

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Кієво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра хімії

Магістерська робота

Освітній ступінь - магістр

на тему: « **ТРАНСПОРТНІ І БІОКАТАЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ПОЛІЕТАРСУЛЬФОНОВИХ МЕМБРАН, МОДИФІКОВАНИХ
ПРОТЕАЗОЮ** »

Виконала: студентка 2-го року навчання,
спеціальність 102-Хімія

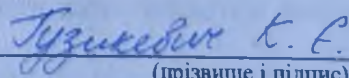
Корнюша Катерина Вікторівна



Науковий керівник: Колесник І.С.
кандидат хімічних наук, старший викладач



Рецензент Гузикевич К.Є.
(прізвище і підпис)



Магістерська робота захищена
з оцінкою « відмінно (93) »

Секретар ЕК Мурланова Т.В.
«16» серпня 2021 р.



Київ – 2021

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра хімії

Магістерська робота

Освітній ступінь - магістр

на тему: « **ТРАНСПОРТНІ І БІОКАТАЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ПОЛІЕТЕРСУЛЬФОНОВИХ МЕМБРАН, МОДИФІКОВАНИХ
ПРОТЕАЗОЮ** »

Виконала: студентка 2-го року навчання,
спеціальність 102-Хімія

Корнюша Катерина Вікторівна

Науковий керівник: Колесник І.С.
кандидат хімічних наук, старший викладач

Рецензент _____
(прізвище і підпис)

Магістерська робота захищена
з оцінкою « _____ »

Секретар ЕК Мурланова Т.В.
« ____ » _____ 2021 р.

Київ – 2021

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	6
1.1. Методи іммобілізації ферментів на мембрани.....	6
1.1.1. Іммобілізація ферментів на/в мембрани фізичними методами.....	7
1.1.2. Іммобілізація ферментів на/в мембрани за допомогою ковалентного зв'язування.....	10
1.2. Використання мембран з іммобілізованими ферментами.....	12
1.2.1. Деструкція і синтез біомакромолекул.....	17
1.2.2. Деструкція низькомолекулярних органічних забруднювачів.....	18
1.2.3. Отримання низькомолекулярних сполук.....	21
1.3. Модифікація поліетерсульфонових мембран.....	22
1.3.1. Властивості поліетерсульфону.....	23
1.3.2. Модифікація поверхні.....	26
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	29
2.1. Реактиви і матеріали.....	29
2.2. Методика модифікування натрій альгілату <i>трет</i> -бутиламіном	31
2.3. Дослідження характеристик натрій альгілату, модифікованого <i>трет</i> -бутиламіном	31
2.4. Модифікування полісульфонових мембран міцелами на основі натрій альгілату, модифікованого <i>трет</i> -бутиламіном та октан-1-аміном	32
2.5. Дослідження поверхневих і транспортних властивостей модифікованих мембран.....	32
2.6. Методика визначення концентрації розчинів БСА методом УФ-спектроскопії.....	33
2.7. Методика визначення стабільності мембран у процесі ультрафільтрації БСА.....	33
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	34

3.1. Модифікування натрій альгінату <i>трет</i> -бутиламіном та октан-1-аміном.....	34
3.2. Модифікування полісульфонових мембран міцелами на основі натрій альгінату, модифікованого <i>трет</i> -бутиламіном та октан-1-аміном	35
3.3. Дослідження транспортних і біокаталітичних властивостей модифікованих мембран	38
3.4. Вивчення стабільності мембран, модифікованих протеазою, у процесі ультрафільтрації БСА.....	50
ВИСНОВКИ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

ВСТУП

У сучасній інноваційній економіці, хімічній, харчовій, фармацевтичній та інших галузях промисловості потрібні речовини, до чистоти яких висуваються особливо високі вимоги. Одним із способів отримання таких речовин є мембранні методи розділення, які широко застосовуються в різних промислових галузях і замінюють або доповнюють традиційні методи поділу (екстракцію, дистиляцію, адсорбцію тощо). Це обумовлено тим, що в мембранних процесах, зазвичай, тільки один з компонентів суміші проходить через мембрану, а решта залишаються у вихідній суміші.

У мембранних процесах часто застосовуються полісульфонові мембрани, оскільки вони мають невелику вартість, термічну і хімічну стабільність, задовільні механічні властивості. Проте через гідрофобність поверхні полісульфонові мембрани є нестійкими до забруднення, і це є головним недоліком при їх використанні.

До транспортних властивостей відносяться: для пористих мембран затримання і питома продуктивність, для непористих (дифузійних, композиційних) мембран - фактор поділу і питома продуктивність. Швидкий розвиток мембранних процесів вимагає розробки методів спрямованого синтезу мембран, що володіють заданими властивостями. У даний час існує велике різноманіття мембран, створених на основі полімерних або неорганічних матеріалів. Обидва класи мають свої переваги і недоліки. Одним з перспективних способів усунення недоліків і використання переваг двох класів матеріалів є створення мембран з змішаної матрицею, які б містили диспергований наповнювач в полімерній матриці.

Робота присвячена дослідженню транспортних і біокаталітичних властивостей поліетерсульфонових мембран, модифікованих протеазою. Актуальність теми обумовлена високою затребуваністю поєднання мембранних процесів з біокаталізом.

Отже, метою роботи були модифікувати поліетерсульфонові мембрани протеазою, інкорпорованою у полімерні міцели на основі альгінату, та дослідити їхні властивості.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

- модифікувати натрій альгінат *трет*-бутиламіном та октан-1-аміном і дослідити властивості одержаних похідних;
- модифікувати поліетерсульфонові мембрани протеазою, інкорпорованою у полімерні міцели на основі модифікованого альгінату;
- дослідити стабільність, транспортні і антизабруднювальні властивості модифікованих мембран.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Методи іммобілізації ферментів на мембрани

Ферментативні реакції розглядаються як зелений та ефективний метод з м'якими умовами реакції, зменшеними побічними реакціями та кращою екологічною безпекою та чистотою [1]. Однак промислове застосування було обмеженим через їх нестабільні властивості та труднощі з переробкою ферментів [2]. На щастя, зараз доступно багато методів для поліпшення активності та стабільності ферментів. Ці методи включають різні галузі біології, такі як мікробіологія, інженерія та хімія білків тощо, які зазнали вражаючих розробок за останні роки. Крім того, для підвищення стабільності та повторного використання ферментів часто застосовували традиційну та потужну техніку, іммобілізацію ферментів. Це основна умова для іммобілізації фермент-носієм для зміни каталітичних властивостей за допомогою адсорбції, вбудовування, ковалентного зв'язування та зшивання. Іммобілізація ферментів може ефективно покращити їх стабільність, зменшити інгібування субстрату / продукту, змінити селективність ферментів та збільшити реакційні цикли. Крім того, як тверда, а не рідка композиція, іммобілізовані ферменти були більш сприятливими для відновлення ферментів та поділу продуктів [3]. У багатьох випадках іммобілізація ферментів може насправді спричинити зниження ферментативної активності. Таким чином, баланс між активністю та стабільністю часто є проблемою, і його слід враховувати під час іммобілізації.

Іммобілізовані ферменти полегшують періодичні та безперервні реакції у промислових цілях. EMR (Enzyme Membrane Reactors) дозволяють продуктам постійно відокремлюватись від реакційної системи за допомогою селективної мембрани, сприяючи зміщенню рівноваги реакції у бік продукту, тим самим збільшуючи продуктивність усього процесу [4].

EMR придатні для виробництва та розділення, оскільки вони можуть пропонувати відносно стабільні реакційні середовища, високий каталітичний

вихід та низькі експлуатаційні витрати. Як пористий матеріал мембрана може слугувати як селективним бар'єром, так і носієм іммобілізації [5]. Насправді, переважна більшість ЕМВ - це реактори з ферментами, іммобілізованими на мембранах (REIM). Іммобілізація фермент-мембрани має ще кілька переваг, таких як велика поверхня для реакції, поліпшена багаторазовість ферментів та безперервне утворення продукту.

Активність ферментів, стабільність та мембранний потік є найважливішими параметрами для оцінки системи REIM (Reactors with Enzymes Immobilized on Membranes). Мембрани для іммобілізації, як правило, були кваліфіковані з високою здатністю до завантаження ферментів, високою стабільністю та низькою стійкістю до масообміну, тоді як також часто спричиняють втрату ферментної активності та зменшення мембранного потоку. Хоча, є кілька прикладів промислового застосування, ферментативна активність, яка сильно знижується, обмежила застосування REIM. У наш час з розвитком мембранних технологій та технологій іммобілізації цей недолік поступово подолано. У багатьох останніх випадках іммобілізовані ферменти значно покращувались внаслідок ферментативного розпаду. Систематично були введені чотири способи іммобілізації (забруднення-адсорбція, захоплення, ковалентне прищеплення і зшивання) [6]. Існує три типи застосувань REIM, включаючи деформацію та синтез біомакромолекул, деформацію низькомолекулярних органічних забруднювачів та синтез низькомолекулярних препаратів, виходячи з параметрів експерименту.

Суть іммобілізації ферментів полягає у прикріпленні їх в активній формі до нерозчинної основи або включенні в напівпроникну мембранну систему. Існує два методи іммобілізації ферментів: фізичний та хімічний.

1.1.1. Іммобілізація ферментів на/в мембрани фізичними методами

Існують два основні методи іммобілізації ферментів у / на мембрани шляхом адсорбції. Перший метод полягає у безпосередньому зануренні

мембрани у розчин ферменту, тоді як інший метод полягає в адсорбції ферменту на поверхні мембрани або порах за допомогою простого циклу ультрафільтрації [7]. Метод адсорбції, як правило, є оборотним, і фермент може бути десорбований промиванням для регенерації мембрани. Адсорбція в основному ґрунтується на вандерваальсових взаємодіях, електростатичних взаємодіях та водневих зв'язках між ферментом та носієм. Фізична взаємодія між мембранами та ферментами вимагає певних умов, навантажувальна здатність мембрани також є відносно низькою, коли для іммобілізації застосовуються фізичні сили. Як звичайний метод іммобілізації, метод вбудовування також зазвичай застосовується для іммобілізації ферментів у / на мембрані. Молекули ферментів можуть бути безпосередньо заблоковані в порах мембрани або вбудовані в додатковий гелевий шар. Вбудовування дозволяє отримати більшу місткість, тоді як часто це призводить до зменшення продуктивності мембрани. Адсорбція та вбудовування не передбачають ковалентного зв'язування ферментів з мембраною, і конформація ферменту зазвичай добре зберігається. Таким чином, відновна активність ферментів є відносно високою при використанні цих двох методів. Каталітична активність та стабільність ферменту переважно зберігається та покращується. Виходячи з пористої природи мембрани, ці два методи зазвичай використовуються разом.

Полімерні композитні мембрани, що мають пористу структуру, складаються з активного шару та опорного шару. Активний і опорний шари мають різні фізичні властивості. Активний шар зазвичай має невеликий розмір пор. Фермент важко проникати в пори цього шару. Опорний шар має більші мембранні пори, звідки фермент може потрапляти в мембрану і в кінцевому результаті блокувати пори [8,9]. Виходячи з цього, використовуються два різні режими: звичайний режим та зворотний режим, які розроблені для іммобілізації ферментів у / на мембрани. Серед двох режимів реверсний режим ширше застосовуваний завдяки великій здатності до завантаження ферментів та високій стабільності. У зворотному режимі основним механізмом іммобілізації ферментів усе ще є адсорбція та вбудовування.

Для отримання біокаталітичної мембрани з великим навантаженням ферментів та великим мембранним потоком підшар мембрани зазвичай модифікують. Використовуючи композитну полімерну мембрану як носій, Мортенсен та ін. іммобілізували глюкозооксидазу та каталазу на опорному шарі шляхом зворотної ультрафільтрації, а потім у звичайному режимі покрили підшар шаром полідопаміну [10]. Глюкозооксидаза та каталаза потрапляли в полідопамінову сітку підшару. Таким чином, витік ферментів зменшувався під час безперервної роботи. Під час такої маніпуляції стабільність ферменту значно покращилася завдяки модифікованій полідопаміном мембрані, і навантаження ферменту досягло $0,15 \pm 0,01$ мг/см². Для подальшого поліпшення властивостей мембрани проти обростання, навантажувальної здатності ферментів та ефективності біотрансформації була створена нова модель іммобілізації, яка отримала назву «модель сендвіча» [11,12]. У сендвіч-моделі до мембрани було додано додатковий опорний шар для формування форми сендвіча. У роботі Луо опорний шар спочатку іммобілізували алкогольдегідрогеназою шляхом зворотної ультрафільтрації, а потім покривали додатковим опорним шаром на активному шарі або опорному шарі. Така сендвіч-модель має набагато вищу ефективність біотрансформації, більш гідрофільна та більш біосумісна, ніж біокаталітична мембрана, отримана безпосередньо шляхом зворотної ультрафільтрації [10]. У звичайному режимі іммобілізація ферментів тонким шаром приводить до зниження швидкості завантаження ферментів. Для поліпшення ферментного навантаження Марпані та інші покрили активний шар шаром гелю. У даній моделі тонкий мембранний шар спочатку був модифікований полідопаміном, а згодом покритий шаром альгінату натрію, у який ввели алкогольдегідрогеназу. Після цього шар гелю кальцинували з високою концентрацією кальцій хлориду. Нарешті, мембрану тричі промивали буфером. Як результат, швидкість завантаження ферментів досягла 71,4 % при швидкості ферментативної конверсії 60 %. Результати показали, що ця стратегія може ефективно збільшити навантаження ферментів, зберігаючи високий мембранний потік. У кожному з вище зазначених

нековалентних режимів іммобілізації були переваги та недоліки. Для іммобілізації ферменту на тонких шарах модель мала високий мембранний потік, але зменшила навантаження ферментів та ефективність біокаталізу. У сендвіч-режимі та в зворотному режимі навантаження ферментів зростало, тоді як мембранний потік значно зменшувався. Більше того, у цих випадках мембрану було важко повторно використати. Таким чином, це вимагало подальших досліджень для отримання біоконверсійної плівки, яка має як високу ефективність каталізу, так і високий потік. В останні роки деякі мембрани зі спеціальними структурами використовують як носії для фізичної іммобілізації через їх активність відновлення ферментів, здатність до високого навантаження ферментів або продуктивності [13].

