

УДК 577.112.387.2
©Бабич, Просеков

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ

О.О. Бабич, А.Ю. Просеков*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Кемеровский технологический институт пищевой промышленности”, 650056, Кемерово, б-р Строителей, 47; тел.: 8-904-960-94-96; факс: 8(3842) 39-68-88; эл. почта: elen.ulrich@mail.ru

Исследовано влияние процесса замораживания-оттаивания на активность рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Подобраны условия лиофилизации рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы, при которых фермент теряет около 10% активности в однократном цикле замораживания-оттаивания. Изучена зависимость криоскопической температуры фермента от концентрации белка в препарате. Выбрана оптимальная температура замораживания ферментного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы для сублимационной сушки.

Ключевые слова: L-фенилаланин-аммоний-лиаза, сушка, лиофилизация.

ВВЕДЕНИЕ. L-фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL, КФ 4.3.1.5) катализирует реакцию обратимого дезаминирования аминокислоты L-фенилаланина до *транс*-коричной кислоты и аммиака [1, 2]. Фермент представляет интерес в качестве терапевтического средства для лечения фенилкетонурии, может быть использован как для прямой терапии фенилкетонурии, так и для производства полноценных продуктов питания, не содержащих фенилаланин [3]. Кроме медицинского применения фермент может быть использован в биотехнологии для производства L-фенилаланина из *транс*-коричной кислоты [4].

Производство различных рекомбинантных белков всегда осложнено их ограниченной физической и/или химической стабильностью. В то время как в отношении их активности стабильность приобретает одно из ключевых значений. Зачастую увеличить стабильность рекомбинантных белков можно, превратив их твёрдую форму с помощью лиофилизации [4-6]. Этот процесс, известный еще с 1930-х годов, позволяет снизить содержание влаги в образце до 3% [5, 7-9]. В настоящее время большинство коммерческих ферментных препаратов на рынке обезвожены лиофилизацией. Однако лиофилизация, которая по существу является совокупностью процессов замораживания и сушки, может оказать достаточно негативное (и даже губительное) влияние на белок. В некоторых случаях даже успешно выполненная лиофилизация не является, к сожалению, гарантом необходимой

* - адресат для переписки

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ

стабильности ферментных препаратов. Более того, лиофилизация, как и любой другой процесс, нуждается в оптимизации [10, 11-13].

Поэтому целью данной работы является оптимизация параметров лиофилизации рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы.

МЕТОДИКА. L-фенилаланин-аммоний-лиаза получена методом генной инженерии с помощью гена *pal*, выделенного из *Rhodospiridium toruloides*.

Ген *pal* *Rhtoruloides* был синтезирован как описано в [14] и структурную часть гена, кодирующую L-фенилаланин-аммоний-лиазу обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *HindIII* для получения липких концов.

Для клонирования был выбран вектор рЕТ28а, предназначенный для экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* и содержащий в своём составе ген резистентности к канамицину. Кроме того, вблизи полилинкера вектор содержит последовательность, кодирующую His-Tag-конец, что значительно облегчает проведение хроматографии на Ni-содержащем носителе. При подготовке к клонированию вектор обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *HindIII* и очищали от продуктов реакции с помощью набора QuickClean. После гидролиза эндонуклеазами рестрикции у вектора появились липкие концы, комплементарные концам гена *pal* [15].

Получение компетентных клеток *E. coli* и их трансформацию плазмидной ДНК проводили при помощи стандартных методик [16]. Компетентные клетки BL21(DE3)/pLysECodonPlus RP и Rozetta(DE3) трансформировали плазмидой рЕТPAL-28а и высевали на чашки с агаризованной средой LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола. В контрольном варианте клетки трансформировали плазмидой рЕТ-28а. Чашки инкубировали при 37°C ночь, после чего высевали трансформантов в 10 мл LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры инкубировали на роторной качалке при 180 об/мин и 23°C до достижения оптической плотности 0,7 при $\lambda=590$, затем индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ до 1 мМ, и инкубировали клетки на роторной качалке при тех же условиях в течение 24 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4°C в течение 15 мин при 5000 g.

Очистка белка состояла из трёх стадий: получение бесклеточного экстракта, фракционирование сульфатом аммоний, очистка на Ni²⁺-NTA агарозе.

