от таковых для нативного белка (табл. 1). В первую очередь это касается параметров констант Михаэлиса и максимальных скоростей ферментативной реакции. Их значения, как и значения каталитических констант, как правило, всегда используются при анализе ферментативных процессов в рамках уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$v = \frac{k_{\text{кат}} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_m(\text{каж}) + [S]}$$

где $[E]_0$ и $[S]$ – концентрации фермента и субстрата в системе, соответственно; $k_{\text{кат}}$ – каталитическая константа ферментативной реакции; $K_m(\text{каж})$ – определяемое эффективное (кажущееся) значение константы Михаэлиса.

Параметр K_m (каж) служит характеристикой сродства фермента к субстрату и, следовательно, является мерой той концентрации субстрата, которая необходима для насыщения фермента. При катализе иммобилизованными ферментами концентрация субстрата вблизи фермента (локальная) может отличаться от концентрации субстрата во всём объёме системы. В этом случае наблюдаемая в опыте K_m (каж) должна зависеть от распределения субстрата между свободным раствором и средой микрокапсулы, в которой сосредоточен фермент. Что касается параметра k_{cat} , то он характеризует реакционную способность уже образовавшегося фермент-субстратного комплекса, поэтому не зависит от распределения субстрата в системе, а определяется состоянием, в первую очередь конформацией самого фермента.

Таким образом, все кинетические эффекты, наблюдаемые при катализе иммобилизованными ферментами, можно разделить на две группы. К первой из них относятся эффекты, связанные с влиянием иммобилизации на состояние (конформацию) фермента, а ко второй – эффекты, обусловленные распределением реагентов в системе (т. е. диффузией реагентов через мембрану).

Совмещение спектрофотометрических кривых поглощения нативной и иммобилизованной тиаминокиназы при длинах волн 260 и 280 нм, а также близость каталитических констант (k_{cat}) свободного и включённого в микрокапсулы фермента (табл. 1) свидетельствует об отсутствии каких-либо заметных конформационных изменений в структуре белка, вызванных включением его в полимерные капсулы.

Таблица 1. – Сравнение характеристик и кинетических параметров нативной, иммобилизованной и лиофилизированной тиаминокиназы из печени свиньи: 37°C, 10 мМ трис-HCl буфер pH 8,6

Параметры	Нативный фермент	Иммобилизованный в мембрану из бутадиенового каучука	Иммобилизованный в мембрану из нитрата целлюлозы	Леофилизированный фермент
Активность, нмоль $ч^{-1} \cdot мг^{-1}$	2047	930	568	1861
K_m для тиамина 10^{-6} , М	5,6	8,9	14,4	6,0
K_m для комплекса $Mg \cdot ATP^{2-} \cdot 10^{-3}$, М	1,2	1,5	2,0	1,3
K_s для $Mg^{2+} \cdot 10^{-4}$ М	4,8	9,7	12,6	5,1
V_{max} , М $с^{-1}$	3,01	2,17	1,54	2,76
k_{cat} , 10^{-1} $с^{-1}$	0,92	0,89	0,84	0,90
K_i для пиритиамина $\cdot 10^{-6}$, М	3,0	3,5	3,6	3,1
K_i для окситиамина $\cdot 10^2$, М	1,0	1,2	1,8	1,0
Оптимум pH	8,4-9,0	7,6-9,0	4,5-9,0	8,2-9,0
Линейность от времени, ч	2	2,5	3	2,2

В то же время значительное (в 2,0 -2,5 раза) увеличение определяемых в эксперименте эффективных констант Михаэлиса может быть указанием на повы-

шенное «сопротивление» субстрата к массопереносу внутрь полимерного носителя, обусловленное либо собственно носителем, либо пограничными его слоями.

Если молекула фермента находится на поверхности (или внутри) частицы носителя, то для протекания ферментативной реакции необходимо, во-первых, чтобы молекула субстрата подошла к поверхности частицы, во-вторых, протифундировала внутрь неё. В зависимости от того, как соотносятся скорости диффузионных стадий и непосредственно ферментативной реакции, может реализоваться одна из трёх нижеперечисленных ситуаций [7].