1.1.2. Іммобілізація ферментів на/в мембрани за допомогою ковалентного зв'язування

Принцип ковалентного методу полягає в ковалентному зв'язуванні ферментів з носіями на їх функціональних групах. Хімічні зв'язки можуть розташовуватися як на поверхні, так і в порах мембрани. Для більшості мембран є мало природних функціональних груп, які можна безпосередньо використовувати для ковалентного зв'язування. Попередня обробка мембран функціональними реагентами зазвичай застосовується для ковалентної іммобілізації, включаючи мокрий хімічний метод, УФ-індукований метод, метод γ -опромінення та плазмовий метод [14]. Таким чином, поверхню або пори мембрани покривають активними групами, такими як аміно-, гідроксил-, карбоксил-, азидо-, амідо- тощо, які потім ковалентно зв'язуються з хімічними групами, включаючи карбоксил-, аміно-, сульфгідрил- або тирозинові групи ферментів [15].

Ефективна іммобілізація ферментів на опорних поверхнях вимагає точного збігу між хімією поверхні та специфічним ферментом. Модифікатор повинен, з одного боку, мати можливість стабільно зв'язувати фермент з

мембраною, а з іншого боку уникати зв'язування з активним центром ферменту для забезпечення високої активності відновлення. Підсумовуючи, різноманітні функціональні групи, які використовувались для ковалентного зв'язування ферментів та мембран, були перераховані у табл. 1.1. Найчастіше використовувані методи модифікації полягають у модифікації мембрани аміно-, карбоксильними або альдегідними групами. Модифікація мембрани може бути здійснена або під час виготовлення плівки, або в процесі іммобілізації.

Таблиця 1.1. Короткий перелік різних функціональних груп, які використовувались для ковалентного зв'язування ферментів та мембран [15-19].

Функціональний реагент	Тип мембрани	Функціональна група	Фермент	Навантажувальна здатність	Активність відновлення
Допамінові нанотрубки	Галлоїзит	Нанотрубки галоїзиту	Гідроксил	168.8 мг/г	> 92%
Поліакрилат натрію	Пористі нейлонові мембрани	Карбоксил	Трипсин	35 ± 2 мг/мл	
APTESa /GLUa	Гідрофільний фторид полівінілідену мембрани	Аміно, альдегід	Лак		
Sibacron Blue / целюлоза	Целюлозна споріднена мембрана ультрафільтрації	Альдегід	α-амілаза		
Поліакрилова кислота	Поліпропіленові волокна, модифіковані радіаційним трансплантатом	Карбоксил	Глюкоамілаза	5 мг/г	
GMA	Целюлозний фільтрувальний папір	Епоксидний	уреаза	269.2µg /cm ²	≈ 60%

GLU	Поліетерсульфонова мембрана	Альдегід	β -галактозидаза	0.77 мг/см ²	44.2%
GLU/1,6-HMDA	Поліпропіленова мембрана	Альдегід	β -галактозидаза	0.023 мг/см ²	48.9%
1, 12-додеканедіамін	Нановолокно целюлоза Кенаф	Аміно, альдегід	CGTase	7.24 мг/г	59.05%
4-arm-PEG-NH ₂ /Fe ₃ O ₄ /Glu	Чотириплечий поліетиленгліколь дендример	Аміно, альдегід	Целюлоза	132 мг / г	34 U/mg
MA	Поліетерсульфонова мембрана	Карбоксил	Трансглютаміназа		
FNAB	Поліпропіленова мембрана	Азидо група	Глюкозооксидаза	6μg / см ²	
HEMA /GMA	Поліпропіленова мембрана	Епоксидні	Ліпаза	2.97мг / см ²	90.26%
GMA	Поліпропіленова порожниста мембрана	Епоксидні	Ліпаза	102 мг/г	

1.2. Використання мембран з іммобілізованими ферментами

З розвитком мембранних технологій та технологій іммобілізації дослідники приділяли все більше уваги REIM (Reactors with Enzymes Immobilized on Membranes). Існує три основних типів застосувань REIM: розкладання та синтез біомакромолекул (табл. 1.2), розкладання органічних забруднювачів (табл. 1.3) та отримання низькомолекулярних органічних сполук (табл. 1.4).

Таблиця 1.2. Застосування REIM для деструкції та синтезу біомакромолекул [20-24].

Фермент	Тип мембрани	Метод іммобілізації	Субстрат	Коефіцієнт конверсії	Тривалість реакції	Відновлення активності після реакції
---------	--------------	---------------------	----------	----------------------	--------------------	--------------------------------------

Ліпаза з <i>Candida cylindracea</i>	Поліпропіленова плівка	Адсорбція	Оливкова олія	/	15 днів	50 %
ABL ліпаза з <i>Arthobacter sp</i>	Порожнисто-волоконні ГП мембрани	Ковалентний зв'язок	Трибутирин		10 циклів	80 %
Ліпаза з <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Поліетерсульфонева мембрана	Адсорбція	Тріолеї і метанол	80 %	12 днів	/
Ліпаза з <i>Candida rugosa</i>	Полісульфонові асиметричні мембрани	Адсорбція	Оливкова олія, пальмова олія та рицинова олія	> 21 % працює	5 циклів	80 %
Ліпаза з <i>Rhizomucor miehei</i>	Альгінатна мембрана	Затискання	Етиловий спирт та молочна кислота	63 %	6 циклів	90 %
Ліпаза з <i>Candida rugosa</i>	Порожнисті мембрани з глинозему	Ковалентний зв'язок	Оливкова олія	/	6 циклів	93 %
α -Амілаза з <i>Bacillus licheniformis</i>	Целюлозна ультрафільтраційна мембрана	Ковалентний зв'язок	Крохмаль	84 %	/	/
Целюлаза з <i>Trichoderma reesei</i>	Фторований етиленпропілен	Зшивання	Целюлоза	53,9 %	72 год	97,5 %
Трипсин з бичачої підшлункової залози	Гідроксильована нейлонова мембрана	Ковалентний зв'язок	Білок	/	/	/

Таблиця 1.3. Застосування REIM для отримання низькомолекулярних сполук [25-26].

Фермент	Тип мембрани	Метод іммобілізації	Субстрат	Коефіцієнт	Тривалість	Відновлення
---------	--------------	---------------------	----------	------------	------------	-------------

		ї		конве рсії	ь реакції	активн ості після реакції
Ліпаза з <i>Candida rugosa</i>	Пориста скляна мембрана Shirasu	Адсорбція	(R,S)- напроксен- метиліві етери	/	200 годин	/
Тирозиназа з <i>Agaricus bisporus</i>	Поліамідна трубчаста мембрана	Адсорбція	L-тирозин	/	>30 годин	>90
β- галактозидаза з <i>Bacillus circulans</i>	Полівініліденфлуор идна мембрана	Ковалентни й зв'язок	Лактоза	90 %	20 годин	/
β- галактозидаза з <i>Kluyveromyce s fragilis</i>	Поліетерсульфонов а мембрана	Ковалентни й зв'язок	Лактоза	/	/	/
Глюкозоокси даза з <i>Aspergillus niger</i>	Аніонно- полістирольні кульки	Адсорбція	Глюкоза	90 %	20 годин	/
Ліпаза з <i>Candida rugosa</i>	Поліакрилонітрило ва порожнинноволокно нна мембрана	Адсорбція	(R,S)-етер ібупрофена	96–98 %	10 годин	

β -галактозидаза з <i>Bacillus circulans</i>	Полівініліденфлуоридна мембрана	Зшивання	Лактоза	56 %		
β -галактозидаза з <i>Bacillus circulans</i>	Поліетерсульфон	Зшивання	Лактоза	45,2 %	6 циклів	>90 %
β -галактозидаза з <i>Escherichia coli</i>	Поліпропіленова мембрана	Зшивання	Лактоза	91 %	20 циклів	> 60%

Таблиця 1.4. Застосування REIM для отримання низькомолекулярних сполук [27-31]

Фермент	Тип мембрани	Метод іммобілізації	Субстрат	Коефіцієнт конверсії	Тривалість реакції	Відновлення активності після реакції
Laccase з <i>Trametes versicolor</i>	Напівароматична поліамідна мембрана	Затискання	Мікрозабруднювальні речовини	До 92%	9 циклів	/
Laccase з <i>Trametes versicolor</i>	Моноканальна керамічна мембрана (TiO ₂)	Ковалентний зв'язок	Тетрациклін	56 %	10 днів	
EreB з <i>Enterobacteriales</i>	Багатоканальна керамічна мембрана (α -	Адсорбція	Еритроміцин	> 60 %	100 годин	

	глинозем)					
Пеніциліназа з <i>Bacillus cereus</i>	Брометильовани й полі(2,6-диметил-1,4-феніленоксид)	Ковалентний зв'язок	Пеніцилін	100 %	10 циклів	
Хлоропероксидаза з <i>Caldariomyces fumago</i>	TiO ₂ мезопориста тонка плівка	Ковалентний зв'язок	Азобарвник кроцеїн оранжевий G	98,61 %	7 циклів	100 %
Laccase з <i>Trametes versicolor</i>	Полівініліденфлуринні мембрани	Ковалентний зв'язок	Карбамазепін	60 %	480 год / 5 циклів	<20 %
Laccase з <i>Trametes versicolor</i>	Полівініліденфлуринні мембрани	Ковалентний зв'язок	Бісфенол А, карбамазепін, диклофенак, ібупрофен, клофібринова кислота	90 % (бісфенол А)	192 годин/4 цикла	/

1.2.1. Деструкція і синтез біомакромолекул

Коли молекулярна маса субстрату є більшою, ніж продукт, для проникнення молекули продукту можна використовувати мембрану відповідного розміру пор, зберігаючи субстрат для очищення під час реакції. У даний час промислово гідролізацію білків або пептидів в основному проводять у періодичних процесах [32]. У процесі переривчастої гідролізації активність ферменту серйозно знижується, і ступінь гідролізу важко контролювати. Система EMR (Enzyme Membrane Reactors) може ефективно покращити використання ферментів і точно контролювати ступінь гідролізу. Однак, у

мембранному реакторі з вільним ферментом, хоча ефективність виробництва ферменту покращена порівняно з періодичною реакцією, усе ще існує проблема серйозного погіршення активності ферменту. Фермент легко денатурується під дією сили зсуву, що призводить до інактивації ферменту та забруднення мембран. REIM - хороший метод вирішення цієї проблеми. Донг та ін. іммобілізували трипсин на пористій нанофільтраційній мембрані для обмеженої гідролізації казеїну [33]. Контролюючи час утримання, ступінь гідролізації білка можна точно контролювати для отримання малих молекул активних поліпептидів. Порівняно із періодичним процесом, система REIM значно покращила ефективність виробництва, напівінгібувальну концентрацію продукту, а також ферментну стабільність та багаторазове використання.

1.2.2. Гідроліз та синтез олій та жирів

Будучи зеленим каталізатором, ліпаза може каталізувати багато хімічних реакцій за помірних умов. При каталізованому ліпазою гідролізі олії субстрат має обмежену розчинність у воді, і реакція, як правило, проходить на межі розділу олія-вода [34]. Відповідно до характеристик реакції, класичний двофазний REIM був встановлений Ноґ et al. для безперервного гідролізу оливкової олії [35]. Як показано на рис. 1.1, ліпаза була іммобілізована на поверхні мембрани з порожнистих волокон шляхом адсорбції. Оливкова олія гідролізувалась з утворенням жирних кислот і гліцерину на двофазній поверхні. У цьому двофазному реакторі жирна кислота постійно дифундувала у водну фазу, зменшуючи тим самим інгібування ферменту. Крім того, встановлена двофазна система також уникала емульгування в реакції. Нещодавно подібний двофазний REIM був розроблений Шветою Гуптою для гідролізу оливкової олії, пальмової олії та касторової олій [36]. У їх дослідженнях ступінь гідролізу оливкової олії, пальмової олії та касторової олії досяг відповідно 38,5 %, 35,4 % та 21,2 %. Також багаторазово вивчали для ліпази двофазний REIM. Ферментативна активність знизилася лише на 20 % після п'яти циклів реакції

для всіх трьох випробуваних олій. Стабільність, рН та можливість багаторазового використання іммобілізованого ферменту були значно покращені порівняно із системою вільних ферментів. Однак недоліком цієї системи REIM є те, що розподіл ферменту не рівномірний, а стійкість до масообміну є більшою. Використання ліпаз як каталізаторів у переетерифікації для виробництва біодизеля є широко вивчене протягом останнього десятиліття [37]. У попередніх дослідженнях основною перешкодою для застосування була серйозна інактивація ліпази. Для вирішення цієї проблеми використовується іммобілізована ліпаза на асиметричній мембрані (NMWL 300 кДа), що складається з поліетерсульфону, для безперервного процесу переетерифікації [38]. У цій мембрані-мікрореакторі, переетерифікація відбувається, коли субстрат проходить через ультрафільтраційну мембрану, що містить ліпазу, і продукт витягується з отвору посудини. За рахунок оптимізації часу утримання конверсія тріолеїну зросла до 80 %. Протягом 12-денного періоду безперервної роботи спостерігалася хороша ферментна стабільність без порушення активності. У каталізі, що каталізується ліпазою, ліпаза зазвичай представлена в іммобілізованій формі. Типи мембран для іммобілізації включають пористі поліпропіленові порожнисті волокна [39], глиноземні порожнисті мембрани [40], поліетерсульфонові асиметричні мембрани [41], диметилформамід-поліефірні тканинні мембрани [42] тощо. Ці керамічні, полімерні або пластикові матеріали в основному пористі / порожнисті з великою площею поверхні і встановлюються на межі поділу двофазної системи. У всіх цих випадках іммобілізація ферменту ліпази на мембрані підвищувала стійкість ферменту та дозволяла уникати емульгування під час каталітичного процесу.