Для получения бесклеточного экстракта биомассу размораживали и ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 8,0). В суспензию добавляли ингибиторы протеаз. Клетки разрушали ультразвуком на установке ("MSE", Великобритания) при средней мощности и амплитуде равной 4, используя средний шток. Озвучивали суспензию (по 20 мл) на льду 6 раз по 20 сек с минутными интервалами для охлаждения. Гомогенат центрифугировали при 10000 об/мин 30 мин ("Eppendorf", Германия).

При фракционировании сульфатом аммония в супернатант вносили сухой сульфат аммония (осч) до 25% от насыщения. После растворения соли экстракт выдерживали 15 мин на холоду. Осадок отделяли центрифугированием, как указано выше. В супернатанте концентрацию соли доводили, добавляя сухой сульфат аммония, до 50% от насыщения. После 15-минутной инкубации на холоду повторно центрифугировали, и полученный осадок ресуспендировали в 55% сульфате аммония для отмывки от ЭДТА, содержавшегося в ингибиторах, также центрифугировали. Затем осадок растворяли в 150 мМ фосфатном буфере (рН 8,0) с 10 мМ имидазола. Для удаления нерастворимого осадка препарат центрифугировали при 10000 об/мин 20 мин.

Очистка на Ni²⁺-НТА агарозе. Затем наносили на колонку с Ni²⁺-НТА агарозой (7 мл), уравновешенную 150 мМ фосфатным буфером (рН 8,0) с 10 мМ имидазола. Работу проводили при +15°C. Колонку промывали от несвязанного материала исходным буфером (3 объёма колонки), затем – 150 мМ фосфатным буфером (рН 8,0) с 20 мМ имидазолом (3 объёма колонки). PAL элюировали тем же буфером с увеличенной до 250 мМ концентрацией имидазола (3 объёма). К образцу добавляли насыщенный раствор (NH₄)₂SO₄ до 0,4 М.

Гидрофобную хроматографию проводили на FPLC-хроматографе с детектором Pharmacia LKB-UV-M II при длине волны 280 нм (“Pharmacia”, Швеция), используя колонку 7×10 мм Protein PAK Glass HIC с фенил-TSK-5PW сорбентом (“Nihon Waters Ltd.”, Япония). Температура комнатная (+18 - +22°C). Образец после центрифугирования (15000 об/мин × 15 мин) наносили на колонку, уравновешенную 50 мМ фосфатным буфером и 0,8 М (NH₄)₂SO₄ при рН 8,2. Скорость нанесения 0,5 мл/мин, скорость промывки и элюции – 1 мл/мин. После нанесения образца колонку промывали тем же буфером в течение 10 мин. Элюировали PAL убывающим линейным градиентом (NH₄)₂SO₄ от 0,8 М до 0 М в 50 мМ фосфатном буфере при рН 8,2. Объём градиента 35 мл.

Фермент выходил с колонки от 0,2 М до нулевой концентрации сульфата. Фракции, содержавшие активность, объединяли. Для анализа чистоты препарата использовали диск-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия.

Для определения активности PAL использовали методику, опубликованную “Sigma” (США) с небольшими изменениями в приготовлении реакционной смеси. Все растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Состав стандартной инкубационной смеси (1 мл): 0,2 М Трис-НСl, рН 8,5 – 0,5 мл; 0,05 М L-фенилаланин – 0,04 мл; деионизованная вода – 0,42 мл.

После перемешивания и предынкубации (не менее 5 мин при +30±0,1°C) реакцию начинали добавлением 0,04 мл разведённого фермента – 0,025–0,125 Е/мл ФАЛ.

В контрольную пробу вместо фермента добавляли 0,04 воды.

Реакцию непрерывно регистрировали при 270 нм на спектрофотометре “Shimadzu UV-1800”, оборудованном термостатом (“Shimadzu”, Япония), в кварцевых кюветах с 1 см световым путём. Сбор и анализ данных осуществляли компьютерной программой UV-probe v (“Shimadzu”). Расчёт активности PAL проводили по формуле из методики Sigma с использованием миллимолярного коэффициента экстинкции *транс*-коричной кислоты, равного 19,73.

$$\text{Активность (Ед / мл)} = \frac{(\Delta \text{ОП}_{270} / \text{мин Опыт} - \Delta \text{ОП}_{270} / \text{мин Контроль}) \times V_{p.c.m.} \times f}{19,73 \times V_{об.}}$$

$$\text{Удельная активность (Ед / мг · белка)} = (\text{Ед / мл}) \times \frac{1}{C}$$

