

відсоток втрат препарату в кислому середовищі шлунка, де кислоточутливий препарат швидко зруйнується і не матиме жодної терапевтичної дії, але в той же час збільшує тривалість вивільнення ліків у кишечнику, що знижує пікові концентрації в крові, зменшуючи таким чином побічні ефекти, які виникають при швидкому набряканні капсули й активному вивільненні

препарату. На основі проведених досліджень доведено, що одержані мікрокапсули на основі суміші природних полімерів натрію альгінату та агару є рН-чутливими і можуть використовуватися для контрольованого вивільнення білкових засобів. Отримані мікрокапсули, за результатами проведених досліджень, біосумісні.

1. Meng X. pH sensitive alginate-chitosan hydrogel beads for carvedilol delivery / X. Meng, P. Li, Q. Wei, H.-X. Zhang // Pharmaceutical Development and Technology. – 2009. – P. 1–7.
2. George M. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs / M. George, T. E. Abraham // International Journal of Pharmaceutics. – 2007. – V. 335. – P. 123–129.
3. Dubey R. R. Two-Stage Optimization Process for Formulation of Chitosan Microspheres / R. R. Dubey, R. H. Parikh // AAPS PharmSciTech. – 2004. – V. 5. – P. 1–9.
4. Gaucher G. Polymeric micelles for oral drug delivery / G. Gaucher, P. Satturwar, M.-Ch. Jones, A. Furtos, J.-Ch. Leroux // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2010. – V. 76. – P. 147–158.
5. Orive G. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates / G. Orive, S. Ponce, R. M. Hernandez et al. // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – P. 3825–3831.

M. Chaban, I. Davidovich, N. Antoniuk, D. Bilko, A. Burban

## PREPARATION OF PH-SENSITIVE ALGINATE-AGAR MICROCAPSULES FOR CONTROLLED RELEASE OF PROTEIN DRUGS

*Agar-alginate microcapsules for oral delivery of protein drugs were obtained via emulsification and extrusion methods. The effect of the ratio of agar to alginate on the size, swelling and release kinetics of bovine serum albumin was investigated. Microcapsules conformity to requirements for the controlled drugs release systems was analyzed.*

**Keywords:** pH-sensitive microcapsules, emulsification and extrusion methods.

УДК 541.18.045

Гузикевич К. Є., Коновалова В. В., Бурбан А. Ф.

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІММОБІЛІЗОВАНОЇ $\alpha$ -АМІЛАЗИ НА ТРАНСПОРТНІ ТА БІОКАТАЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ УЛЬТРАФІЛЬТРАЦІЙНИХ МЕМБРАН

*Досліджено вплив іммобілізації  $\alpha$ -амілази на промислових поліетерсульфонових мембранах на їхні транспортні характеристики. Іммобілізацію проведено методом “layer by layer” (LBL) із нанесенням поліелектролітних шарів [PSS/ $\alpha$ -амілаза]<sub>n</sub>. Вивчено концентраційні явища при ультрафільтрації розчину крохмалю різних концентрацій крізь мембрани з іммобілізованою  $\alpha$ -амілазою. Встановлено, що використання мембрани з іммобілізованим ферментом призводить до зростання коефіцієнта масопереносу вдвічі, а швидкість конвективного потоку пермеату порівняно з немодифікованою мембраною збільшується від 15 до 30 %.*

**Ключові слова:** метод “layer by layer”,  $\alpha$ -амілаза, гідроліз крохмалю, концентраційна поляризація.

### Вступ

Гідроліз розчиненого крохмалю з використанням мембранних технологій є відносно новим підходом до його переробки. Традиційна технологія гідролізу крохмалю характеризується

значними витратами ферменту та низькою продуктивністю через значну тривалість процесу (24–48 год) і великі реакційні об'єми. Альтернативою традиційним реакторам періодичної дії є безперервні ультрафільтраційні мембранні

реактори, в яких поєднання процесу ферментативного гідролізу з ультрафільтраційним розділенням дозволить відводити продукти реакції гідролізу, що, своєю чергою, буде виключати інгібування ними активних центрів біокатализатора.