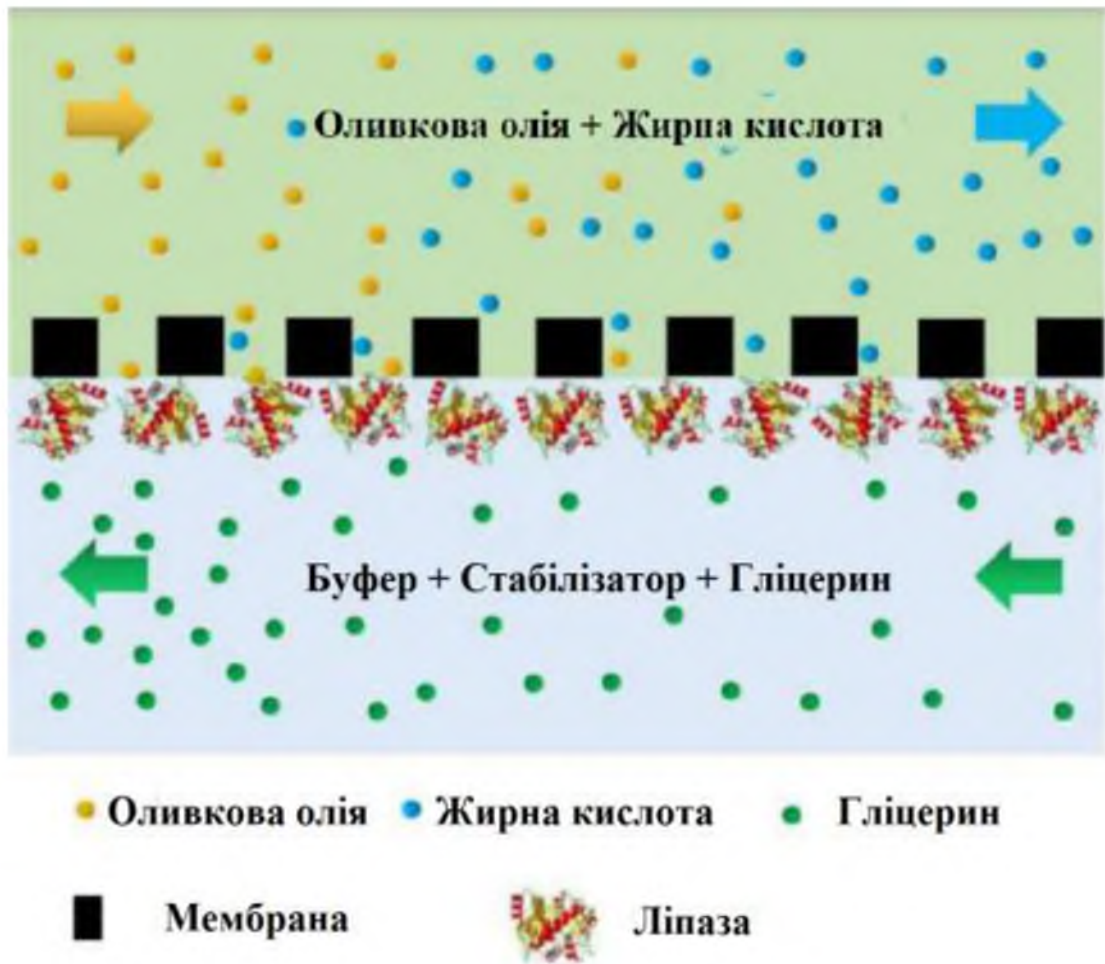


Рис. 1.1. Двофазна модель REIM для безперервного гідролізу оливкової олії [43].

Ліпазу іммобілізували на поверхні мембрани шляхом адсорбції. Оливкова олія гідролізувалась з утворенням жирних кислот та гліцерину на двофазній поверхні. Вироблені жирні кислоти та гліцерин одночасно та безперервно виробляли та виділяли.

Як видно з досліджень, узагальнених у таблиці 1.3, EMRs широко використовувались при деструкції органічних забруднювачів. Лакази - це оксидоредуктази, які можуть ефективно каталізувати деструкцію органічних забруднювачів, таких як тетрациклін, барвники, феноли і сириновий альдегід [44]. Багато лаказ з різних джерел використовувались для гідролізу органічних забруднювачів у формі системи REIM. Застосування ферментів у очищенні стічних вод все ще залишалось проблемою через те, що ферменти можуть легко змиватися стоками. REIM забезпечив новий метод безперервної очистки

стічних вод. Де Казес та ін. іммобілізували лаказу в моноканальних керамічних мембранах для деструкції тетрацикліну [45]. Цим методом були отримані біоактивні мембрани з високою реакційною здатністю та стабільністю. У порівнянні з мембраною без лакази в системі REIM ефективність гідролізу тетрацикліну збільшена на 26 %. Цей REIM може стабільно гідролізувати тетрациклін зі швидкістю 0,34 мг/год протягом 10-денного періоду реакції без помітної втрати ферментативної активності. Більшість застосувань системи laccase-REIM для очищення стічних вод були незначними. Нещодавно Абейон та ін. створили широкомасштабну систему математичних моделей REIM для імітації деструкції тетрацикліну у стоках з комунальних, лікарняних та промислових стічних вод. За рахунок спрощення робочих процесів та оптимізації мембранних модулів концентрація тетрацикліну з різних джерел може бути зменшена до менш ніж 1 мг/л. У їх модельній системі, комунальній станції очищення стічних вод, 70 000 м³ потоку на добу можна очищати з кінцевою концентрацією тетрацикліну 0,282 мг/л. На додаток до гідролізу та синтезу жиру, естераза може також каталізувати гідроліз деяких антибіотиків за допомогою естерних зв'язків [46].

Три різні EMRs були розроблені для деструкції еритроміцину за допомогою естерази EreB [47]. У першій моделі естераза була присутня у вільній формі в системі EMR. У інших двох випадках естераза була іммобілізована на керамічній мембрані або ковалентним трансплантатом, або адсорбцією. Вільний фермент швидко інактивувався, тоді як адсорбована на мембрані естераза демонструвала значне збільшення як стабільності, так і можливості повторного використання. Оптимізована система REIM змогла безперервно розкладати еритроміцин зі швидкістю 15,8 мг/год протягом 100 годин.

Органічні забруднювачі можуть спричинити серйозні екологічні проблеми, якщо потрапляють у повітря або водойму, і, зрештою, негативно впливати на здоров'я людини. Деякі невеликі молекулярні органічні забруднювачі, такі як антибіотики з промислових та комунальних стічних вод,

уже становлять загрозу для екологічної безпеки. Система REIM забезпечує постійний біопроеес для виробництва / деструкції та сепарації. Виходячи з цієї характеристики, REIM має великий потенціал подати заявку на очищення стічних вод. Є три основні переваги для гідролізації забруднювачів за допомогою REIM: (i) висока ефективність гідролізу, (ii) енергозбереження, (iii) безперервна робота. У даний час більшість технологій REIM були протестовані лише в лабораторії і ще не були широко оцінені з використанням реальних стічних вод. Ще потрібно докласти зусиль, щоб подолати складність справжньої стічної води, особливо щодо аспектів протимембранних забруднень[48-49].

1.2.3. Отримання низькомолекулярних сполук

Жіорно та ін. розробила систему фумарази REIM для виробництва L-яблучної кислоти [50]. У цьому дослідженні фумараза потрапляла на губчастий шар асиметричних мембран з полісульфону. Експеримент з біоконверсії проводився безперервно протягом 2 тижнів без будь-яких доказів втрати активності, тоді як коефіцієнт конверсії підтримувався приблизно на рівні $82 \pm 2\%$.

Алжіері та ін. розробили систему REIM для виробництва L-3,4-дигідроксифенілаланіну (L-DOPA) з L-тирозину [51]. Фермент іммобілізували поперечною фільтрацією в асиметричних трубчастих мембранах, виготовлених з поліаміду, з номінальною граничною молекулярною масою 20 кДа. Іммобілізована тирозиназа демонструвала високу стабільність протягом 30 годин.

Лау Йон та ін. розробили REIM для виробництва оптично чистої (S)-ібупрофенної кислоти шляхом ферментативної дерацемізації (R,S)-етеру ібупрофену [52-53]. REIM демонстрував 96-98 % конверсії з 97-99 % надлишком енантіомерного продукту. Однак, зазвичай було важко відокремити продукт від реакційної системи, оскільки субстрат і продукт мають подібну

молекулярну масу. Крім того, застосування REIM у синтезі низькомолекулярних хіральних препаратів залишалося в основному на дрібномасштабній стадії в лабораторії, повідомлялося про небагато промислових застосувань.

1.3. Модифікація поліетерсульфонових мембран

Комплекс фізико-хімічних, механічних і експлуатаційних властивостей, яким володіють мембрани є взаємопов'язаним і часто взаємозалежним. Ці властивості мембран визначаються в загальному випадку молекулярної і надмолекулярної структурою речовин, на основі яких вони отримані, а також їх макроскопічної структурою. Тому для отримання мембран з необхідними властивостями можливо два шляхи: використання нових матеріалів для їх виготовлення і модифікування мембран.

Другий шлях більш швидкий і економічно вигідний. Він дозволяє використовувати сучасні високоефективні методики модифікування, які за рахунок хімічного, фізико-хімічного або фізичного впливу на робочу поверхню мембран надають уже готовим виробам нові властивості, корисні в процесах поділу. Цілями модифікування зокрема можуть бути:

- зміна гідрофільногідрофобного балансу поверхні з метою збільшення затримувальних властивостей мембран, наприклад, з вуглеводнів, присутніх у багатьох розчинах у вигляді нафтових, масляних і бензинових емульсій;

- надання мембранам додаткового поверхневого заряду, що сприяє поліпшенню нанофільтраційних властивостей мембран як по одно-, так і по багатозарядних іонах; [54]

- надання мембранам необхідних адсорбційних властивостей, що дозволить розширити їх функції в процесах баромембранного поділу і концентрування розведених розчинів біологічних об'єктів (білки, віруси, високомолекулярні сполуки і т.д.).

При цьому слід враховувати, що модифіковані мембрани повинні відповідати наступним необхідним вимогам:

- збереження можливості теплової або хімічної стерилізації;
- нетоксичність хімічних з'єднань, отриманих на поверхні мембран в результаті нанесення на них модифікатора

(Особливо, якщо мембрана використовується для отримання біопрепаратів), і стабільність покриття, яке модифікується ;

- зміна не повинна приводити до істотного погіршення експлуатаційних властивостей мембран (селективність, продуктивність).

Вибір матеріалів для формування полімерних мембран обмежений вже тому, що вони повинні відповідати певним вимогам, таким як, наприклад, здатність до плівкоутворення, розчинність, доступність сировини, тощо [55,56]. Якщо додати до них вимоги до самих мембран, то стає очевидним, що як універсальних матеріалів для створення мембран, так і мембран, що можуть бути використані в різноманітних процесах не існує. Саме тому мембрани підбирають для кожного окремого мембранного процесу, враховуючи його особливості, використовуючи такі властивості мембран, які необхідні для даного процесу [57].

1.3.1. Властивості поліетерсульфону

Поліетерсульфон широко використовується як перспективний матеріал для медичного застосування та мембран для обробки відходів, оскільки він забезпечує відмінні механічні та термічні властивості. Гідрофобність поліетерсульфону вважається одним з основних недоліків використання цього матеріалу, оскільки гідрофобна поверхня спричиняє ефекти біозабруднення мембрани, що завжди вважається серйозним обмеженням використання поліетерсульфону в мембранній технології. Хімічна модифікація матеріалу є перспективним рішенням цієї проблеми. Модифікація поверхні - це відмінна техніка для введення гідрофільних властивостей та функціональних груп на

поверхню мембрани поліетерсульфону. Існують хімічні модифікації поліетерсульфону та різні методи, що використовуються для підвищення гідрофільності мембрани поліетерсульфону. Зокрема, додавання амінофункціональних груп до поліетерсульфону використовується як основний метод або для введення гідрофільних властивостей, або для введення наноматеріалів на поверхню мембрани поліетерсульфону.

Поліетерсульфон (PES), як показано на малюнку Рис 1.2, вважається одним із добре відомих полімерних матеріалів, що використовується для виготовлення ультрафільтраційних (UF), мікрофільтраційних (MF) та газорозділювальних мембран, оскільки він забезпечує унікальні властивості, такі як термічна, механічна, гідролітична міцність як у гарячому, так і у вологому середовищі [58]. PES хімічно виготовляється з бісфенолу А та дихлордифенілсульфону за допомогою реакції конденсації та протікає за допомогою механізму ароматичного нуклеофільного заміщення [59]. PES - мембрана прозора та аморфна за структурою та має високий T_g до 225°C [60]. Існують різні виробництва, котрі комерційно випускають PES, наприклад, компанія BASF з торговими назвами Ultrason E та Ultrason S, компанія Solvay з торговою назвою Radel PES та хімічна компанія Sumitomo з торговою назвою Sumika excel. Найбільш використовуваними продуктами для синтезу PES-мембрани в дослідницьких дослідженнях є продукт Ultrason з молекулярною масою 58 кДа та продукт Radel з молекулярною масою 15 кДа [61].

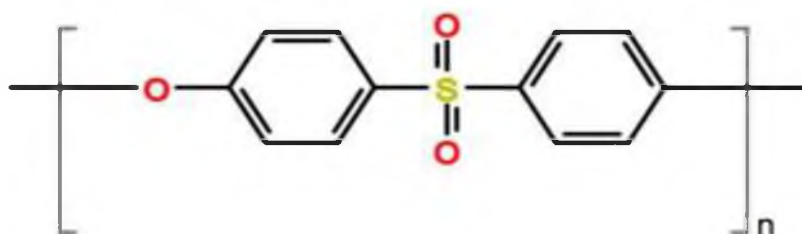


Рис. 1.2. Хімічна структура поліетерсульфону (PES).

