

ОТРИМАННЯ ЦЕЛЮЛОЗНИХ МЕМБРАН З ІММОБІЛІЗОВАНОЮ ГЛЮКООКСИДАЗОЮ

Отримано біокаталітичні полімерні мембрани шляхом іммобілізації глюкооксидази на целюлозних мембранах з прищепленою поліакриловою кислотою (ПАК). На промислові ультрафільтраційні целюлозні мембрани було хімічно іммобілізовано ПАК, яка надала мембранам функції рН-чутливості. Так, продуктивність мембрани з іммобілізованою ПАК при зростанні значень рН робочого розчину з 3,45 до 10 зменшується у 2,3 рази. Продуктивність мембран з іммобілізованою глюкооксидазою зростає з часом, що підтверджує дію ферменту, яка полягає в перетворенні глюкози на глюконову кислоту. При цьому рН у фільтраті зменшується з 6,18 до 4,5.

Ключові слова: целюлозні мембрани, біокаталітичні мембрани, рН-чутливі мембрани, поліакрилова кислота, глюкооксидаза.

Вступ

Пріоритетним напрямом досліджень, зокрема, в мембранології, сучасній біомедичній технології, фармації, трансплантології тощо є створення новітніх функціональних матеріалів, які за своєю здатністю реагувати на зміну навколишнього середовища наближаються до розумних природних систем [1; 2].

Серед досліджень, пов'язаних зі створенням мембран з додатковими властивостями, чи не найбільшу увагу приділено створенню біокаталітичних мембран. Вони являють собою полімерні мембрани з іммобілізованими на їхній поверхні біокаталізаторами (ферментами або клітинами). Такі мембрани мають низку переваг, наприклад, вони менше забруднюються завдяки здатності іммобілізованих біокаталізаторів розщеплювати речовини, що містяться в розчині, що пропускається, а також ефективніше його очищують [3; 4].

Також важливо зазначити, що іммобілізовані ферменти мають низку переваг у порівнянні з вільними молекулами. Насамперед, такі ферменти, що являють собою гетерогенні каталізатори, легко відокремлюються від реакційного середовища і можуть багаторазово використовуватися, забезпечуючи безперервність каталітичного процесу. Крім того, іммобілізація веде до зміни властивостей ферменту: субстратної специфічності, стійкості, залежності активності від параметрів середовища. Іммобілізовані ферменти довговічні і в тисячі і десятки тисяч разів стабільніші за вільні ензими. Усе перераховане забезпечує високу економічність, ефективність і конкурентоспроможність технологій, які використовують іммобілізовані ферменти [5; 6].

Існує два основні методи іммобілізації ферментів: фізичний та хімічний. При фізичній іммобілізації фермент не зв'язаний з носієм ковалентними зв'язками. Головною ж відмінністю хімічних методів іммобілізації є те, що шляхом хімічної взаємодії, яка впливає на структуру ферменту в його молекулі, створюються нові ковалентні зв'язки, зокрема між білком і носієм [7].

На відміну від фізичних методів, цей спосіб іммобілізації забезпечує міцний і необоротний зв'язок ферменту з носієм і часто супроводжується стабілізацією молекули ензиму. Однак розташування ферменту щодо носія на відстані одного ковалентного зв'язку створює стеричні утруднення у здійсненні каталітичного процесу. Тому фермент відокремлюють від носія за допомогою спейсера, в ролі якого найчастіше виступають біфункціональні і поліфункціональні агенти (бромціан, гідразин, сульфурилхлорид, глутаровий діальдегід та ін.) [8].

Об'єкти з іммобілізованими ферментами, отримані із застосуванням хімічних методів, мають принаймні дві важливі переваги. По-перше, ковалентний зв'язок ферменту з носієм забезпечує високу міцність утвореного кон'югату. При широкому варіюванні таких умов, як рН і температура, фермент не десорбується з носія і не забруднює цільових продуктів реакції, що ним каталізується.

По-друге, хімічне модифікування ферментів здатне приводити до істотних змін їхніх властивостей, таких як субстратна специфічність, каталітична активність і стабільність [9].