У науковій літературі описано мембранні реактори безперервної дії для гідролізу крохмалю з використанням  $\alpha$ -амілази у розчиненому вигляді [1–2]. Головним недоліком таких реакторів є різке падіння продуктивності, спричинене концентраційною поляризацією. Застосування інтенсивного перемішування [1] і підвищення температури в реакторі [2] не призводило до значного покращення результатів.

Нами запропоновано новий спосіб зменшення впливу концентраційної поляризації при ультрафільтрації розчину крохмалю, а саме, використання мембран з іммобілізованою на їхній поверхні  $\alpha$ -амілазою. Передбачається, що шар ферменту на поверхні мембрани запобігатиме різкому підвищенню концентрації крохмалю біля поверхні мембрани, зменшуючи таким чином вплив концентраційної поляризації на швидкість конвективного потоку. Тому метою цієї роботи є дослідження впливу іммобілізації  $\alpha$ -амілази на коефіцієнт масопереносу крохмалю при ультрафільтрації його водного розчину.

Для іммобілізації ферменту на поверхні мембран було застосовано метод “layer by layer” (LBL), запропонований Г. Дехером [3], що полягає у послідовній електростатичній адсорбції негативно та позитивно заряджених поліелектролітів. Як негативно заряджений полімер використовували полістиренсульфонат (PSS), як позитивно заряджений –  $\alpha$ -амілазу в кислому середовищі. Існує велика кількість праць, присвячених іммобілізації ферментів за допомогою методу LBL на різноманітних носіях [4–7]. Іммобілізовані таким методом ферменти часто є значно стабільнішими, зберігають активність в більшому діапазоні рН і температури [7].

### Реактиви та матеріали

Були використані поліетерсульфононі мембрани марки UF-PES-050H та UP020P (виробництво Microdyn-Nadir Німеччина);  $\alpha$ -амілаза з *Bacillus licheniformis* марки Termamyl SC (виробництво Novozymes, Німеччина) з ферментативною активністю 1000 од/мл; полістиренсульфонат (PSS) з молекулярною масою 70 000 Да (Aldrich); крохмаль водорозчинний (Міранда-С).

#### Методика іммобілізації ферменту

Поліетерсульфононі мембрани попередньо відмивали в дистильованій воді протягом 1 год. Модифікування проводили зі сторони селективного шару мембрани. Розчин полістиренсульфонату (PSS) з концентрацією 0,02 М у 0,5 М NaCl наносили на селективний шар мембрани пер-

шим та витримували протягом 5 хв. Перед і після нанесення шару  $\alpha$ -амілази поверхню інтенсивно відмивали дистильованою водою. Концентрацію ферменту змінювали від 25 до 1000 од. акт./мл, рН модифікувального розчину становив 3,5. Процедуру повторювали до нанесення необхідної кількості шарів.

Біокаталітичні властивості мембрани оцінювали за ступенем конверсії крохмалю, що є відношенням кількості гідролізованого в процесі ультрафільтрації крохмалю до його початкової кількості. Ступінь конверсії крохмалю визначали за формулою:

$$\alpha = \frac{C_0 \cdot V_0 - C_k \cdot V_k - C_p \cdot V_p}{C_0 \cdot V_0} \cdot 100\%$$

де  $C_0$ ,  $V_0$  – концентрація та об’єм речовини у початковому розчині,  $C_k$ ,  $V_k$  – концентрація та об’єм речовини у концентраті,  $C_p$ ,  $V_p$  – концентрація та об’єм речовини у пермеаті.

Концентрацію крохмалю визначали за концентрацією комплексу крохмаль-йод фотоколориметрично ( $\lambda = 410$  нм).

Для визначення розділювальних характеристик модифікованих мембран використовували стандартну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8050 (виробництво Millipore, США). Робочий тиск змінювали від 50 до 350 кПа.

### Результати та їх обговорення

#### Дослідження впливу іммобілізації ферменту на водопроникність мембран

Очевидно, що іммобілізація на поверхні мембрани ферменту повинна призводити до перекривання пор мембрани, що, своєю чергою, призводить до зменшення її водопроникності.