Если ферментативная реакция в поверхностных слоях частицы протекает быстрее, чем субстрат из раствора подходит к поверхности, то через непродолжительное время вокруг частицы образуется зона, обеднённая субстратом. В результате наблюдаемая скорость ферментативной реакции будет определяться скоростью массопереноса субстрата к частице. В этом случае процесс контролируется внешней диффузией.

Если массоперенос субстрата проходит быстрее, чем идёт ферментативная реакция, может возникнуть другой тип диффузионных затруднений. А именно, если размер пор частицы носителя достаточно велик, но концентрация фермента высокая, то практически весь субстрат израсходуется уже в приповерхностных слоях носителя, а глубинные области будут обеднены субстратом. В таком случае говорят, что процесс контролируется внутренней диффузией.

И наконец, когда диффузия субстрата как к поверхностному слою, так и во внутренние области частицы проходит достаточно быстро, общая скорость превращения субстрата определяется непосредственно ферментативной реакцией. В этом случае процесс кинетически контролируем.

Существует два основных экспериментальных способа, по которым можно определить, протекает ли реакция, катализируемая иммобилизованным ферментом, во внутридиффузионном или внешнедиффузионном режиме [2,7]. Они основаны на разной чувствительности кинетических параметров ферментативных процессов, контролируемых внешней и внутренней диффузией субстрата, к действию специфических лигандов и температуры. Т. е. ферментативные реакции, контролируемые внутренней диффузией, «чувствуют» эффекты ингибирования, pH-зависимость активности, температурные колебания и т.п., в то время как скорость внешнедиффузионно-контролируемых реакций не должна зависеть от возрастания удельной концентрации иммобилизованного фермента, изменений pH, ионной силы, добавления ингибиторов и активаторов, которые оказывают специфическое влияние исключительно на ферментативные стадии. Но в том и в другом случае, в отличие от нативного фермента, получаемые кинетические кривые «приобретают» атипичный вид.

Влияние температуры на активность иммобилизованной тиаминокиназы показано на рис. 2. Температурную зависимость начальной скорости реакции анализировали при концентрациях субстратов – тиамина и комплекса $Mg \cdot ATP^{2-}$ – равных 4 K_m , что позволяет говорить о насыщении фермента и влиянии температуры на V_{max} . Согласно рис. 2 (А), в области 0-60°C не наблюдается кажущийся температурный оптимум. В данном отношении конформация тиаминокиназы оставалась без изменений. Построенный в логарифмических

координатах график имеет отчетливый перелом (рис. 2 (Б)). Наблюдаемое изменение наклона прямой – следствие протекания в системе двух параллельных реакций синтеза коферментной формы витамина В1, идущих в кинетическом и диффузионном режимах. Температура оказывает влияние на положение равновесия между реакциями, сдвигая его в сторону кинетического процесса с большей каталитической активностью, характеризующегося более низкими энергией активации и температурным коэффициентом. Значения энергии активации, рассчитанные из графика Аррениуса для обеих реакций, составляют 47,2 и 85,3 кДж · моль⁻¹, а соответствующие им энтальпии активации – 44,7 и 82,8 кДж · моль⁻¹. Температурные коэффициенты одновременно протекающих реакций, соответственно, равны 1,75 и 3,32. Критическая температура, при которой изменяется энергия активации, находится в области 39,5–40,0°С, что соответствует физиологической температуре тела животного, из которого выделена тиаминкиназа.