Метою цієї роботи є отримання рН-чутливих та біокаталітичних целюлозних мембран шляхом прищеплення до їхньої поверхні ланцюгів поліакрилової кислоти з подальшою іммобілізацією

ферменту глюкооксидази та дослідження їхніх функціональних властивостей.

Матеріали і методи

Матеріали та реактиви

У роботі для дослідження процесу модифікування поверхні було використано целюлозні мембрани типу UC100T (Nadir, Німеччина).

Поліакрилова кислота $(C_3H_4O_2)_n$ – 35 % водний розчин. Молекулярна маса M_w 100 кДа (Sigma-Aldrich).

Дигідразид адипінової кислоти $C_6H_{14}N_4O_2$ (Sigma-Aldrich).

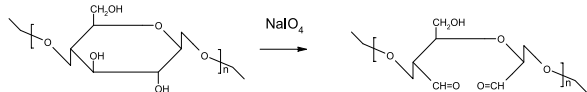
1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімід гідрохлорид (EDAC) $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$ (Sigma-Aldrich).

Методика прищеплення поліакрилової кислоти (ПАК) до поверхні целюлозних мембран

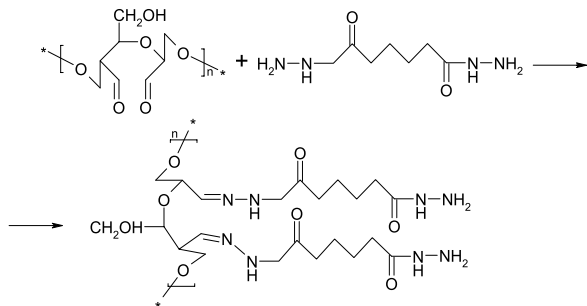
Прищеплення ПАК до поверхні целюлозних мембран проводили в чотири стадії. Спершу мембрани окиснювали 0,1М розчином натрій періодату $NaJO_4$ протягом 1 год при температурі 323 К. Після чого окислені мембрани занурювали в 0,1 % (мас.) водний розчин дигідразиду адипінової кислоти протягом 2 год за кімнатної температури. Одержані в результаті цієї реакції основи Шиффа відновлювали, витримуючи мембрани 30 хв у 0,01М розчині натрій боргідриду $NaBH_4$. Для іммобілізації на мембрани ПАК їх занурювали в 0,35 % (мас.) водний розчин ПАК. Як каталізатор цієї реакції використовували EDAC. Тривалість модифікування – 24 год за кімнатної температури. Після кожної стадії мембрани ретельно відмивали дистильованою водою.

Основні стадії модифікування можна подати у вигляді схеми.

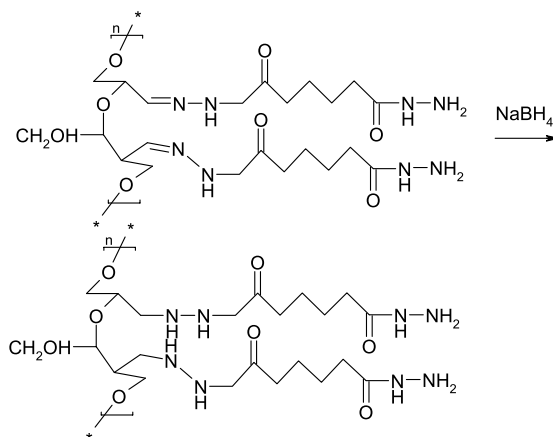
Стадія 1. Активація целюлози окисненням натрій періодатом:



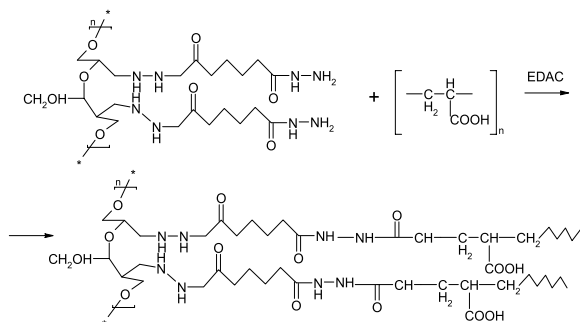
Стадія 2. Взаємодія діальдегіду целюлози з дигідразидом адипінової кислоти з утворенням основ Шиффа:



Стадія 3. Відновлення основ Шиффа тетрагідроборатом натрію:



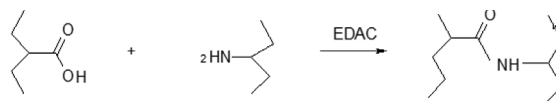
Стадія 4. Прищеплення ПАК до модифікованої дигідразидом адипінової кислоти целюлозної мембрани:



Методика іммобілізації глюкооксидази

Для іммобілізації глюкооксидази (Sigma-Aldrich) мембрани з прищепленою ПАК витримували у 0,05 % (мас.) водному розчині цього ферменту. Як каталізатор використовували EDAC. Тривалість іммобілізації – 2 год за кімнатної температури та 24 год при 281 К.

Іммобілізація глюкооксидази до мембрани, модифікованої ПАК, відбувалася за схемою:



Дослідження транспортних характеристик модифікованих мембран

Для визначення розділювальних характеристик мембран (проникності та розділювальної здатності) використовували стандартну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8050 (Millipore, США). Внутрішній об'єм комірки становив $0,05 \text{ м}^3$, площа робочої поверхні мембрани – $13,4 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2$, максимальний робочий тиск – 0,4 МПа. Для зниження впливу концентраційної поляризації на процеси розділення комірка обладнана магнітною мішалкою. Швидкість обертання мішалки

становила 250 ± 10 об/хв. Досліди з фільтрації проводили при 293 ± 2 К. Робочий тиск у комірці задавали за допомогою стисненого азоту.

Для дослідження зміни транспортних властивостей мембрани залежно від значень рН середовища модифікований зразок витримувався в розчині із заданим значенням рН протягом 20 хв. Розчини з необхідними значеннями рН отримували додаванням 0,1 М NaOH та 0,1 М HCl.

Для дослідження біокаталітичних властивостей мембран з іммобілізованою глюкооксидазою проводили ультрафільтрацію 0,02 М розчину глюкози («Дарниця», Україна). У 50 мл розчину глюкози додавали 0,16 г гексаціаноферату (III) калію. Біокаталітична реакція з гексаціанофератом (III) калію відбувається за схемою, наведеною на рис. 1.

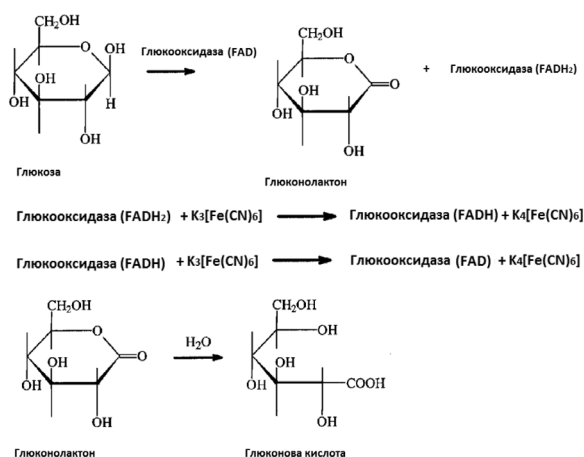


Рис. 1. Схема дії глюкооксидази в присутності акцептора електронів гексаціаноферату (III) калію

Вміст глюкози у фільтраті після ультрафільтрації крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою визначали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 940 нм.

Результати та їх обговорення

Як відомо [10], будь-яке модифікування, особливо прищеплення полімерних ланцюгів до мембранної поверхні, призводить до зміни об'ємного потоку води крізь мембрану. І саме за зменшенням цієї величини відносно немодифікованих мембран можна опосередковано судити про ефективність їх модифікування.

Об'ємний потік води через мембрану, модифіковану ПАК, у порівнянні з об'ємним потоком через немодифіковану мембрану зменшується у 4,5 раза (рис. 2). При подальшій іммобілізації глюкооксидази об'ємний потік води через мембрану зменшується у 6,3 раза в порівнянні з немодифікованою мембраною. Це свідчить про те, що на мембранній поверхні утворився прищеплений