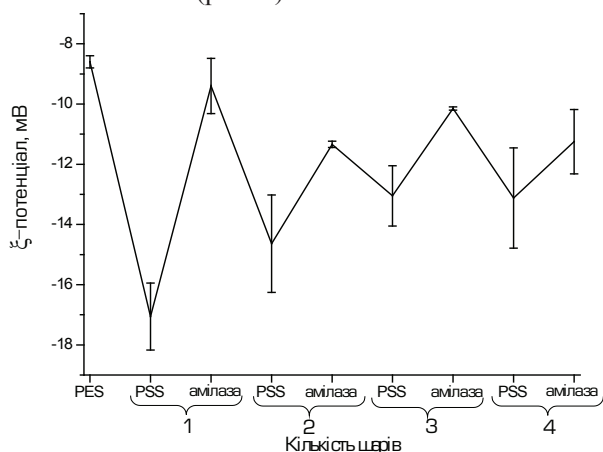
Як було показано нами раніше [9], найбільше падіння потоку води спостерігається на мембрані із нанесеним першим шаром, оскільки  $\Delta J_v$  після цього становить 84 л/м<sup>2</sup>·год, а  $\Delta J_v$  після нанесення наступних шарів не перевищує 9 л/м<sup>2</sup>·год. При цьому найбільше на падіння об’ємного потоку (55–56 л/м<sup>2</sup>·год) впливає адсорбція на поверхні мембрани полістиренсульфонату (PSS).

Таблиця 1. Залежність водопроникності та ступеня конверсії крохмалю від кількості поліелектролітних шарів ([PSS/ $\alpha$ -амілаза]<sub>n</sub>) на мембрані UF-PES-050H

Кількість шарів	$J_v$ , л/м <sup>2</sup> ·год	$\Delta J_v$ , л/м <sup>2</sup> ·год	$\alpha$ , %
0	206,11	–	0
1	121,94	84,17	100
2	113,18	8,76	81
3	112,56	0,62	65
4	109,2	3,36	40

Нами було показано також [9], що кількість ферменту, іммобілізованого у верхньому шарі мембрани, зменшується при зростанні кількості поліелектролітних шарів, що підтверджується дослідженнями біокаталітичних властивостей модифікованих мембран. Як видно з табл. 1, з нанесенням кожного наступного шару ступінь конверсії крохмалю у процесі фільтрування зменшувався на 20–25 %.

Отримані результати підтверджуються вимірюваннями  $\zeta$ -потенціалу поверхні мембран у процесі нанесення поліелектролітних шарів PSS/ $\alpha$ -амілаза (рис. 1).



**Рис. 1.** Зміна  $\zeta$ -потенціалу поверхні поліетерсульфонової (PES) мембрани при нанесенні поліелектролітних шарів (електроліт –  $1 \cdot 10^{-3}$  М KCl, pH = 3,5)

Як видно на рис. 1, під час адсорбції PSS на мембрані, що відбувається за рахунок гідрофобних взаємодій,  $\zeta$ -потенціал поверхні стає більш негативним. Однак при адсорбції білкової молекули на негативно заряджену поверхню відбувається лише невелике підвищення її  $\zeta$ -потенціалу, а не повне обернення знаку заряду на позитивний. Очевидно, заряд білкової молекули, навіть при pH = 3,5, є недостатньо високим, щоб відбулася перезарядка мембрани, тому під час нанесення наступного шару PSS він практично не адсорбується на негативно зарядженій поверхні. Так, на рис. 1 можна спостерігати поступове зменшення зміни  $\zeta$ -потенціалу зі збільшенням кількості поліелектролітних шарів.

Таким чином, для вирішення поставлених у роботі завдань оптимальною є мембрана з одним поліелектролітним шаром ([PSS/ $\alpha$ -амілаза]<sub>1</sub>), оскільки вона характеризується максимальною продуктивністю та біокаталітичною активністю.