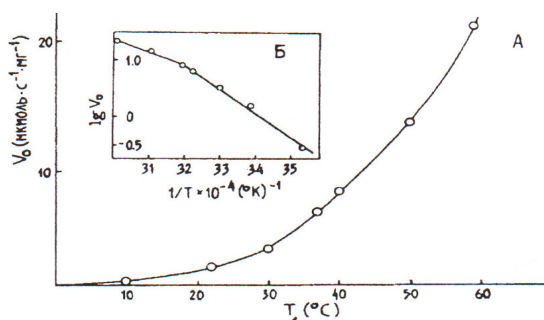


Рисунок 2. – Температурная зависимость начальной скорости тиаминкиназной реакции (А); то же в координатах Аррениуса (Б). Фермент микрокапсулирован в бутадиеновый каучук

Зависимость начальной скорости тиаминкиназной реакции от концентрации субстрата (тиамина) для иммобилизованного в бутадиеновый каучук фермента представлена на рис. 3. Для сравнения здесь же показан (кривая 2) начальный участок кривой насыщения нативного энзима. Как видно из приведенных данных, кривая насыщения субстратом имеет сигмовидную форму, причем при малых концентрациях тиамина тиаминкиназа характеризуется очень низкой активностью, тогда как при концентрации субстрата 200 мкМ скорость реакции для нативного и иммобилизованного фермента практически одинакова. Преобразование в координатах Лайнуивера-Берка (рис. 3 (Б)) дает величину S_{0,5} для микрокапсулированной тиаминкиназы, которая по своему значению в два раза выше, чем кажущаяся K_m для нативного белка.

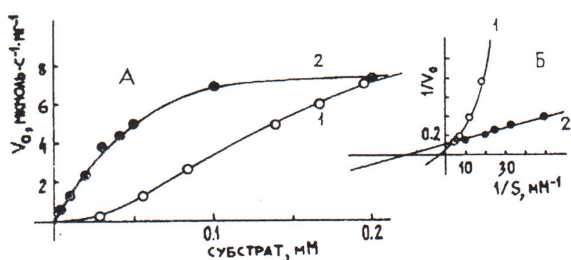


Рисунок 3. – Зависимость начальной скорости тиаминкиназной реакции от концентрации тиамина (А): 1 – иммобилизованный, 2 – нативный фермент; то же в координатах Лайнуивера-Берка (Б)

Полученные атипичные зависимости начальных скоростей ферментативной реакции от концентрации витамина В1 и температуры являются следствием как внешне, так и внутридиффузионных ограничений в доступности компонентов среды к активному центру тиаминкиназы. Увеличение сопротивления массопереносу для компонентов, обусловленное или собственно мембраной микрокапсул, и или её пограничными слоями, «вынуждает» фермент работать в кинетически-диффузионном режиме, что в итоге отражается на кинетических параметрах катализируемой ферментативной реакции (табл.1). Особенно существенные диффузионные ограничения характерны для заряженных микрокапсул из нитрата целлюлозы, где нитрогруппы, кумулируя отрицательный заряд, будут электростатически концентрировать около себя положительно заряженные молекулы субстрата – тиамин – и двухзарядные катионы кофактора – магния, что снижает содержание их в каталитическом пространстве вокруг активного центра фермента. Указанные ограничения менее свойственны для гидрофобных микрокапсул из бутадиенового каучука. В последнем случае регистрируемые величины кажущихся констант Михаэлиса для иммобилизованного фермента находятся в пределах допустимых расчетных значений для нативной тиаминкиназы. Т. е. можно полагать, что включённые в гидрофобные макрокапсулы глобулы белка уже смогут эффективно функционировать в процессе их практического использования. Подтверждением тому является близость скоростей ферментативных реакций для нативной и иммобилизованной тиаминкиназы при высоких концентрациях субстрата – тиамин (рис. 3). Кинетические параметры для лиофилизированной тиаминкиназы не отличаются от таковых для исходной глобулы (табл. 1).

Таблица 2. – Влияние иммобилизации на активность и устойчивость тиаминкиназы: температура 4°С

Способ стабилизации	Сохранение активности после стабилизации, %	Время полуинактивации
Нативный фермент	100	3 суток
Микрокапсулированный в мембрану из бутадиенового каучука	45,4	2 недели
Микрокапсулированный в мембрану из нитрата целлюлозы	27,7	1,5 недели
Ллиофилизированный препарат	91	около года

Устойчивость фермента, включённого в бутадиеновые микрокапсулы, резко возрастает. Нативная тиаминкиназа при температуре 4°С уже через 3 сут. теряет до 50% исходной активности, в то время как иммобилизованный белок в течение 2 недель оставался высокоактивным (табл. 2). Активность лиофилизированного препарата в этих условиях сохранялась без заметных изменений около года.