Где: *V_{p.c.m.}* – объём реакционной смеси (мл); *f* – коэффициент разбавления исходного раствора препарата PAL; 19,73 – коэффициент миллимолярной экстинкции *транс*-коричной кислоты при 270 нм; *V_{об.}* – объём образца в мл; *C* – концентрация белка в исходном растворе (мг/мл); мин опыт – время измерения активности фермента в опыте; мин контроль – время измерения активности фермента в контроле.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ

За единицу активности принимали количество PAL, которое катализирует за минуту превращение 1 мкмоль L-фенилаланина в *транс*-коричную кислоту и NH₃ при pH 8,5 и 30°C.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при A₂₈₀.

Чистоту препаратов анализировали диск-электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по Лэммли. Электрофорез проводили при 60 В для формирующего и 140 В для разделяющего гелей в пластинах полиакриламидного геля (ПААГ) толщиной 0,75 мм при температуре +10°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Поскольку PAL наиболее стабильна в щелочной области pH, эксперименты по заморозке и лиофилизации проводили при pH 8,5 в Трис-HCl буфере. Замораживание проводили при температуре -18°C, при продолжительности 12 ч. Оттаивание проводили при температуре 6-8°C. Однократное замораживание-оттаивание показало, что потери активности фермента в этих условиях эксперимента составляют 12% (табл. 1.).

Таблица 1. Результаты определения потери активности PAL при замораживании-оттаивании.

Фермент PAL	Средняя величина удельной активности, Е/мг	Стандартное отклонение	Потери активности, %
До заморозки	0,698	0,006	0
После размораживания	0,616	0,009	12

В последующих экспериментах в процессе диализа потери активности фермента не происходило. Диализованный препарат имел удельную активность, равную 2,99 Е/мг белка. Концентрация белка составляла 8,51 мг/мл.

Для сохранения исходных свойств препаратов или высокой жизнеспособности ферментного препарата в процессе лиофилизации и последующем хранении используют различные защитные среды (стабилизаторы). В качестве таких стабилизаторов нами были D-трегалоза, поливинилпирролидон и Трис-HCl буферный раствор, как одни из самых доступных полимеров с варьирующей степенью вязкости.

Три образца фермента с добавлением D-трегалозы, поливинилпирролидона и Трис-HCl буферного раствора подвергали сублимационной сушке и оценивали потери активности после лиофилизации. Контролем служила активность препарата после диализа. Результаты определения активности фермента до и после лиофилизации представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты определения потери активности фермента PAL при лиофилизации.

Фермент PAL	Средняя величина удельной активности PAL, Е/мг белка	Стандартное отклонение	Потери активности PAL, %
До сушки (контроль)	2,99	0,03	0
Трис-HCl буфер	2,58	0,05	13,8
Трегалоза 0,5%	3,00	0,05	0
Поливинилпирролидон 0,5%	2,83	0,04	5,3

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что наилучшим стабилизатором активности PAL при лиофилизации является 0,5% раствор D-трегалозы. Поливинилпирролидон при той же концентрации характеризуется меньшим эффектом. Кроме того, данное соединение проблематично удалять из препаратов белка, поскольку оно сильно поглощает в УФ-диапазоне.

Таким образом, подобраны условия лиофилизации рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Показано, что фермент теряет около 10% активности при однократном цикле замораживания-оттаивания в 0,1 М трис-HCl буфере (рН 8,5). Использование этого же буфера, дополнительно содержащего 0,5% трегалозы, позволяет проводить лиофилизацию фермента практически без потери активности.

По мнению большинства исследователей, качество биологических объектов, высушенных методом сублимации, в значительной степени зависит от количества влаги, удаленной из замороженного состояния. В свою очередь, на количество вымороженной влаги влияют температура замораживания объекта, а также его состав и свойства, в частности начальная криоскопическая температура [5, 7].

Известно, что на криоскопическую температуру ферментов оказывает влияние концентрация белка [3]. В связи с этим исследовали зависимость криоскопической температуры фермента от концентрации белка в препарате (рис. 1).