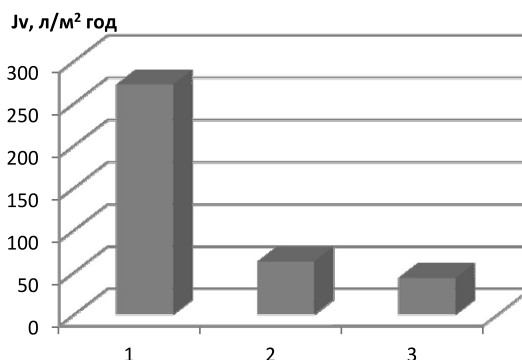
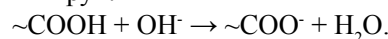


Рис. 2. Залежність об'ємного потоку води крізь целюлозну мембрану залежно від типу модифікуючої речовини: 1 – немодифікована мембрана; 2 – модифікована ПАК; 3 – модифікована ПАК з іммобілізованою глюкооксидазою. рН розчину – 7. Робочий тиск – 100 кПа

шар полікислоти, а потім і ферменту, який зменшує ефективний радіус пор мембрани.

Мембрани, модифіковані полікислотами, є чутливими до зміни значень рН робочого розчину [11; 12]. Цей ефект пояснюється тим, що в лужному середовищі відбувається йонізація карбоксильних груп:



Цей ефект призводить до розгортання прищеплених макроланцюгів ПАК унаслідок відштовхування однойменно заряджених сегментів макромолекул, у результаті чого й відбувається зменшення розміру пор мембрани. У кислому середовищі прищеплені ланцюги полікислот, навпаки, мають компактну конформацію, що відображається в зростанні водопроникності мембран (рис. 3).

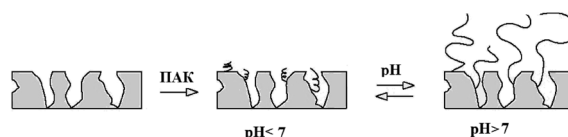


Рис. 3. Залежність конформації макромолекул полікислот, іммобілізованих на мембрані, від значення рН середовища

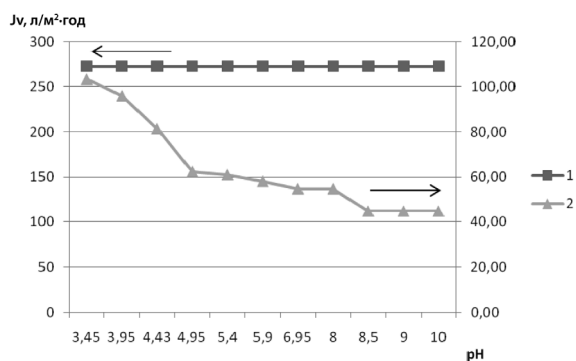


Рис. 4. Залежність об'ємного потоку води (J_v) крізь немодифіковану мембрану (1) та мембрану, модифіковану ПАК (2), від рН розчину. Робочий тиск – 100 кПа

Так, зростання значень рН робочого розчину з 3,4 до 10 призводить до зменшення продуктивності мембран, модифікованих ПАК, на 59 л/м²·год (рис. 4), причому в кислому середовищі продуктивність модифікованої мембрани приблизно відповідає немодифікованій. Разом з тим продуктивність немодифікованої мембрани від величини значень рН робочого розчину не залежить.

Отримані целюлозні мембрани здатні змінювати водопроникність залежно від величини значень рН як у порядку збільшення, так і в порядку зменшення кислотності робочого розчину (рис. 5), що підтверджує високий рівень відтворюваності експерименту.

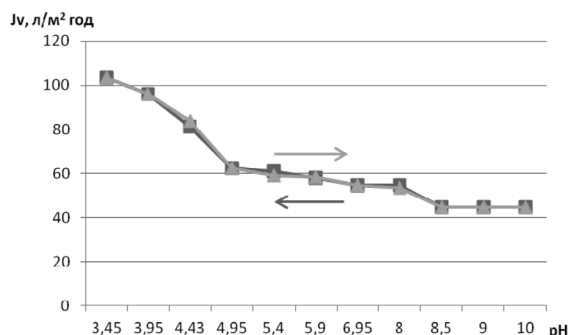


Рис. 5. Залежність об'ємного потоку води (J_v) крізь мембрану, модифіковану ПАК, від значення рН середовища. Робочий тиск – 100 кПа