*Дослідження концентраційних явищ при ультрафільтрації розчину крохмалю*

У баромембранних процесах, що супроводжуються концентраційною поляризацією, таких як мікрофільтрація та ультрафільтрація, спостерігається суттєве падіння трансмембранного потоку з часом експлуатації.

З основного рівняння концентраційної поляризації (1) випливає, що основними факторами, які відповідають за зростання концентрації розчинених речовин у примембранному шарі, є швидкість конвективного потоку  $J$ , що характеризує мембранний вплив, та коефіцієнт масопереносу  $k$ , що характеризує вплив гідродинамічних умов та природи субстрату:

$$\frac{C_m}{C_b} = \exp\left(\frac{J}{k}\right). \quad (1)$$

Потік чистої води визначається параметрами використаної мембрани і постійний для цієї мембрани. Водночас коефіцієнт масопереносу  $k$ , який є відношенням коефіцієнта дифузії до товщини примембранного шару, сильно залежить від гідродинаміки системи і дає можливість його оптимізації. Він залежить головним чином від швидкості потоку на вході в мембрану, коефіцієнта дифузії розчиненої речовини, в'язкості та густини розчину, а також від розмірів і форми мембранного модуля. У процесі ультрафільтрації потік ( $J$ ) великий, а коефіцієнти масопереносу малі, оскільки коефіцієнти дифузії розчинених високомолекулярних компонентів малі ( $10^{-10}$  –  $10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с та менше) [8].

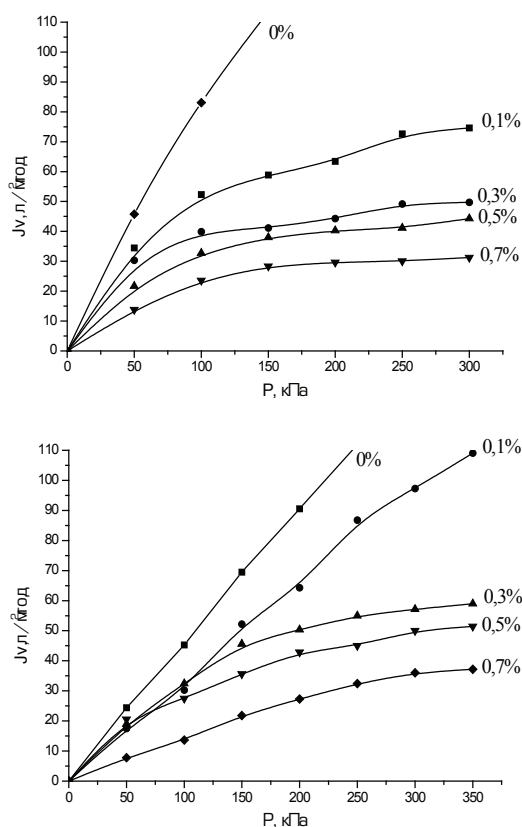
Зазвичай при ультрафільтрації потік чистої води крізь мембрану прямо пропорційний прикладеному гідростатичному тиску. Однак у випадку розчину (введення у воду розчиненого компонента) ситуація змінюється: при підвищенні тиску потік спочатку збільшується, а по досягненні певного максимального тиску потік перестає зростати зі збільшенням тиску. Найбільший потік, що досягається за таких умов, називають максимальним потоком  $J_{\infty}$ . Замінивши у рівнянні (1)  $J$  на  $J_{\infty}$ , побачимо, що при постійній концентрації розчину на вході в мембрану збільшення коефіцієнта масопереносу  $k$  призводить до збільшення  $J_{\infty}$ :

$$J_{\infty} = k \ln\left(\frac{C_m}{C_b}\right) = k \ln C_m - k \ln C_b, \quad (2)$$

де  $k$  – коефіцієнт масопереносу;  $C_m$  – концентрація розчиненої речовини у примембранному шарі;  $C_b$  – концентрація вихідного розчину.