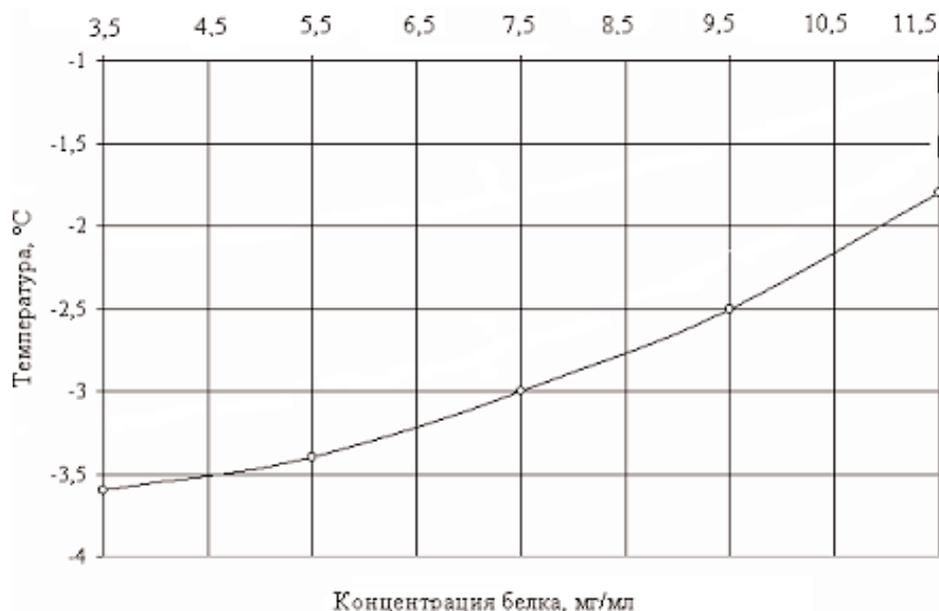


Рисунок 1.

Зависимость криоскопической температуры ферментного препарата PAL от концентрации белка.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что между криоскопической температурой фермента и концентрацией белка в диапазоне от 3,5 мг/мл до 11,5 мг/мл существует обратная логарифмическая зависимость, описываемая аппроксимирующим уравнением (2):

$$t_{кр} = 1,0381 \cdot \ln(x) - 3,9539 \quad (2).$$

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ

Из уравнения (2) и рисунка 1 следует, что при изменении концентрации белка в препарате от 3,5 до 7,5 мг/мл его криоскопическая температура изменяется на 0,3-0,6°C; при изменении концентрации белка от 7,5 до 11,5 мг/мл криоскопическая температура изменяется на 0,6-1,3°C. Изменение криоскопической температуры ферментного препарата в зависимости от концентрации белка, вероятно, происходит вследствие перехода свободной влаги в связанную.

Количеством вымороженной воды ω называют количество льда при данной температуре замораживания, отнесенное к суммарному количеству воды и льда, содержащихся в объекте при той же температуре. Количество вымороженной влаги можно рассчитать по формуле (3), полученной на основании закона Рауля [3]:

$$\omega = 1 - \frac{t_{кр}}{t} \quad (3),$$

где $t_{кр}$ – начальная криоскопическая температура, °C; t – любая более низкая криоскопическая температура до окончания вымерзания воды, °C.

На рисунке 2 представлена кривая, характеризующая процесс вымораживания влаги в ферментном препарате PAL.