Згідно з отриманими даними, представленими на рис. 6, крива 2, об'ємний потік розчину глюкози крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою зростає з часом, що пояснюється дією ферменту, яка полягає в окисненні глюкози спочатку в глюконолактон, який у подальшому гідролізує до глюконової кислоти, що й призводить до зменшення рН середовища і, відповідно, набуття прищепленими ланцюгами поліакрилової кислоти компактної конформації, що відображається

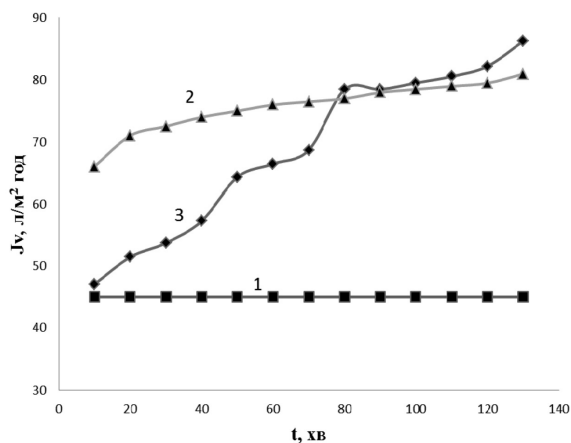


Рис. 6. Залежність об'ємного потоку (J_v) води (1), розчину глюкози (2) та розчину глюкози з $K_3[Fe(CN)_6]$ (3) крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою від часу при робочому тиску 100 кПа

в зростанні водопроникності мембран. Так, при ультрафільтрації розчину глюкози крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою протягом 130 хв об'ємний потік зріс з 66 до 80 л/м²·год. Тоді як об'ємний потік води крізь ці мембрани є постійний у часі дослідження (рис. 6, крива 1).

Для прискорення конверсії глюкози через біокаталітичні мембрани в робочий розчин вводили гексаціаноферат (III) калію, який є акцептором електронів.

Як видно з рис. 6, крива 3, об'ємний потік розчину глюкози при додаванні до нього гексаціаноферату (III) калію зростає з часом: протягом 130 хв з 47 до 86 л/м²·год, що майже втричі перевищує продуктивність ультрафільтрації розчину глюкози без акцептора електронів гексаціаноферату (III) калію.

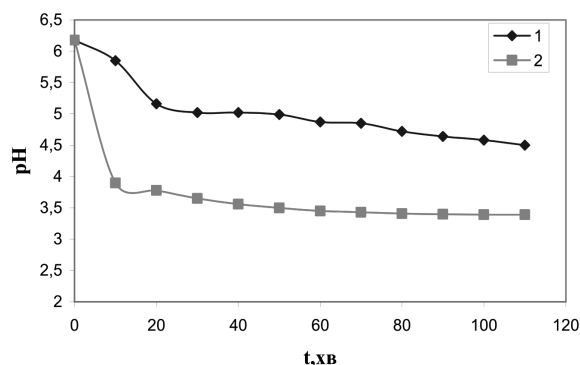


Рис. 7. Залежність величини рН робочого розчину глюкози (1) та розчину глюкози з $K_3[Fe(CN)_6]$ (2) при проходженні крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою. Робочий тиск – 100 кПа

Як видно з рис. 7, крива 1, при ультрафільтрації протягом 110 хв 0,02М водного розчину глюкози з початковим значенням рН 6,18 величина рН фільтрату становить 4,5, що знову ж таки свідчить про біокаталітичну дію глюкооксидази, іммобілізованої на поверхні целюлозної мембрани. При додаванні до розчину глюкози $K_3[Fe(CN)_6]$ спостерігаємо сильніше зниження рН, ніж при дії ферменту без акцептора – з 6,18

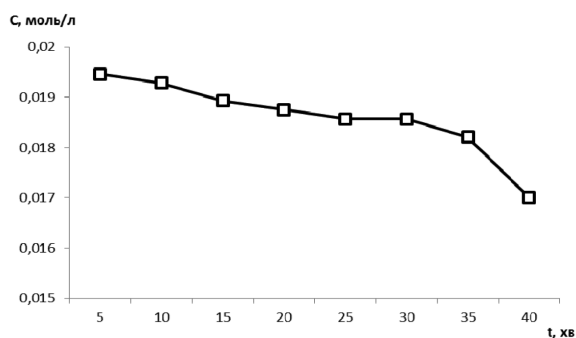


Рис. 8. Зміна концентрації глюкози в пермеаті в процесі ультрафільтрації крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою. Робочий тиск – 100 кПа

(рН вихідного розчину глюкози) до 3,39 у фільтраті (рис. 7, крива 2).