Як вже було сказано вище, водопроникність мембрани з іммобілізованим ферментом менша, ніж водопроникність чистої мембрани за рахунок формування додаткового селективного шару на її поверхні в процесі модифікування. Так, водопроникність немодифікованої мембрани UP020P при  $P = 100$  кПа перевищує водопроникність мембрани, модифікованої одним поліелектролітним шаром [PSS/ $\alpha$ -амілаза]<sub>1</sub>, на 40 л/м<sup>2</sup>год (рис. 2). В той же час потік пермеату крізь мембрану з іммобілізованою  $\alpha$ -амілазою (рис. 2, а) при ультрафільтрації розчину крохмалю концен-

трацією 0,3–0,7 %, навпаки, перевищував значення потоку крізь немодифіковану мембрану в усіх випадках на 5–10 л/м<sup>2</sup>год. Також у випадку мембрани з іммобілізованим ферментом досягнення максимального потоку ( $J_{\infty}$ ) спостерігається при більш високих тисках, а у випадку концентрації 0,1 % спостерігається прямо пропорційне зростання об'ємного потоку від прикладеного тиску, що характерне лише для ультрафільтрації чистих розчинників. А отже, при ультрафільтрації 0,1 % розчину крохмалю на мембрані з іммобілізованою амілазою концентраційна поляризація повністю відсутня.

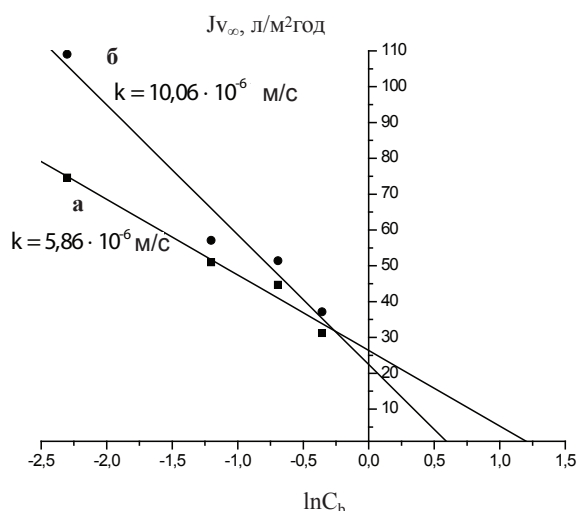


**Рис. 2.** Залежність об'ємного потоку пермеату крізь немодифіковану мембрану P020H (а) та мембрану з іммобілізованою  $\alpha$ -амілазою (б) від прикладеного тиску при різних концентраціях розчину крохмалю

Очевидно, іммобілізована на поверхні мембрани  $\alpha$ -амілаза призводить до підвищення максимального потоку пермеату через підвищення коефіцієнта масопереносу.

Для визначення коефіцієнта масопереносу  $k$  результати було представлено у лінійному вигляді як залежність  $J_{\infty}$  від  $\ln(C_b)$  (рис. 3).

Розрахунки коефіцієнтів масопереносу показують, що використання мембрани з іммобілізованим ферментом, за інших рівних умов, призводить до збільшення  $k$  майже вдвічі, порівняно з немодифікованою мембраною. Причиною цього є те, що при ферментативному гідролізі крохмалю



**Рис. 3.** Лінеаризація рівняння концентраційної поляризації для визначення коефіцієнта масопереносу крохмалю крізь немодифіковану мембрану P020H (а) та мембрану з іммобілізованою  $\alpha$ -амілазою (б) при 400 об./хв

зменшуються розміри його макромолекул, а також в'язкість розчину, що в результаті призводить до збільшення коефіцієнта дифузії крохмалю.

## Висновки

Методом “layer by layer” було проведено іммобілізацію  $\alpha$ -амілази на промислових поліетерсульфонових мембранах. Досліджено вплив модифікування мембран на їхні транспортні характеристики. Визначено, що об'ємний потік води крізь модифіковані мембрани знижується зі збільшенням кількості нанесених поліелектролітних шарів, а найбільша кількість ферменту адсорбується на мембрані у першому поліелектролітному шарі. Дослідження біокаталітичних властивостей модифікованих мембран також показало, що найкращу амілолітичну активність мають мембрани [PSS/ $\alpha$ -амілаза]<sub>1</sub>/PES (з одним поліелектролітним шаром). При нанесенні кожного наступного шару активність зменшувалася на 20–25 %.