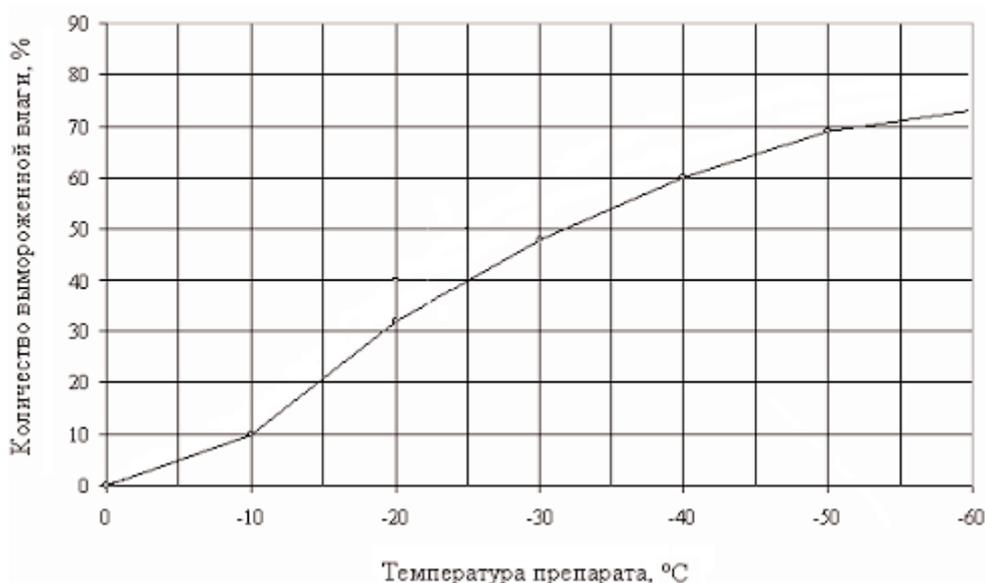


Рисунок 2.

Зависимость количества вымороженной влаги от температуры.

Из зависимости, представленной на рисунке 2 следует, что при температуре -50-60°C в препаратах вымораживается до 70-80% влаги. Очевидно, что экономическая эффективность сушки ферментных препаратов в таких условиях является крайне низкой.

Кривая, представленная на рисунке 2, показывает, что 60-73% влаги в ферментном препарате вымораживается при температуре -40°C. Дальнейшее понижение температуры не приводит к заметному увеличению количества вымороженной влаги в объекте.

Учитывая результаты экспериментальных исследований, можно отметить, что ферментные препараты следует замораживать до температуры -40°C . Анализ кривых, представленных на рисунке 2, свидетельствует о том, что количество вымороженной влаги зависит от начальной криоскопической температуры ферментного препарата. При одной и той же температуре замораживания количество вымороженной влаги тем меньше, чем ниже криоскопическая температура препарата. Дальнейшие исследования направлены на изучение кривых сушки препарата PAL.

Типичные графики сушки ферментного препарата PAL при исследуемых уровнях стабилизации высушенного слоя представлены на рисунке 3.

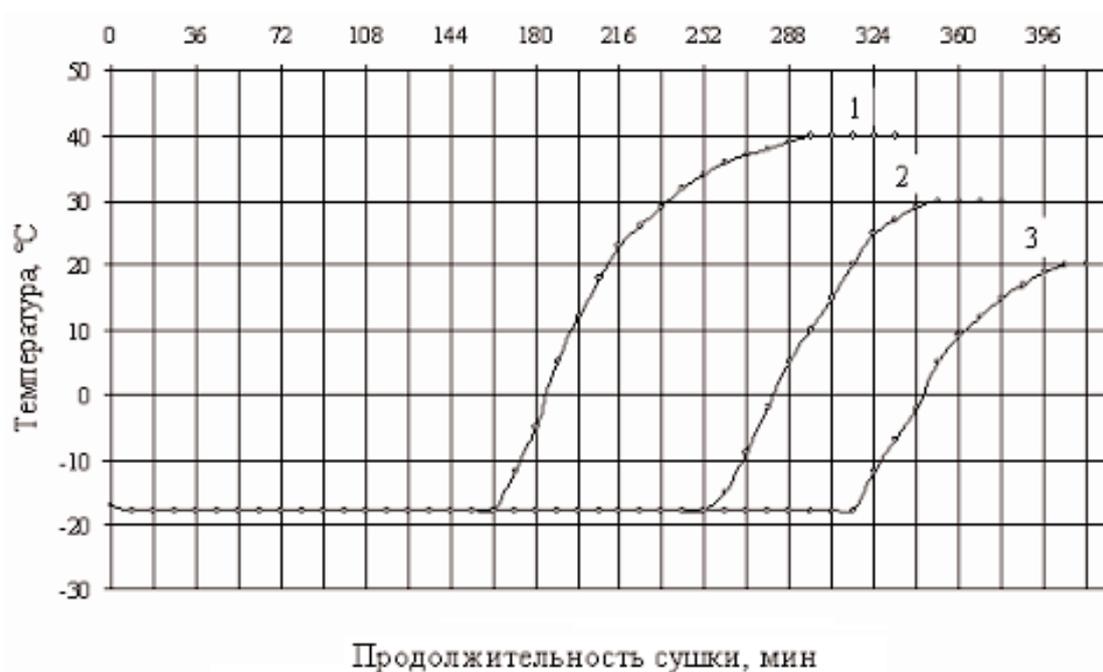


Рисунок 3.