Хоча PES є дуже важливим матеріалом, що використовується в мембранній технології для різних застосувань, гідрофобні властивості PES

обмежують його застосування. Звіти досліджень виявили, що гідрофобність є однією з головних причин біообрастания мембран. Біозабруднення є небажаним накопиченням та зростанням біоплівки. Біоплівка - це відкладення мікробних клітин, при якому ці клітини прилипають до поверхні мембрани (не виганяються делікатним промиванням) і покриваються ґратами позаклітинних полімерних речовин (EPS). Коли мембрана PES використовується для очищення води, мікроорганізми, які присутні майже у всьому водному середовищі, перетворюють розчинні солі та поживні речовини, що знаходяться у воді, у матеріали, які є напівтвердими або твердими речовинами, що призводить до блокування мембран [62]. Отже, починають з'являтися проблеми, пов'язані з якістю мембрани, такі як збільшення вартості обслуговування мембрани, зменшення терміну служби мембран, а також погана продуктивність розділення. Хімічна модифікація мембрани PES використовується як основне рішення для підвищення гідрофільності та розробки протиобрастаючих мембранних матеріалів [63].

Використання гідрофільної мембрани не завжди є цінним рішенням для уникнення ефектів забруднення мембран, оскільки цей тип мембрани має можливість набухати у воді і забезпечувати меншу механічну, а також меншу теплову міцність. Альтернативним рішенням для запобігання забрудненню є введення гідрофільних функціональних груп у гідрофобний полімер з унікальними механічними властивостями, такими як PES. Ця хімічна модифікація дозволяє хімічно модифікованому PES поєднувати властивості між характеристиками гідрофобності, такими як відмінні механічні та термічні властивості та гідрофільні характеристики, щоб уникнути забруднення та збільшення потоку пермеату [64]. Важливо підкреслити, що однією з основних цілей мембранної технології є проектування мембран, які забезпечують найбільший потік пермеату з найбільшим відторгненням розчиненої речовини, зберігаючи мінімальні витрати на виробництво мембран. Введення гідрофільних функціональних груп може бути здійснено або шляхом кополімеризації гідрофільних мономерів з гідрофобними мономерами для

отримання нових полімерних матеріалів, або з використанням гідрофобного полімеру в якості основного полімерного матеріалу та гідрофільних груп, введених на поверхню цього полімеру. Гідрофільні функціональні групи, які можуть бути введені в PES, зазвичай є сульфоновими, карбоксильними, гідроксильними та амінними функціями [65].

Модифікація мембран PES базується на трьох методологіях, які включають обробку поверхні, що включає фізичну адсорбцію, ультрафіолетове опромінення, обробку плазмою тощо, метод змішування, який розглядається як обробка поверхні, та об'ємна модифікація.

1.3.2. Модифікація поверхні

Модифікація поверхні мембран PES використовується як приваблива методологія для зміни поверхні гідрофобних мембран PES таким чином, що гідрофільні властивості вводяться на поверхню, зберігаючи немодифіковану основу мембрани. Гідрофільні властивості модифікованої мембрани перешкоджають накопиченню та прикріпленню органічних гідрофобних сполук на поверхні мембрани PES. Гідрофільність мембрани PES вимірюється кутом контакту, на який, у свою чергу, впливають різні фактори, такі як шорсткість мембрани, пористість, розмір пор та розподіл пор. Коли величина розміру пор мембрани висока, отримується низьке значення кута контакту, що означає, що мембрана гідрофільна. Однак, коли шорсткість поверхні мембрани підвищується, це означає, що кут контакту збільшується. Існують різні методи, що застосовуються для підвищення гідрофільності мембрани PES шляхом модифікації поверхні, включаючи методи нанесення покриттів, спосіб змішування, обробку плазмою, ультрафіолетове нанесення та поверхнево-атомарну полімеризацію атома (SI-ATRP), які використовувались для приєднання гідрофільних функціональних груп на поверхні мембрани PES [60,62].

Існують такі методи, як термоіндукована полімеризація та щеплення функціональних груп, що є підходом для модифікації поверхні мембрани PES. У цьому методі завжди використовуються хімічні ініціатори або агенти розщеплення. Ця методика є ефективною та корисною для іммобілізації біомолекул таких сполук, як ферменти, білок та амінокислота, які ковалентно приєднуються до поверхні мембрани PES хімічною реакцією [66].

Радикальна полімеризація атомів (ATRP) є відносно новою технікою для прищеплення полімеру, і вона вважається простою та ефективною, оскільки вимагає досить м'яких умов і дозволяє полімеризувати різні вінілові мономерні контрольованим способом з чітко визначеною структурою. На сьогоднішній день для модифікації мембрани PES використовуються три методи прищеплення, які використовуються на основі поверхнево-розповсюдженого АТРП: щеплення -через, щеплення –до, і щеплення -від. Однак є кілька досліджень, що охоплюють поверхнево-ініційований метод ATRP, що використовується для модифікації мембрани PES [67].

Хімічна модифікація мембрани PES, включаючи модифікації поверхні, змішування та об'ємні модифікації, є критично важливими методами, що застосовуються для зменшення її ефекту біообрастання. Модифікація поверхні для введення гідрофільних функціональних груп вважається одним із найбільш часто використовуваних варіантів для посилення гідрофільності PES без впливу на механічні та теплові властивості магістралі PES. Амінофункції ефективно використовувались для посилення гідрофільності поверхні PES та введення мономерів, ферментів та наноматеріалів на поверхню PES, які, як було показано, посилюють біологічну активність цього полімерного матеріалу. Більшість попередніх досліджень синтезували амінофункціоналізовані мембрани PES шляхом реакції нітрування з H_2SO_4 : HNO_3 , а потім реакції відновлення. Модифікація PES за допомогою амінових функцій не тільки підвищує гідрофільність мембрани PES, але вони також мають потенційні ділянки координаційного зв'язку з різними наноматеріалами для того, щоб бути введеними на поверхню мембрани. Наноматеріали, такі як

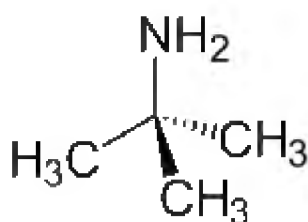
Ag, GO, ZnO та MWCN, на сьогодні є єдиними наночастинками, які раніше були досліджені з мембраною NH₂-PES [68]. Потрібні подальші дослідження для посилення іммобілізації наноматеріалів на поверхні амінованої функціоналізованої мембрани PES, щоб гарантувати, що наноматеріали не просочуються у водне середовище.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

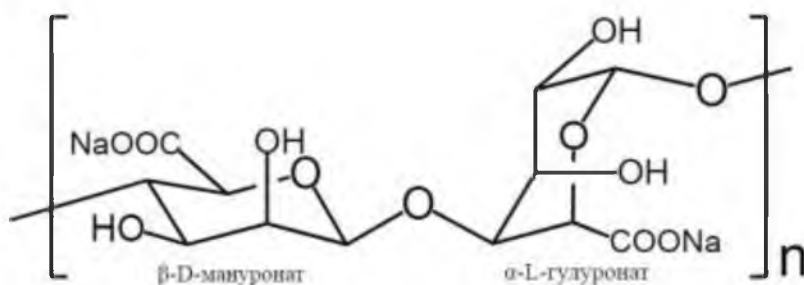
2.1. Реактиви і матеріали

Для синтезу гідрофобізованої похідної натрій альгінату використовували:

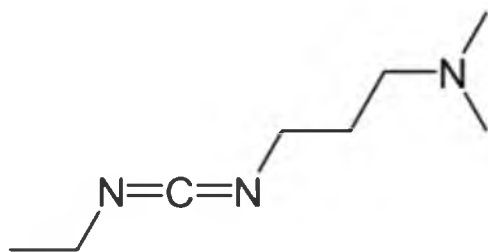
- *трет*-бутиламін (CAS 14846-47-0, R773336), виробництва «ТОВ «Укроргсинтез»», Україна;



- натрій альгінат низькомолекулярний (CAS 9005-38-3, lot 051M1864V), отриманий з бурих водоростей, виробництва «Sigma-Aldrich», США;



- 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодімід гідрохлорид (ЕДК) (CAS 25952-53-8), виробництва «ТОВ «Укроргсинтез»», Україна.



- октан-1-амін (CAS 14846-47-0, R773336), виробництва «ТОВ «Укроргсинтез»», Україна;



- етанол 96% (виробник ТОВ «Панацея»).

Для модифікування мембран використовували:

- поліетерсульфонові мембрани з відсікальною здатністю 50 кДа (Microdyn Nadir, Німеччина);
- протеази:

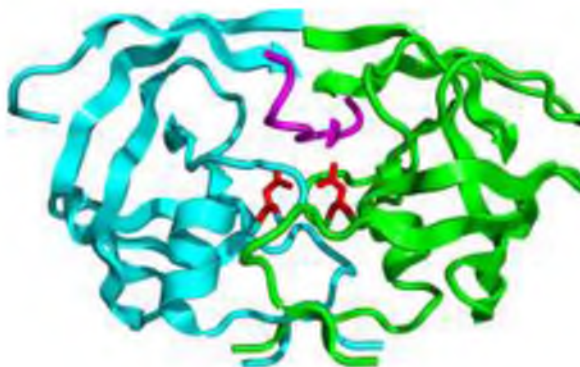


Рис. 2.1. Модель структури протеази

Для вивчення біокаталітичних і транспортних властивостей модифікованих мембран використовували:

- бичачий сироватковий альбумін (БСА) (CAS 9048-46-8, lot A7906-10G), виробництва «Sigma», США.

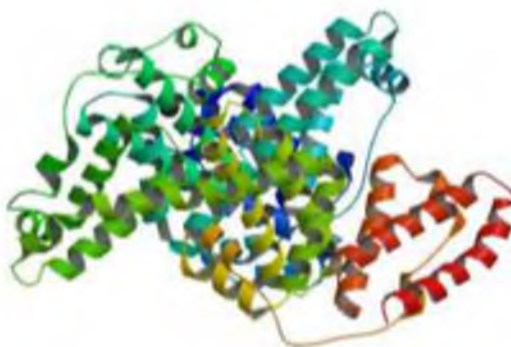


Рис. 2.2. Модель структури БСА

Використовували також такі прилади як:

- рН-метр-мілівольтметр рН-150МА;
- аналітичні терези лабораторні 2 класу моделі ВЛР-200 г;
- ваги електронні AD-200 (AXIS, Польща);

- комірку непроточного типу Amicon 8050 (Millipore, США).

2.2. Методика модифікування натрій альгінату *трет*-бутиламіном та октан-1-аміном

Для модифікування натрій альгінату *трет*-бутиламіном (або октан-1-аміном) брали 0,5% розчин натрій альгінату в кількості 80 мл. На першому етапі 0,4 г альгінату розчиняли в 40 мл дистильованої води на другому - за допомогою 0,05 н розчину HCl рН розчину доводили до значення 3,4. Далі додавали ініціатор у систему. У реакційну систему вводили невелику кількість (на кінчику шпателя) 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімід гідрохлориду (EDC). Наступним кроком додавали 0,2 мл *трет*-бутиламіна (октан-1-аміна), через 10 хвилин після введення ініціатора. Далі на 24 години за температури 35 °С поміщали колбу з реакційною сумішшю в термостат. Після чого одержаний полімер осаджували в етанолі та відфільтровували. Осадження і фільтрування відбувається в декілька етапів:

- реакційну суміш відфільтрували на паперовому фільтрі;
- для осадження продукту у фільтрат вливали етанол;
- осаджений продукт виділяли з етанолу ультрафільтрацією на установці непроточного типу;
- в сушильній шафі полімер висушували за температури 35 °С.

2.3. Дослідження характеристик натрій альгінату, модифікованого *трет*-бутиламіном та октан-1-аміном

ІЧ-спектри альгінату та його похідних знімали за допомогою ІЧ-спектрометра IRAffinity-1 (Shimadzu, Японія) у діапазоні 4000-400 см⁻¹ за кімнатної температури.

Гідродинамічний діаметр полімерних міцел вимірювали за допомогою DLS метода (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments, Великобританія) за температури 20 °С.

2.4. Модифікування полісульфонових мембран міцелами на основі натрій альгінату, модифікованого *трет*-бутиламіном та октан-1-аміном

Полісульфонові мембрани PES-50 модифікували за допомогою адсорбції міцел натрій альгінату, модифікованого *трет*-бутиламіном або октан-1-аміном відповідно. З цією метою мембрани промивали водою і потім занурювали в розчин міцел на 1 годину. Далі їх промивали дистильованою водою. Для кожного експерименту використовували новий зразок мембрани.

2.5. Дослідження поверхневих і транспортних властивостей модифікованих мембран

Досліди ультрафільтрації проводили за кімнатної температури при постійному перемішуванні 300 об/хв. Модифікування проводили зі сторони селективного шару мембрани. Об'єм комірки становив 50 мл. Потік вимірювали у діапазоні тисків від 0,5 до 3 атм.

Закон Дарсі був використаний для кількісного визначення забруднення мембран під час ультрафільтрації:

$$J_v = \frac{\Delta P}{\mu(R_m + R_c)}$$

де ΔP - трансмембранний тиск [Па]; μ - в'язкість розчину [Па · с]; R_m - гідродинамічний опір чистої мембрани [1/м]; R_c - гідродинамічний опір шару забруднювача [1/м].

2.6. Методика визначення концентрації розчинів БСА методом УФ-спектроскопії.

Визначення концентрації розчинів БСА проводили методом УФ-спектроскопії при довжині хвилі 280 нм. Згодом будували калібрувальний графік залежності оптичної щільності розчинів від концентрації (Рис 2.3).