Проведені спектрофотометричні дослідження фільтратів після ультрафільтрації розчину глюкози крізь целюлозні мембрани з іммобілізованою глюкооксидазою показали (рис. 8), що після ультрафільтрації протягом 40 хв концентрація розчину глюкози знизилась з 0,02 до 0,017 моль/л, тобто можна вважати, що 0,003 моль/л глюкози перетворились на глюконову кислоту. Отже, конверсія глюкози при проходженні крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою становить 15 %.

Висновки

Отримано рН-чутливі целюлозні мембрани шляхом хімічної іммобілізації на їхній поверхні поліакрилової кислоти. Об'ємний потік води крізь мембрану, модифіковану поліакриловою кислотою, в порівнянні з об'ємним потоком через немодифіковану мембрану зменшується у 4,5 раза.

Встановлено, що об'ємний потік крізь целюлозні мембрани з прищепленими ланцюгами полікислоти залежить від величини рН робочого розчину. Так, зростання значень рН робочого розчину з 3,45 до 10 призводить до зменшення продуктивності мембран, модифікованих ПАК, у 2,3 раза.

Отримано біокаталітичні мембрани шляхом іммобілізації глюкооксидази на мембрани з прищепленою ПАК. Показано, що об'ємний потік розчину глюкози крізь мембрану з іммобілізованою глюкооксидазою зростає з часом, що пояснюється дією ферменту, яка полягає в перетворенні глюкози на глюконову кислоту. При цьому рН у фільтраті зменшується з 6,18 до 4,5. Конверсія глюкози при цьому становить 15 %.

Досліджено, що об'ємний потік з часом при додаванні до розчину глюкози акцептора електронів гексаціаноферату (III) калію зростає інтенсивніше, а саме в 4,2 раза в порівнянні з дією чистого ферменту. Спостерігається більше зниження рН у фільтраті: з 6,18 до 3,39.

Список літератури

1. "Smart" Materials for Biosensing Devices: Cell-Mimicking Supramolecular Assemblies and Colorimetric Detection of Pathogenic Agents / Jie Song, Quan Cheng, Shimin Zhu, Raymond C. Stevens // *Biomedical Microdevices*. – 2002. – Vol. 4, № 3. – P. 213–221.
2. Sanchez C. Biomimetic and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems / Clément Sanchez, Hervé Arribart, Marie Madeleine Giraud Guille // *Nature Material*. – 2005. – Vol. 4. – P. 277–288.
3. Формування біокаталітичних мембран для ультрафільтраційної очистки води від барвників / В. В. Коновалова, М. Т. Брик, Р. Р. Нігматуллин [та ін.] // *Доповіді НАН України*. – 2000. – № 11. – С. 209–214.
4. Іммобілізація α -амілази на целюлозних афінних мембранах модифікованих хітозаном та Cibacron Blue F3G-A / В. В. Коновалова, К. Є. Гузикович, Г. А. Побігай [та ін.] // *Біотехнологія*. – 2009. – № 1. – С. 117–123.
5. Chen J.-W. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification / Jech-Wei Chen, Wen-Teng Wu // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2003. – Vol. 95, Is. 5. – P. 466–469.
6. Enzyme Technology [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/index.html>. – Title from the screen.
7. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – М.: Академия, 2003. – 208 с.
8. Datta S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials / Sumitra Datta, L. Rene Christena, Yamuna Rani Sriramulu Rajaram // *3 Biotech*. – 2013. – Vol. 3. – P. 1–9.
9. Rother C. Enzyme Immobilization by Microencapsulation: Methods, Materials, and Technological Applications / Christina Rother, Bernd Nidetzky // *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. – John Wiley and Sons, Inc., 2014. – P. 1–21.
10. Одержання целюлозних мембран з функцією термочутливості шляхом модифікування поліізопропілакриламідом / О. О. Чикета, Г. А. Побігай, В. В. Коновалова, А. Ф. Бурбан // *Наукові записки НАУКМА*. – 2009. – Т. 92: Хімічні науки і технології. – С. 3–7.
11. Park S. Y. Novel pH-sensitive polymers containing sulfonamide groups / S. Y. Park, Y. H. Bae // *Macromolecular Rapid Communications*. – 1999. – Vol. 20. – P. 269–273.
12. Дослідження розділювальних характеристик рН-чутливих целюлозних мембран, модифікованих хітозаном / Г. А. Побігай, В. В. Коновалова, В. В. Томіна [та ін.] // *Наукові записки НАУКМА*. – 2009. – Т. 92: Хімічні науки і технології. – С. 8–11.