Термостабильность фермента в гидрофобном носителе превышает его стабильность в буферном растворе. Если 10-минутная преинкубация нативного фермента при 55°С приводила к почти полной инактивации, то иммобилизованная тиаминкиназа сохраняла при этом до 60% активности. Повышенная устойчивость иммобилизованного фермента, вероятно, объясняется гидрофобными контактами полимерных цепей

бутадиенового каучука с глобулой тиаминкиназы. Такое многоточечное взаимодействие (матрица-белок) может быть причиной повышения термостабильности белка, как это показано для других ферментов [2, 3].

Выводы

1. Температурные зависимости и зависимости начальных скоростей каталитической реакции от концентрации субстрата-тиамина носят атипичный характер, т.е. при высоких температурах и высоких концентрациях тиамина реакция протекает в кинетической области.

2. По мере уменьшения концентрации и температуры реакционная система переходит в диффузионную область, что в координатах Лайнуивара-Берка прослеживается в виде чётко выраженного излома. Кинетически-диффузионный режим работы иммобилизованной тиаминкиназы отражается на эффективных кинетических параметрах: K_m , k_{cat} , V_{max} ,

однако если при включении фермента в гидрофобные микрокапсулы эти отклонения находятся в пределах теоретически допустимых значений, то в случае гидрофильных – они значительны.

3. Иммобилизация тиаминкиназы резко повышает её стабильность и термоустойчивость. В первую очередь это касается препаратов фермента, включенных в гидрофобный носитель. Гидрофильные взаимодействия не столь эффективны. Наиболее высокая стабилизация достигается лиофилизацией тиаминкиназы.

4. Микрокапсулированная в гидрофобный носитель тиаминкиназа найдет применение в медицинской практике в качестве препарата пролонгированного действия для лечения пациентов с генетически детерминированными заболеваниями; лиофилизированный фермент – в аналитических целях, для получения фосфорных эфиров витамина В1 с двойной меткой.

Литература

1. Арцукевич, И. М. Очистка и некоторые свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крыс / И. М. Арцукевич, А. И. Воскобоев, Ю. М. Островский // *Вопр. мед. химии.* – 1977. – Т.23, №2. – С. 203-210.
2. Березин, И. В. Иммобилизованные ферменты / И. В. Березин, К. Мартинек. – М.: МГУ, 1996. – 654 с.
3. Бурдь, В. Н. Химия галогенирующих ферментов. / В. Н. Бурдь. – Гродно, 2005. – 162 с.
4. Волов, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волов. – Новосибирск.: Сибирское отделение РАН, 1999. – 252 с.
5. Вудворд, Дж. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / Дж. Вудворд. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
6. Гамаюров, В. С.. Ферменты: Лабораторный практикум / В. С. Гамаюров, М. Е. Зиновьев. – Казань.: КГТУ, 2010. – 272 с.
7. Егоров, Н. С. Иммобилизованные ферменты / Н. С. Егоров, В. Д. Самужлов. – М.: Высшая школа, 1987. – 159 с.
8. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 621 с.
9. Черникевич, И. П. Ферментные системы биотрансформации активных форм витамина В1 (структура, свойства, регуляция): автореф. дис. ... докт. хим. наук: 03.00.04 / И. П. Черникевич; Минск. ин-т биоорганической химии. – Минск, 1996. – 32 с.
10. Черникевич, И. П. Иммобилизация тиаминкиназы из пивных дрожжей / И. П. Черникевич // *Журнал ГрГМУ.* – 2010. № 2. – С.31-34.
11. Черникевич, И. П. Сравнительный кинетический анализ тиаминкиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И. П. Черникевич // *Журнал ГрГМУ.* – 2011. – №3. – С. 25-28.
12. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig heart / M. Hamada // *Seikigaku.* – 1970. Vol.41. – P. 310-324.
13. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwami // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 1975. – Vol.21, N 2. – P. 103-115.
14. Peterson, J.W. Partial purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig brain / J.W. Peterson, C.J. Gubler, S.A. Kuby // *Biochim. biophys. acta.* – 1975. – Vol. 397, N 2. – P. 377-394.