Типичные графики сушки ферментного препарата PAL при температурах стабилизации высушенного слоя: 1 - $+40^{\circ}\text{C}$; 2 - $+30^{\circ}\text{C}$; 3 - $+40^{\circ}\text{C}$.

В соответствии с существующей теорией процесс сублимационной сушки биологических объектов разделен на три периода: периода вакуумирования системы, периода сублимации, периода прогрева (удаления прочносвязанной влаги) [5]. Известно, что продолжительность сушки и качество высушенного продукта зависят от количества удаленной влаги в период сублимации. Чем больше влаги удаляется в период сублимации, тем меньше материал подвергается воздействию положительных температур в период удаления прочносвязанной влаги. Однако при увеличении продолжительности периода сублимации увеличивается общая продолжительность периода сушки. Количество удаляемой влаги из продукта при сушке зависит от структуры и физико-химических свойств объектов сушки [3].

В таблице 3 представлено количество влаги, удаленной из ферментного препарата в процессе сублимационной сушки при исследуемых температурах стабилизации высушенного слоя.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ

Таблица 3. Количество влаги, удалённой из ферментного препарата в процессе сублимационной сушки.

Период сублимационной сушки	Количество влаги (%) от общего количества влаги, удалённой во время сушки при температуре, °С				
	5	15	20	30	40
Вакуумирование системы	19	22	20	19	19
Сублимация	42	53	55	57	62
Прогрев	38	25	23	20	17
Общая продолжительность, мин	410	375	330	270	240

С повышением уровня стабилизации температуры высохшего слоя увеличивается количество влаги, удалённой в период сублимации, и уменьшается количество влаги, удаленной в период прогрева. Температура, равная +20-40°C, является наиболее благоприятной для ведения процесса сушки ферментного препарата PAL, поскольку при таком уровне температур интенсифицируется удаление влаги при отрицательных температурах центрального слоя ферментного препарата, сокращается продолжительность сушки.

При исследовании влияния уровня стабилизации температуры высохшего слоя на продолжительность лиофилизации и свойства ферментных препаратов была изучена микроструктура сухого препарата. На рисунке 4 представлена микроструктура препарата PAL, полученного способом сублимационной сушки при различных температурах стабилизации на поверхности высохшего слоя.

Как следует из рисунка 4, высушенный ферментный препарат PAL, выработанный сублимационным способом, содержит примерно одинаковые по размеру частицы с твёрдой и гладкой поверхностью.

При проведении процесса сублимационной сушки в производственных условиях значительный интерес представляют данные по удельным затратам теплоты на единицу удалённой влаги из ферментных препаратов в зависимости от температуры и продолжительности концентрирования. На рисунке 5 представлена зависимость удельных затрат теплоты на сублимационную сушку ферментного препарата PAL.

Из приведённых зависимостей следует, что при увеличении температуры стабилизации высохшего слоя происходит повышение удельных затрат теплоты на сублимационную сушку ферментного препарата. Известно, что удельный расход теплоты в вакуум-выпарных установках составляет 0,8-1,2 кВт/кг удаленной влаги. По данным собственных исследований, установлено, что удельные затраты теплоты на сублимационную сушку ферментного препарата PAL при температуре +20-40°C составляют 0,7-0,9 кВт/кг удаленной влаги. Использование сублимационной установки позволяет уменьшить затраты теплоты на сушку ферментного препарата практически по сравнению с вакуумными выпарными аппаратами на 10-20%.

При температурах стабилизации высохшего слоя +20-40°C массовая доля влаги не превышает 5,0%. При температурах менее 20°C высушенные ферментные препараты имеют повышенное значение массовой доли влаги (от 6,0 до 10,5%).