Вивчено вплив модифікування на заряд поверхні мембран. Зменшення діапазону коливань  $\xi$ -потенціалу поверхні модифікованих мембран при нанесенні поліелектролітних шарів підтверджують зменшення кількості ферменту у поверхневому шарі зі збільшенням кількості нанесених шарів.

Досліджено концентраційні явища при ультрафільтрації крохмалю крізь мембрани UP020P з іммобілізованою  $\alpha$ -амілазою. Встановлено, що використання мембрани з іммобілізованим ферментом, незважаючи на зменшення її водопроникності після модифікування, призводить

до підвищення значень максимального потоку пермеату порівняно з немодифікованою мембраною на 15–30 % залежно від початкової концентрації крохмалю. Зменшення концент-

раційної поляризації відбувається за рахунок збільшення коефіцієнта масопереносу крохмалю модифікованих мембран в 1,7 разів.

1. Grzeczekowiak-Przyvecka A. Continuous potato starch hydrolysis process in a membrane reactor with tubular and hollow-fiber membranes / A. Grzeczekowiak-Przyvecka, L. Slominska // Desalination. – 2005. – Vol. 187. – P. 105–112.
2. Lubiewski Z. Increasing the efficiency of the enzymatic hydrolysis of potato starch in a membrane reactor / Z. Lubiewski, J. Le Thanh, G. Lewandowicz // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2010. – Vol. 15. – P. 917–922.
3. Decher G. Fuzzy nanoassemblies : Toward layered polymeric multicomposites // Science. – 1997. – Vol. 277. – P. 1232–1237.
4. Yi S.-J. Investigation of selective protein immobilization on charged protein array by wavelength interrogation-based SPR sensor / S. J. Yi, J. S. Yuk, S. H. Jung, G. K. Zhavnerko, Y. M. Kim, K. S. Ha // Molecules and Cells. – 2003. – Vol. 15. – P. 333 – 340.
5. Lvov Y. Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic Layer-by-layer adsorption / Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake // Journal of the American Chemical Society. – 1995. – Vol. 117. – P. 6117–6123.
6. Nguyen Q. T. Simple method for immobilization of bio-macromolecules onto membranes of different types / Q. T. Nguyen, Zh. Ping, T. Nguyen, P. Rigal // Journal of Membrane Science. – 2003. – Vol. 213. – P. 85–95.
7. Caruso F. Enzyme multilayers on colloidal particles: Assembly, stability, and enzymatic activity / F. Caruso, C. Schüler // Langmuir. – 2000. – Vol. 16. – P. 9595–9603.
8. Мулдер М. Введение в мембранную технологию / М. Мулдер. – М. : Мир, 1999. – 520 с.
9. Гузікевич К. Є. Іммобілізація  $\alpha$ -амілази на поліетерсульфонових мембранах методом “Layer by Layer” (LBL) / К. Є. Гузікевич, В. В. Коновалова, А. Ф. Бурбан, Г. Г. Жалніна, С. Т. Олійнічук // Наукові записки НАУКМА. Хімічні науки і технології. – 2008. – Т. 79. – С. 40–44.

*K. Guzykevych, V. Konovalova, A. Burban*

## A STUDY OF STARCH MASS TRANSFER TROUGH ULTRAFILTRATION MEMBRANES WITH IMMOBILIZED $\alpha$ -AMYLASE

*In this paper the effect of  $\alpha$ -amylase immobilization on commercial polyethersulfone membranes and their transport characteristics were studied. The immobilization was performed using “layer by layer” (LBL) method with [PSS/ $\alpha$ -amylase]<sub>n</sub>-layers deposition. Concentration effects in the course of ultrafiltration of starch solution of varied concentrations through membranes with immobilized  $\alpha$ -amylase were investigated. It was found that using of membrane with immobilized enzyme leads to mass transfer coefficient two-fold increase; and the convective permeate flux increased for 15–30 % compared to unmodified membrane.*

**Keywords:** “layer by layer”,  $\alpha$ -amylase, starch hydrolysis, concentration polarization.