Literatura

1. Arcukevich, I. M. Ochistka i nekotorye svoistva tiaminpirofosfokinazy iz pecheni krysa / I. M. Arcukevich, A. I. Voskoboev, Yu. M. Ostrovskii // *Vopr. med. himii.* – 1977. – Т.23, №2. – С. 203-210.
2. Berezin, I. V. Immobilizovannyye fermenty / I. V. Berezin., K. Martinek. – М.: МГУ, 1996. – 654 с.
3. Burd, V.N. Himiya galogeniruyuschih fermentov. / V. N. Burd'. – Grodno, 2005. – 162 s.
4. Volov, T. G. Biotehnologiya / T. G. Volov. – Novosibirsk.: Sibirskoe otделение RAN, 1999. – 252 s.
5. Vudvord, Dj. Immobilizovannyye kletki i fermenty. Metody / Dj. Vudvord. – М.: Mir, 1988. – 215 s.
6. Gamayurov, V. S.. Fermenty: Laboratornyi praktikum / V. S. Gamayurov, M. E. Zinov'ev. – Kazan': KGTU, 2010. – 272 s.
7. Egorov, N.S. Immobilizovannyye fermenty / N. S. Egorov, V.D. Samujlov. – М.: Vysshaya shkola, 1987. – 159 s.
8. Darbre, A. Prakticheskaya himiya belka / A. Darbre. – М.: GEOTAR-Media, 2009. – 621 s.
9. Chernikevich, I. P. Fermentnye sistemy biotransformacii aktivnyh form vitamina V1 (struktura, svoistva, regulyaciya): avtoref. dis. ... dokt. him. nauk: 03.00.04 / I. P. Chernikevich; Minsk. in-t bioorganicheskoi himii. – Minsk, 1996. – 32 s.
10. Chernikevich, I.P. Immobilizaciya tiaminkinazy iz pivnyh drozhei / I.P. Chernikevich // *Jurnal GrGMU.* – 2010. № 2. – S.31-34.
11. Chernikevich, I. P. Sravnitel'nyi kineticheskii analiz tiaminkinaz iz pivnyh drozhei i golovnoego mozga svin'i / I. P. Chernikevich // *Jurnal GrGMU.* – 2011. – №3. – S. 25-28.
12. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig heart / M. Hamada // *Seikigaku.* – 1970. Vol.41. – P. 310-324.
13. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwami // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 1975. – Vol.21, N 2. – P. 103-115.
14. Peterson, J. W. Partial purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig brain / J.W. Peterson, C. J. Gubler, S. A. Kuby // *Biochim. biophys. acta.* – 1975. – Vol. 397, N 2. – P. 377-394.

IMMOBILIZATION OF THIAMINE KINASE FROM PIG LIVER BY THE MICROENCAPSULATION METHOD

Chernikevich I. P., Zimatkina T. I., Sorokopyt E. M.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

The article investigates immobilization of thiamine kinase (EC 2.7.6.2) from pig liver by microencapsulation into semipermeable membranes, protein behavior and its stability in the designated structures. At the same time enzyme lyophilization by the sublimation method was performed. It was shown that microencapsulated protein operated in the kinetic-diffusion regime, which influenced the way of kinetic curves passage and values of the obtained effective constants. When the enzyme was included in hydrophobic microcapsules made of butadiene latex the deviations of constants stayed within acceptable calculated values; when included in hydrophilic microcapsules on cellulose nitrate base – the values were much more significant. The immobilization of thiamine kinase increased its stability and thermolability. First of all this was correct for enzymatic preparations incorporated in hydrophobic carrier. Hydrophylic interactions were not so effective. The highest stabilization effect was obtained with thiamine kinase lyophilization.

Key words: *thiamine kinase, pig liver, microencapsulation, kinetic parameters, stability.*

Поступила: 25.02.2015

Отрецензирована: 13.10.2015