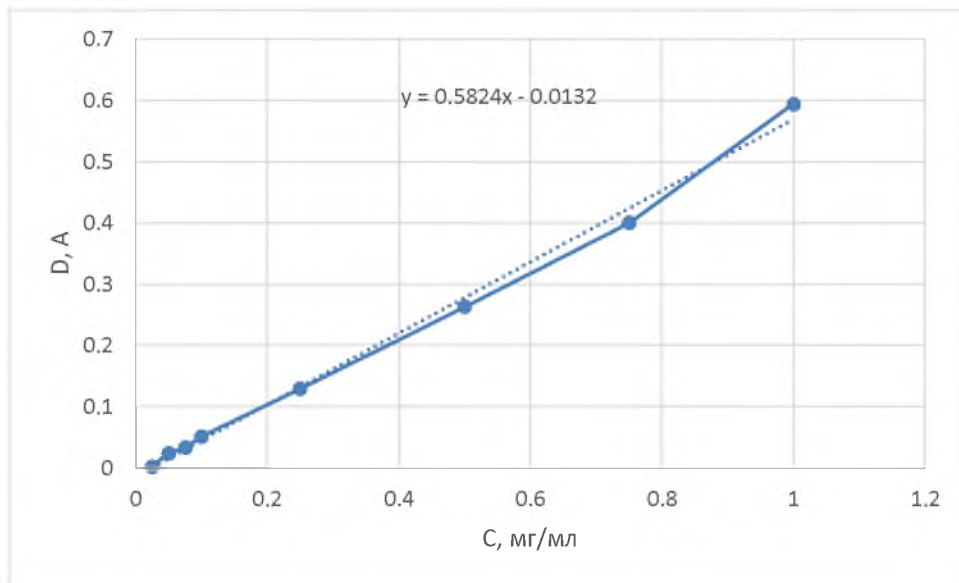


Рис. 2.3 Калібрувальний графік для визначення концентрації БСА методом УФ-спектроскопії

2.7. Методика визначення стабільності мембран у процесі ультрафільтрації БСА

Стабільність фільтрації - це здатність мембрани фільтрувати розчинену речовину за одиницю часу при визначеному тиску.

Дослідження стабільності мембрани проводилось при тиску 200 кПа. Провели 5 циклів дослідження . Один цикл включав наступні вимірювання.

Під час перемішування комірки об'ємом 50 мл розчину БСА відливали 1 мл речовини і міряли його пропускну здатність . Далі зменшували об'єм, відливаючи 10 мл у пробірку, знову взявши 1 мл речовини вимірювали пропускну здатність, і ще така одна повторювальність.

РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Модифікування натрій альгінату *трет*-бутиламіном та октан-1-аміном

Модифікування натрій альгінату трет-бутиламіном та октан-1-аміном здійснювали по однаковій методиці. Для модифікування натрій альгінату *трет*-бутиламіном та октан-1-аміном необхідно 80 мл 0,5% розчину натрій альгінату. Після за допомогою 0,05 н розчину HCl рН розчину доводили до значення 3,4. На кінчику шпателя в реакційну систему вводили 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодімід гідрохлорид (ЕДК). Через 10 хвилин після введення ініціатора, додавали 0,2 мл *трет*-бутиламіна (або ж октан-1-амін відповідно). Колбу з реакційною сумішшю поміщали в термостат на 24 години. Фільтрат вливали у 200 мл етанолу для осадження продукту. Осаджений продукт відфільтровували. Полімер висушували в сушильній шафі.

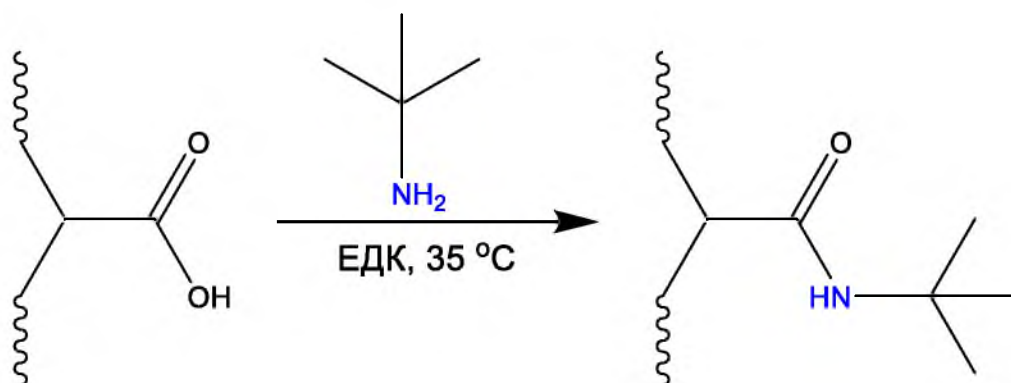


Рис. 3.1. Схема модифікування натрій альгінату *трет*-бутиламіном

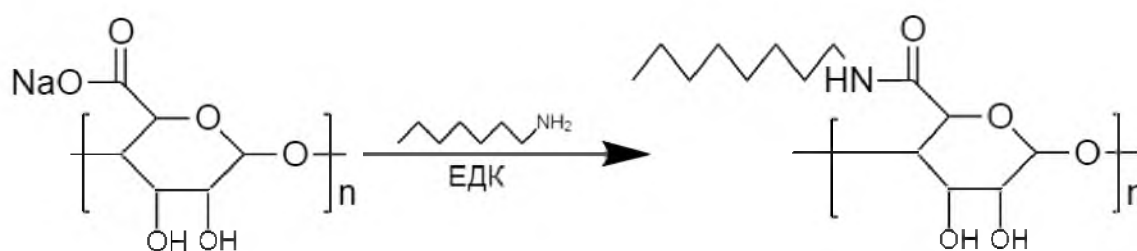


Рис. 3.2 Схема модифікування натрій альгінату октан-1-аміном

3.2. Модифікування полісульфонових мембран міцелами на основі натрій альгілату, модифікованого трет-бутиламином та октан-1-аміном.

Для підтвердження модифікування натрій альгілату знімали ІЧ-спектри, наведені на рис. 3.3 і рис. 3.4.

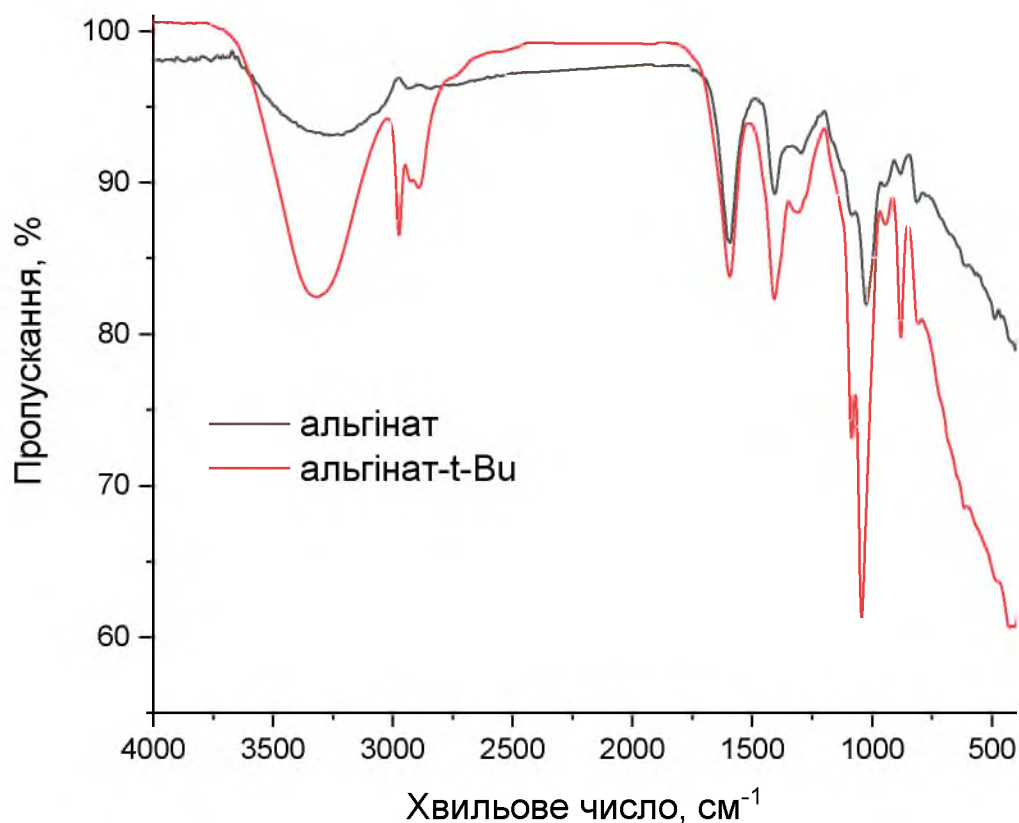


Рис. 3.3. ІЧ-спектри натрій альгілату та натрій альгілату, модифікованого *трет*-бутиламином

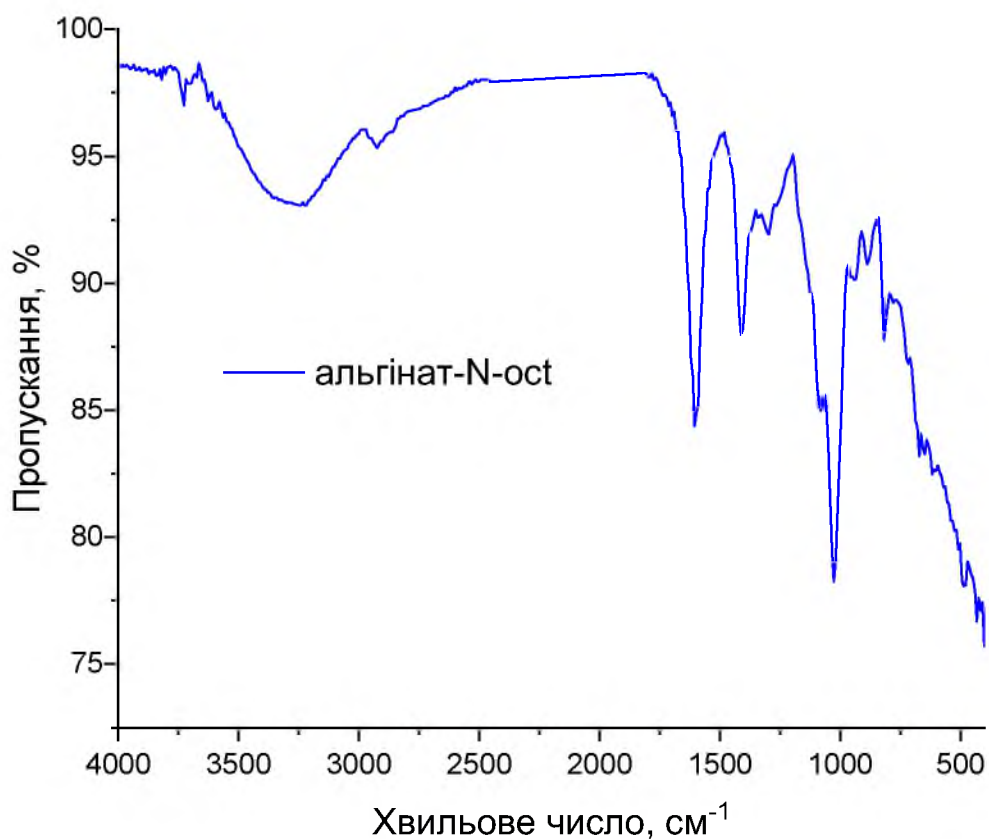


Рис. 3.4. ІЧ-спектр натрій альгінату, модифікованого октан-1-аміном

Прищеплення амінокислот до натрій альгінату підтверджували методом ІЧ-спектроскопії. ІЧ спектри свідчать про утворення пептидних зв'язків, які утворились під час модифікування полісахариду.

На рис. 3.3 і рис. 3.4 представлені ІЧ-спектри натрій альгінату та натрій альгінату модифікованого *трет*-бутиламіном і октил-1-аміном. Можна побачити на них збільшення ширини смуг при 3300-3100 cm^{-1} , які відповідають за симетричні валентні коливання N-H-зв'язків.

Відбуваються сильні смуги поглинання Амід I та Амід II в області частот 1700-1450 cm^{-1} . Прослідковується смуга 3400-3350 cm^{-1} спричинена деформаційними коливаннями N-H –зв'язків у площині пептидної групи .

Максимум при першій смузі відповідає коливанням амідного зв'язку C=O та становить 1650 cm^{-1} . Друга смуга обумовлює довжину хвилі 1450 cm^{-1} .

Також спостерігається Амід III смуги поглинання 1310 cm^{-1} яка відповідає за плоскі деформаційні коливання N-H-зв'язків і валентні C-N.

Спостерігаються смуги при $750\text{-}600\text{ см}^{-1}$, вони відповідають Амід IV і V, які характеризують неплоскі деформаційні коливання зв'язків C=O і N-H, відповідно.

Розмір полімерних міцел вивчали методом динамічного світлорозсіювання. Отримані розподіли за розміром наведені на рис. 3.5 і 3.6.

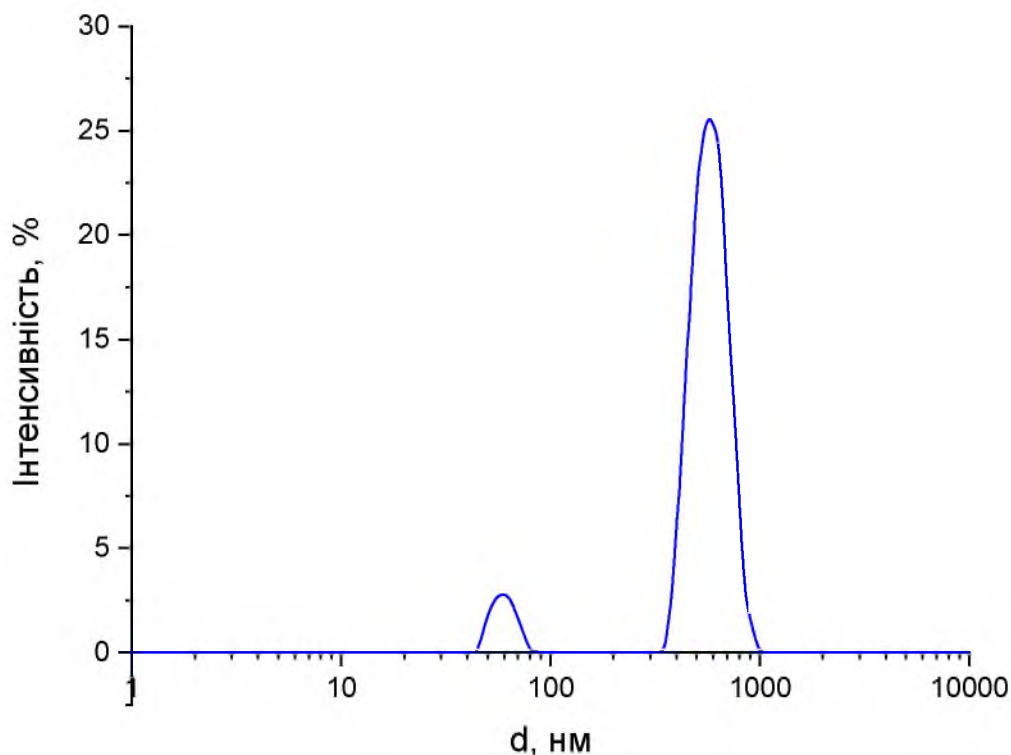


Рис. 3.5. Розподіл полімерних міцел за розміром за інтенсивністю, отриманих з альгінату, модифікованого *трет*-бутиламіном

Отримані міцели мали нормальне розподіл за розмірами. Натрій альгінат, модифікований *трет*-бутиламіном, може утворювати полімерні міцели з розмірами як $55,7 \pm 9,0$ нм так і $587,4 \pm 120,4$ нм як це зображено двома піками на рис 3.4. Індекс однорідності дорівнює 0,518.