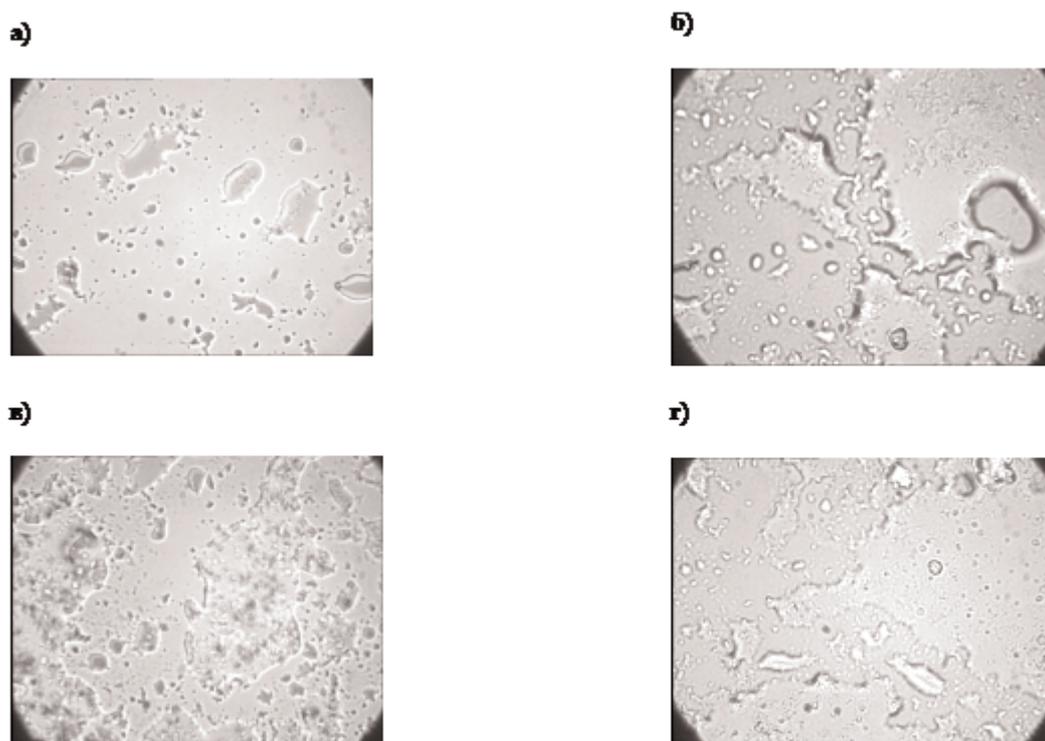


Рисунок 4.

Микроструктура высушенного ферментного препарата (кратность увеличения 500 раз) при различных температурах стабилизации на поверхности высушенного слоя:
а - +15°C; б - +20°C; в - +30°C; г - +40°C.

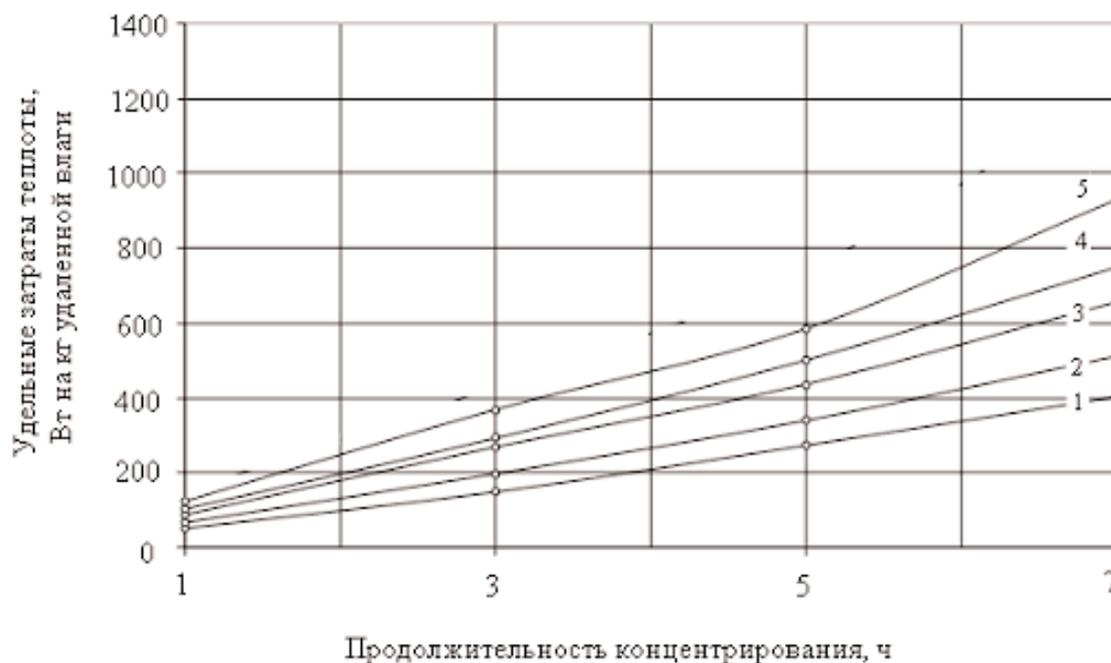


Рисунок 5.