G. Pobigai, T. Meshkova, V. Konvalova, M. Savchenko, A. Burban

OBTAINING OF CELLULOSE MEMBRANES WITH IMMOBILIZED GLUCOSE OXIDASE

Environment responsive (ER) membranes are potentially attractive separation media due to their ability to dynamically change their pore size and charge properties in response to applied stimuli. In this contribution, a method for the preparation of environmentally responsive membrane with biocatalytic properties is reported. The biocatalytic polymeric membranes were obtained by glucose oxidase immobilization on cellulose membranes with grafted polyacrylic acid (PAA). PAA was covalently immobilized on the industrial ultrafiltration cellulose membranes to give them the function of pH-sensitivity. Previously

cellulose membranes had been activated by sodium periodate to form aldehyde groups on their surface. Then adipic acid dihydrazide was used as a linker between cellulose dialdehyde membranes and PAA. Thus, the flux of the membranes with immobilized PAA decreased by 2.3 times in working solution with pH from 3.45 to 10. The glucose oxidase grafted to PAA by form of amid bond between amino-groups of enzyme and carboxyl groups of PAA. The transport properties of biocatalytic membranes were studied in the processes of ultrafiltration of glucose solution. The enzyme glucose oxidase catalyzes the conversion of glucose to gluconic acid and causes reduction of the solution pH. The productivity of membranes with immobilized glucose oxidase increases with time, confirming that enzyme converts glucose to gluconic acid and pH of the permeate decreases from 6.18 to 4.5.

Keywords: cellulose membrane, biocatalytic membrane, pH-sensitive membrane, polyacrylic acid, glucose oxidase.

Матеріал надійшов 11.01.2016

УДК 544.47:544.344,546.655,546.215,546.26

N. Bortnyk, A. Brichka, O. Bakalinska, S. Brichka, M. Kartel

CATALASE-LIKE ACTIVITY OF CARBON NANOTUBES SUPPORTED NANOCERIA

A series of CNT – CeO₂ nanocomposites with different nanoceria content was synthesized by reaction of cerium nitrate deposition in the aqueous media without stabilizers at room temperature. The amount of deposited cerium oxide in nanocomposite varies from 0.66 to 15.29 %. The catalase-mimetic activity of nanoceria, pristine CNT and its nanocomposites was studied in the reaction of hydrogen peroxide decomposition in the pH range of 8–11. Most of synthesized nanocomposites turned out to be effective catalysts and have a better catalytic activity than non-deposited nanoceria at all pH-values. It was established that enzyme-mimetic activity of nanoceria containing materials extremely depended on pH with the pH-optimum of 9.5–10.5. It was shown that nanocomposites with the lowest nanoceria content are more active in the reaction of hydrogen peroxide decomposition. It can be explained by the agglomeration of the nanoparticles with the increase of ceria amount in nanocomposite that causes the surface area reduction and decrease in the surface Ce³⁺/Ce⁴⁺ defects content.

Keywords: catalytic decomposition, hydrogen peroxide, nanoceria, carbon nanotubes, enzyme mimetics.

Introduction

Enzymes have numerous applications in pharmaceutical [1], food, textile, and other industries [2]. However, a number of disadvantages, such as instability under environment changes

(since all enzymes are proteins, they can be easily denatured when temperature or pH varies), time-consuming and expensive preparation, and inconvenience of homogeneous catalysis induced the exploration of the alternative materials [3]. As a result, a variety of materials (cyclodextrins, metal