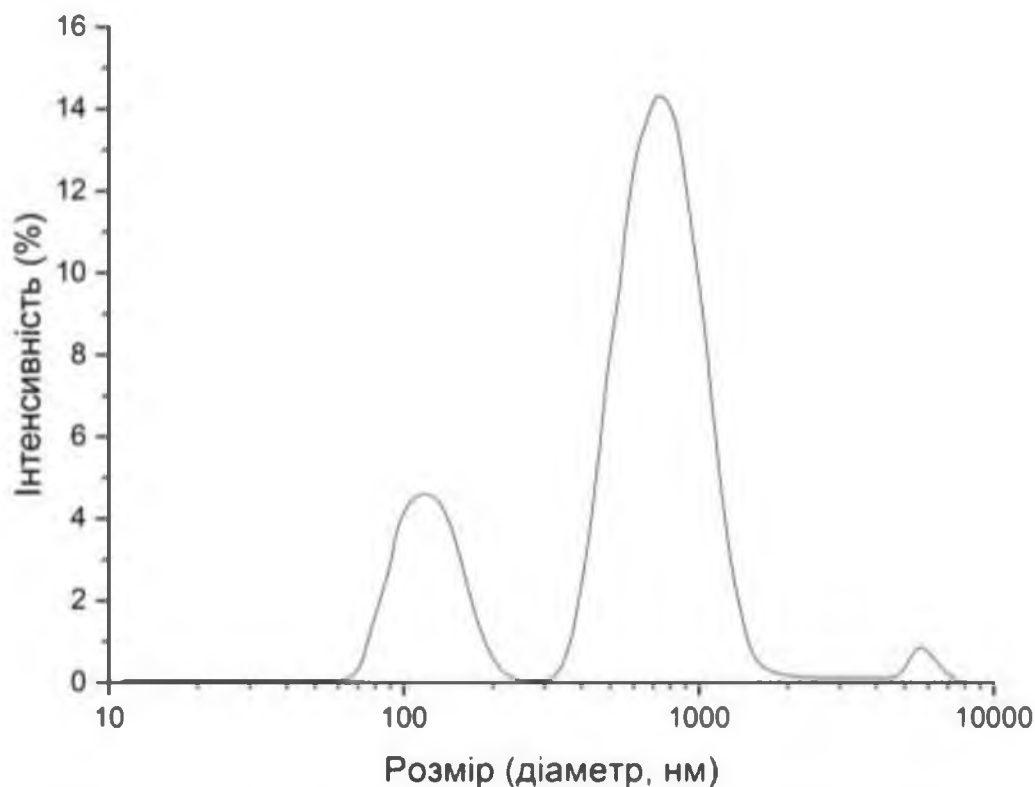


Рис. 3.6. Розподіл полімерних міцел за розміром за інтенсивністю, отриманих з альгілату, модифікованого октил-1-аміном

Натрій альгінат, модифікований октан-1-аміном, також здатен до утворення полімерних міцел. Наявність інтенсивного світлорозсіювання частинками підтверджує здатність до утворення міцел з середнім діаметром 125 ± 20 нм (рис. 3.6).

3.3. Дослідження транспортних і біокаталітичних властивостей модифікованих мембран

Залежності об'ємного потоку від тиску для мембран, модифікованих t-Bu-альгінат та N-ост-альгінат з ферментом та без нього, представлені на рис. 3.7. Немодифікована мембрана має більшу водопроникність, ніж мембрани, модифіковані альгінат-октан-1-аміном з інкорпорованою протеазою та трішки більшу, ніж модифіковані альгінат-октан-1-амін, альгінат-трет-бутиламіном і альгінат-трет-бутиламіном з інкорпорованою протеазою та в 1,75 рази

мембрани, модифікованої нативною протеазою. Цю властивість мембрани можна пояснити тим, що при іммобілізації нативної протеази відбувається часткове перекривання пор мембрани, тоді як при адсорбції полімерних міцел цього не відбувається.

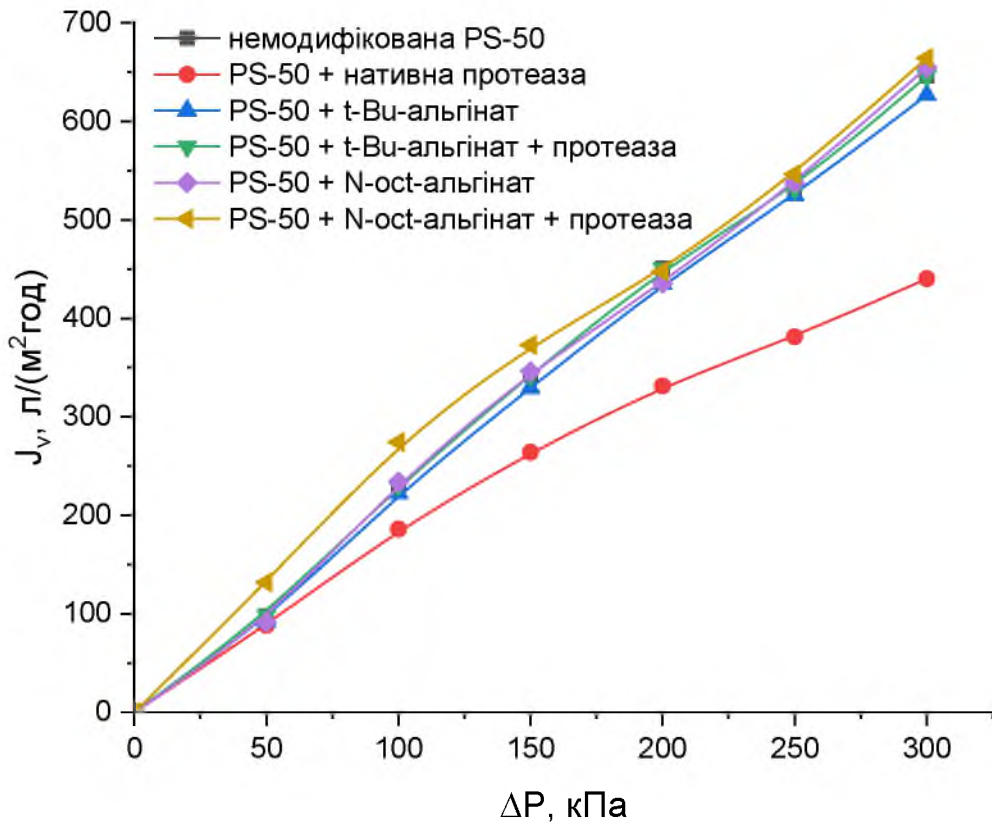


Рис. 3.7. Залежність водопроникності мембран від прикладеного тиску

Розглянувши залежність продуктивності мембрани, модифікованої нативною протеазою, від прикладеного тиску при ультрафільтрації розчинів БСА різної концентрації, наведену на рис. 3.8, можемо зазначити, що за однакових умов прикладеного тиску 300 кПа при більшій концентрації менша продуктивність, а при концентрації БСА модифікованої нативною протеазою мембрани 0,05 % продуктивність у 1,7 рази більша, ніж при концентрації 0,5 % у 1,4 рази більша, ніж при концентрації 0,10 %.

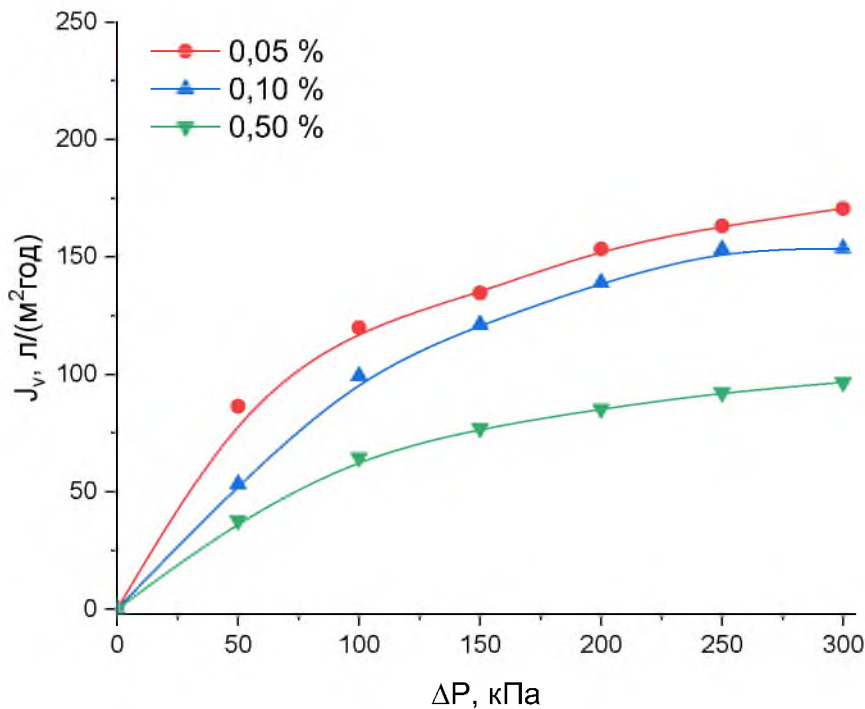


Рис. 3.8. Залежність продуктивності мембрани, модифікованої нативною протеазою, від прикладеного тиску при ультрафільтрації розчинів БСА різної концентрації

Аналіз залежності продуктивності мембран, модифікованих N-ост-альгінатом та N-ост-альгінатом + протеаза від прикладеного тиску при ультрафільтрації розчинів БСА різної концентрації (рис. 3.9 - 3.10) показав, чим більший прикладений тиск, тим більша продуктивність мембрани, причому при меншій концентрації БСА продуктивність більша. Продуктивність мембран під час ультрафільтрації розчинів БСА була значно покращена, особливо для мембрани, модифікованої N-ост-альгінатом + протеаза. При чому за однакових умов продуктивність мембрани модифікованої N-ост-альгінатом + протеаза в 1,27 разів більша, ніж мембрани модифікованої N-ост-альгінатом, що свідчить про суттєве зниження впливу концентраційної поляризації на ультрафільтрацію білка через ці мембрани.

За однакових умов прикладеного тиску 300 кПа при більшій концентрації менша продуктивність:

- за концентрації модифікованої N-ост-альгінатом мембрани 0,05 % продуктивність у 1,6 рази більша ніж при концентрації 0,5 % та у 1,1 рази більша, ніж при концентрації 0,10 % (рис 3.9).

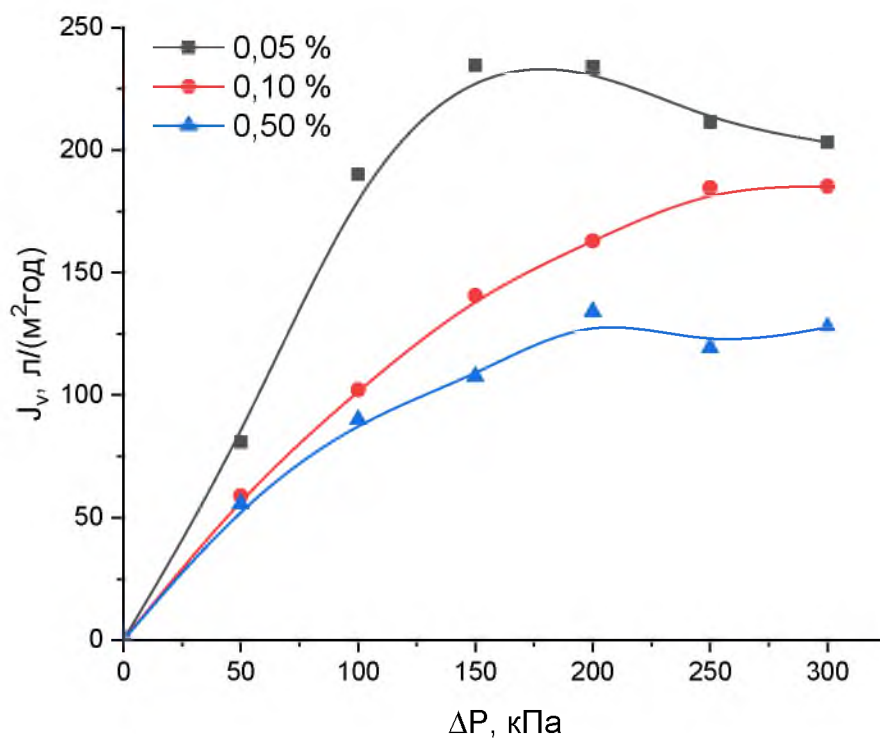


Рис. 3.9. Залежність продуктивності мембрани, модифікованої N-ост-альгінатом, від прикладеного тиску при ультрафільтрації розчинів БСА різної концентрації