Зависимость удельных затрат теплоты на сублимационную сушку ферментного препарата PAL в зависимости от температуры стабилизации высушенного слоя:
1 - 5°C; 2 - 15°C; 3 - 20°C; 4 - 30°C; 5 - 40°C.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведены исследования направленные на изучение процесса лиофилизации ферментного препарата PAL, выбраны оптимальные параметры лиофилизации и изучена степень устойчивости биопрепарата на действие низких температур. Установлено, что PAL теряет около 10% активности при однократном цикле замораживания-оттаивания в 0,1 М трис-HCl буфере (pH 8,5). Показано, что использование этого же буфера в присутствии 0,5% трегалозы, позволяет проводить лиофилизацию фермента практически без потери активности. Выбрана оптимальная температура замораживания ферментного препарата PAL для сублимационной сушки – минус 40°C, кроме того установлено, что температура, равная +20-40°C, является наиболее благоприятной для ведения процесса сушки ферментного препарата PAL, поскольку при таком уровне температур интенсифицируется удаление влаги при отрицательных температурах центрального слоя ферментного препарата, сокращается продолжительность сушки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sarkissian C.N.* (2005) *Mol. Genet. Metab.*, **86**, 22-26.
2. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
3. *Sarkissian C.N., Shao Z., Blain F., et al* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2339-2344.
4. *Evans C.T., Hanna K., Payne C. et al* (1987) *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 417-421.
5. *Акифьев О.Н., Галвиня В.Я., Тихвинская Т.И.* (1986) Разработка получения лиофилизированного фторафура. Рига. с. 26-27.
6. *Базиков В.И., Будрик Г.В.* (1997) *Мол. пром.*, **7**, 20.
7. *Белоус А.М., Луговой В.И., Гулевский А.К.* (1975) *Криобиология и криомедицина*, **34**, 8-15.
8. *Бланков Б.И., Клебанов Д.Л.* (2001) Применение лиофилизации в микробиологии, 326.
9. *Долинов К.Е.* (1969) *Основы технологии сухих биопрепаратов*, 231.
10. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот Х., Джонс К.* (1991) *Справочник биохимика*, 544.
11. *Никитин Е.Е., Звягин И.В.* (1971) Замораживание и высушивание биологических препаратов. Колос, Москва, 343.
12. *Лыков А.В., Грязнов А.А.* (1956) *Молекулярная сушка. Пищепромиздат, Москва*, 268.
13. *Лыков А.В.* (1956) *Тепло- и массообмен в процессах сушки. Госэнергоиздат, Москва*, 464.
14. *Anion J.G., Gilbert H.J., Oram J.D., Minton N.P.* (1987) *Gene*, **58**(2-3), 189-199.
15. *Бабич О.О., Солдатова Л.С., Просеков А.Ю.* (2011) *Биотехнология*, **4**, 31-39.
16. *Sambrook J., Fritch E.F., Maniatis T.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed.2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.-Y.*, 313.

Поступила: 09. 09. 2012.

OPTIMIZATION OF L-PHENYLALANINE-AMMONIA-LYASE LIOPHILIZATION

O.O. Babich, A.Y. Prosekov

Kemerovo Technology Institute of Food Industry, prosp. Stroiteley, 47, Kemerovo, 650056 Russia;
tel.: 8-904-960-94-96; fax: 8(3842) 39-68-88; e-mail: elen.ulrich@mail.ru

The influence of freezing-thawing on the activity of recombinant L-phenylalanine-ammonia-lyase has been investigated. Conditions of liophilization of recombinant L-phenylalanine-ammonia-lyase at which enzyme loses about 10% of activity in a single freeze-thaw cycle are chosen. Dependence of cryoscopic temperature of enzyme from concentration of protein in a preparation is studied. The optimum temperature of freezing of enzymatic preparation L-phenylalanine-ammonia-lyase for sublimatic drying is chosen.

Key words: L-phenylalanine-ammonia-lyase, drying, liophilization.