- при концентрації модифікованої N-ост-альгінатом + протеаза мембрани 0,05 % продуктивність у 1,7 рази більша ніж при концентрації 0,5 % та у 1,2 рази більша, ніж при концентрації 0,10 % (рис 3.10)

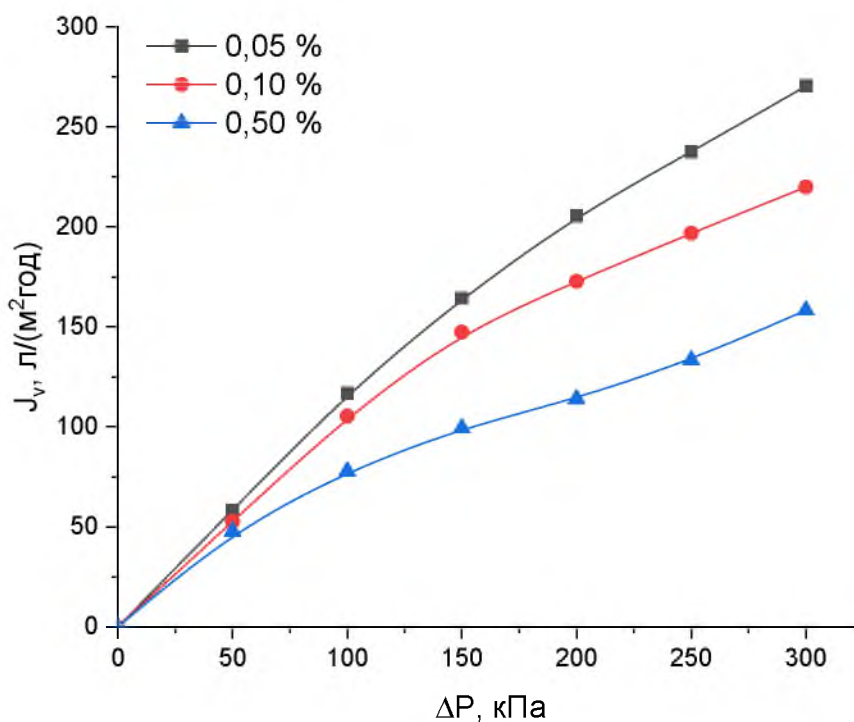


Рис. 3.10. Залежність продуктивності мембрани, модифікованої N-ост-альгінатом + протеаза, від прикладеного тиску при ультрафільтрації розчинів БСА різної концентрації

Чим більший прикладений тиск тим більша продуктивність мембрани, модифікованої t-Bu-альгінатом при ультрафільтрації розчинів БСА причому при меншій концентрації продуктивність більша (рис. 3.11).

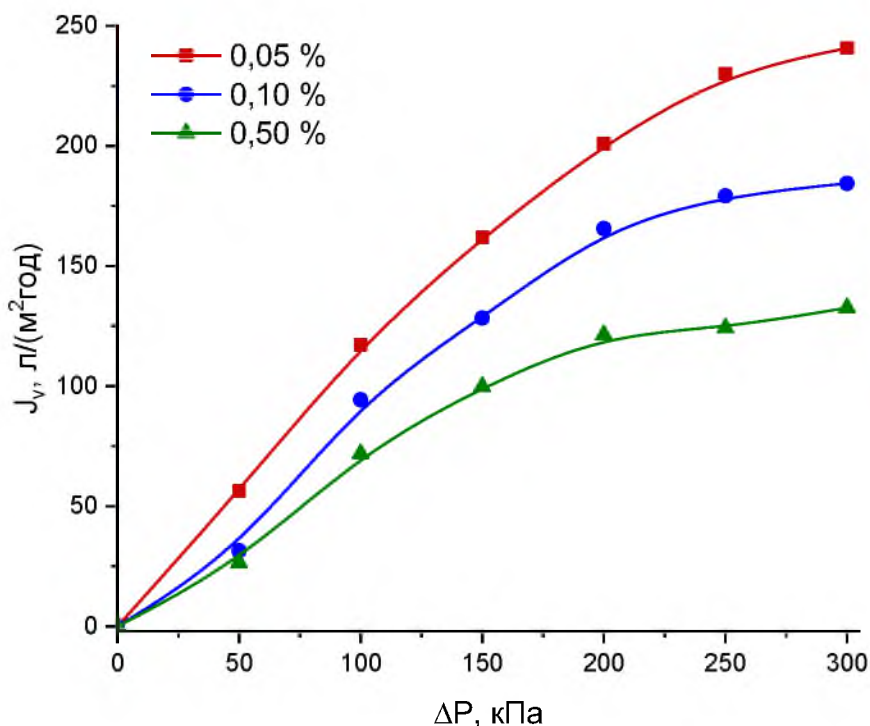


Рис. 3.11. Залежність продуктивності мембрани, модифікованої t-Bu-альгінатом, від прикладеного тиску при ультрафільтрації розчинів БСА різної концентрації

Із збільшенням тиску збільшується продуктивність мембрани, модифікованої протеазою, інкорпорованою в t-Bu-альгінат, при ультрафільтрації розчинів БСА. Порівняли продуктивність застосовувавши тиск 300 кПа при концентрації 0,05 % продуктивність у 1,5 ; 1,3 разів більша ніж відповідно при концентраціях 0,50 % та 0,10% (рис. 3.12). Варто зазначити, що залежність продуктивності мембран від прикладеного тиску для мембрани з міцелами з ферментом є прямолінійною у наведеному діапазоні тисків. Це свідчить про суттєве зниження впливу концентраційної поляризації на ультрафільтрацію білка через ці мембрани

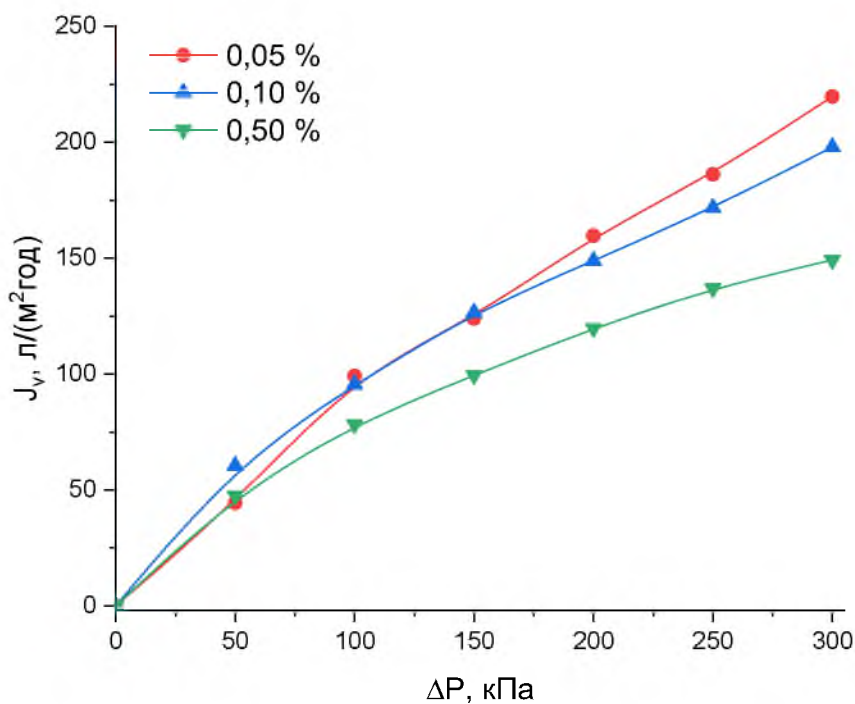


Рис. 3.12. Залежність продуктивності мембрани, модифікованої t-Ви-альгінатом+протеаза, від прикладеного тиску при ультрафільтрації розчинів БСА різної концентрації

Для кількісного оцінювання транспортних властивостей мембран розраховували водопроникність мембран, опір мембран і опір шару білка на поверхні мембрани (табл. 3.1).

Таблиця 3.1. Характеристики мембран

Мембрана	Концентрація БСА, %	L_p , $\text{м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{с} \cdot \text{Па})$	R_m , 1/м	R_c , 1/м
Немодифікована	0	$6,24 \cdot 10^{-10}$	$1,6 \cdot 10^{12}$	-
	0,05	$2,87 \cdot 10^{-10}$	-	$1,0 \cdot 10^{12}$
	0,10	$2,16 \cdot 10^{-10}$	-	$2,2 \cdot 10^{12}$
	0,50	$1,38 \cdot 10^{-10}$	-	$4,8 \cdot 10^{12}$
Нативна протеаза	0	$4,07 \cdot 10^{-10}$	$2,5 \cdot 10^{12}$	-
	0,05	$1,97 \cdot 10^{-10}$	-	$2,6 \cdot 10^{12}$
	0,10-	$1,47 \cdot 10^{-10}$	-	$3,3 \cdot 10^{12}$

	0,50	$1,43 \cdot 10^{-10}$		$4,5 \cdot 10^{12}$
t-Vu-альгінат	0	$5,87 \cdot 10^{-10}$	$1,7 \cdot 10^{12}$	-
	0,05	$2,59 \cdot 10^{-10}$	-	$2,2 \cdot 10^{12}$
	0,10	$2,38 \cdot 10^{-10}$	-	$2,5 \cdot 10^{12}$
	0,50	$1,76 \cdot 10^{-10}$	-	$4,0 \cdot 10^{12}$
t-Vu-альгінат+протеаза	0	$6,00 \cdot 10^{-10}$	$1,7 \cdot 10^{12}$	-
	0,05	$2,22 \cdot 10^{-10}$	-	$0,8 \cdot 10^{12}$
	0,10	$2,02 \cdot 10^{-10}$	-	$1,3 \cdot 10^{12}$
	0,50	$1,83 \cdot 10^{-10}$	-	$2,8 \cdot 10^{12}$
N-ост-альгінат	0	$6,07 \cdot 10^{-10}$	$1,6 \cdot 10^{12}$	-
	0,05	$2,48 \cdot 10^{-10}$	-	$2,4 \cdot 10^{12}$
	0,10	$2,02 \cdot 10^{-10}$	-	$3,3 \cdot 10^{12}$
	0,50	$1,10 \cdot 10^{-10}$	-	$7,4 \cdot 10^{12}$
N-ост-альгінат+протеаза	0	$5,94 \cdot 10^{-10}$	$1,7 \cdot 10^{12}$	-
	0,05	$2,88 \cdot 10^{-10}$	-	$1,8 \cdot 10^{12}$
	0,10	$2,45 \cdot 10^{-10}$	-	$2,4 \cdot 10^{12}$
	0,50	$1,83 \cdot 10^{-10}$	-	$3,8 \cdot 10^{12}$

Отже, підсумуємо отримані результати, на рівні немодифікованої мембрани залишається гідродинамічний опір мембран, модифікованих міцелами. Проте гідродинамічний опір мембрани, модифікованої нативною протеазою зростає. Про антизабруднювальні властивості мембран з іммобілізованою протеазою свідчить зниження гідродинамічного опору шару на поверхні мембрани t-Vu-альгінат+протеаза у 2 рази порівняно з немодифікованою мембраною за всіх концентрацій БСА.

Для вивчення забруднення поверхні мембран знімали ІЧ-спектри мембран до і після ультрафільтрації БСА (рис. 3.13-3.17).

ІЧ-спектри мембран після ультрафільтрації БСА (рис. 3.13-3.14) підтвердили стійкість активного шару на поверхні мембрани модифікованої

альгінат-*N*-октиламином з інкорпорованою протеазою. Збільшення інтенсивності смуги, що відповідає коливанням зв'язків N-H, і зменшення інтенсивності широкої смуги в діапазоні 3500–3000 cm^{-1} після ультрафільтрації можна пояснити частковим відмиванням полімерних міцел від поверхні. Коливання змінились в діапазонах 1500-1740 cm^{-1} , 1100-1200 cm^{-1} після фільтрації БСА піки зменшилось.

Як видно з отриманих ІЧ-спектрів мембрани, модифікованої альгінат-*N*-октиламином до фільтрації БСА (рис. 3.13) спостерігається спочатку збільшення інтенсивності смуги, і зменшення інтенсивності широкої смуги в діапазоні 3500–1600 cm^{-1} .

А після фільтрації БСА мембрани, модифікованої альгінат-*N*-октиламином інтенсивність смуг зросла в області 3260 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} , зменшилась 1420-1600 cm^{-1} .

ІЧ-спектрів мембрани, модифікованої альгінат-*N*-октиламином та мембрани модифікованої альгінат-*N*-октиламином з інкорпорованою протеазою до фільтрації БСА ідентичні. На ІЧ-спектрах (рис. 3.14) можна спостерігати лише зниження піку валентних коливань групи N-H, смуга 3260 cm^{-1} , після фільтрації БСА мембрани модифікованої альгінат-*N*-октиламином з інкорпорованою протеазою. Смуга поглинання 1700 cm^{-1} підтверджує наявність карбонільних зв'язків .

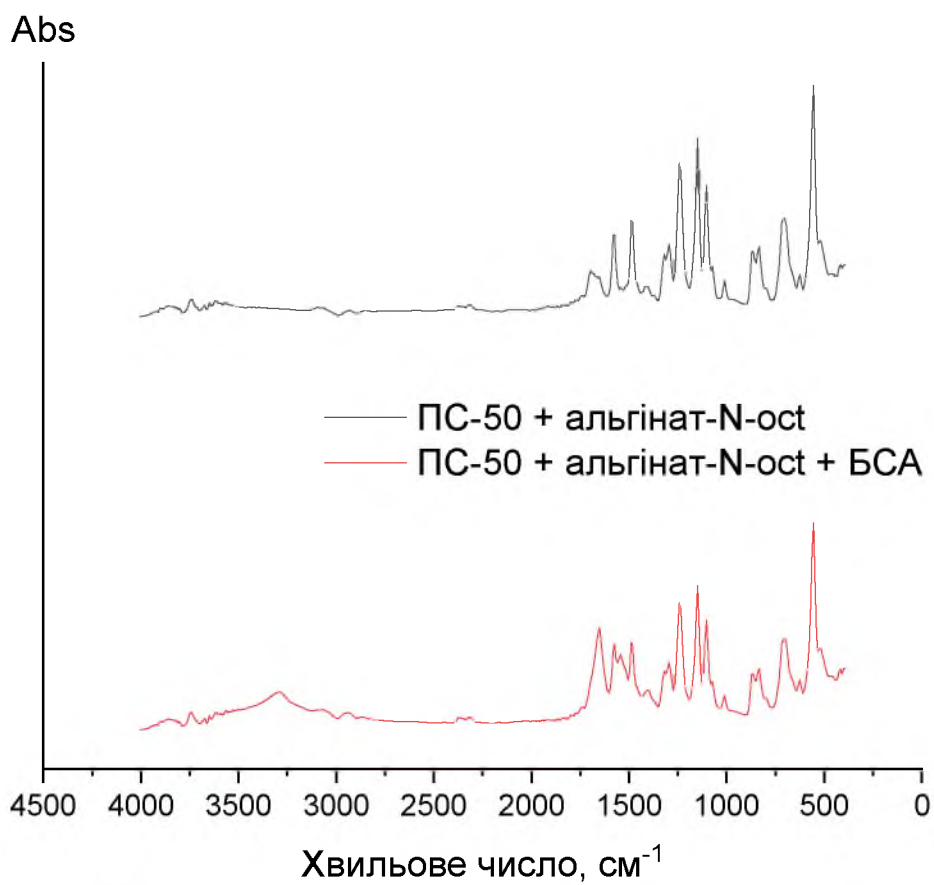


Рис. 3.13. ІЧ-спектри мембрани, модифікованої альгінат-*N*-октиламином до і після фільтрації БСА

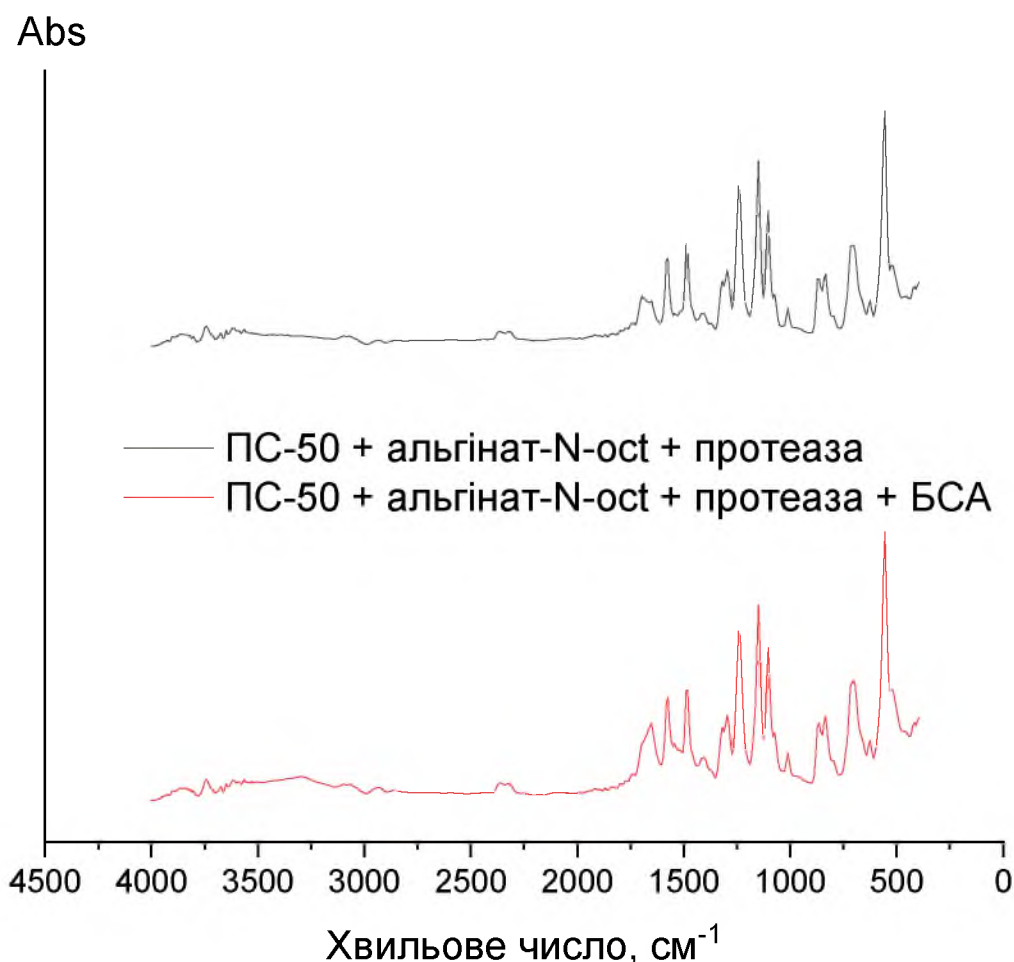


Рис. 3.14. ІЧ-спектри мембрани, модифікованої альгінат-*N*-октиламином з інкорпорованою протеазою, до і після фільтрації БСА

Як видно зі спектрів для немодифікованої мембрани і мембрани, модифікованої міцелами *трет*-бутиламіна без ферменту, після ультрафільтрації БСА зростає інтенсивність смуг в діапазоні 3400-3100 і 1680 см⁻¹, що відповідають валентним коливанням зв'язків ОН, NH₂ і COOH груп білка. Тоді як спектри мембрани, модифікованої міцелами з ферментом, до і після фільтрації БСА практично ідентичні. Це свідчить, що іммобілізація ферменту на поверхні мембрани приводить до зменшення забруднення поверхні мембрани білком.

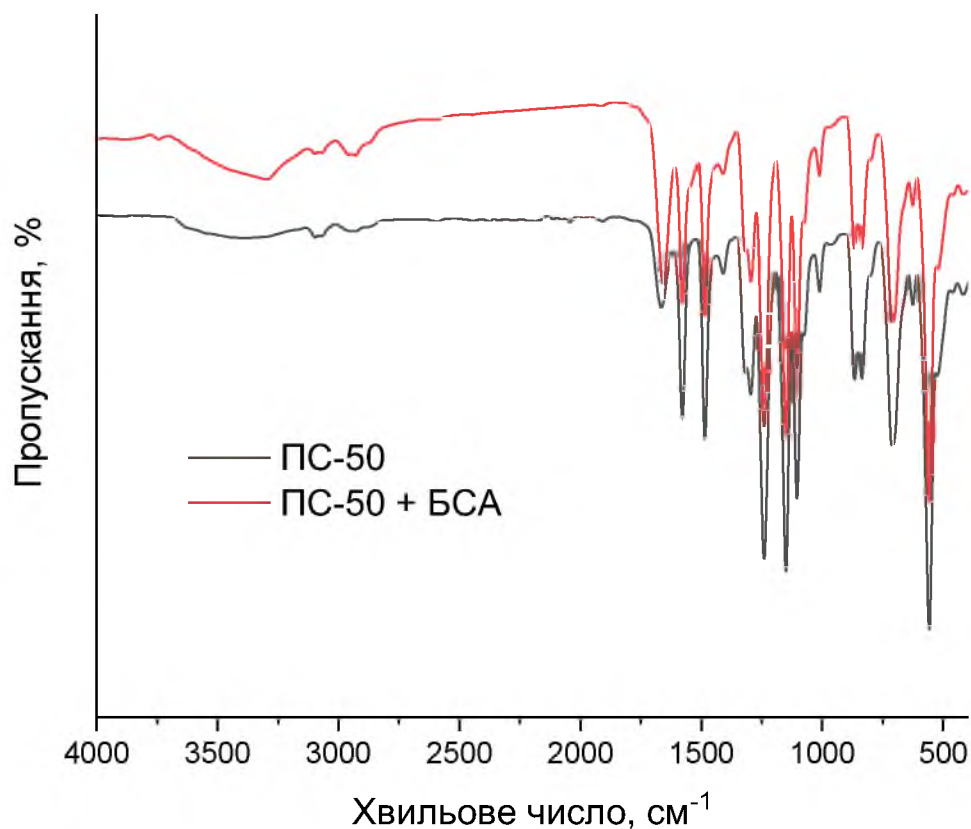


Рис. 3.15. ІЧ-спектри немодифікованої мембрани до і після фільтрації БСА

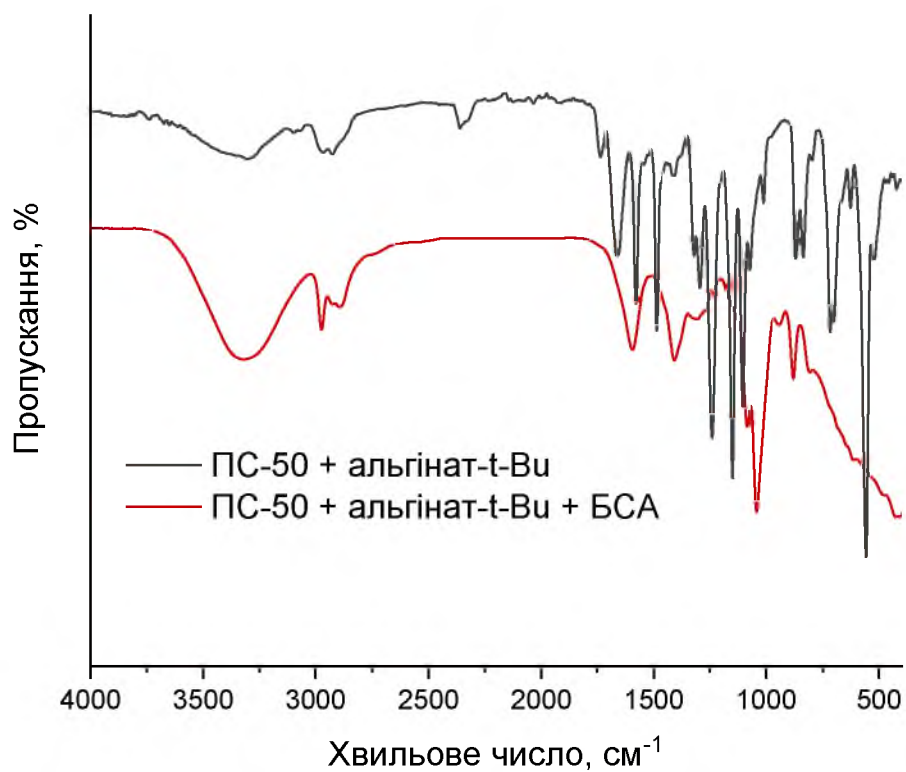


Рис. 3.16. ІЧ-спектри мембрани, модифікованої альгінат-*трет*-бутиламіном, до і після фільтрації БСА

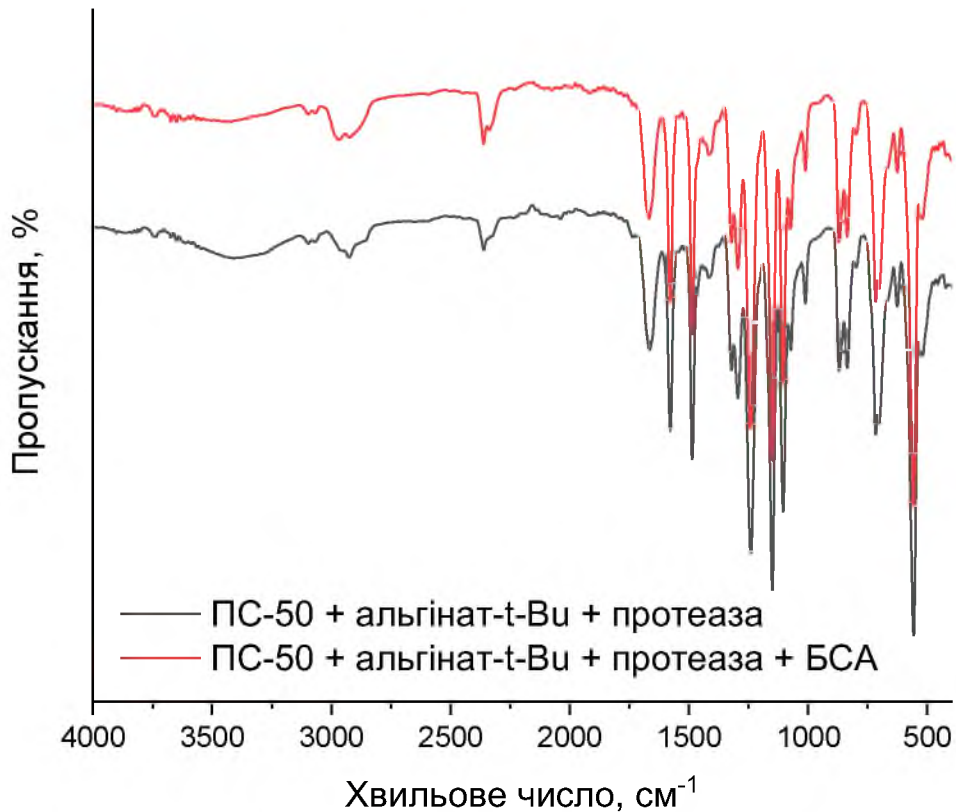


Рис. 3.17. ІЧ-спектри мембрани, модифікованої альгінат-*трет*-бутиламіном з інкорпорованою протеазою, до і після фільтрації БСА

3.4. Вивчення стабільності мембран, модифікованих протеазою, у процесі ультрафільтрації БСА

Оскільки мембрани були модифіковані фізичною адсорбцією, важливим є їх стійкість у часі. Для цього мембрани витримували в дистильованій воді при постійному перемішуванні, періодично вимірюючи їх проникність. Отримані залежності показані на рис. 3.18. Для не модифікованої мембрани різке зниження проникності спостерігалось на початку другого циклу, а об'ємний потік зменшувався в 4 рази протягом наступних трьох циклів. Це можна пояснити вимиванням протеази та блокуванням пор мембран. На відміну від немодифікованих мембран, мембрани модифіковані альгінатом- *t*-Bu та альгінатом-*N*-oct, мали стабільні об'ємні потоки під час експерименту. Було доведено, що модифікованні мембрани стабільні в часі.

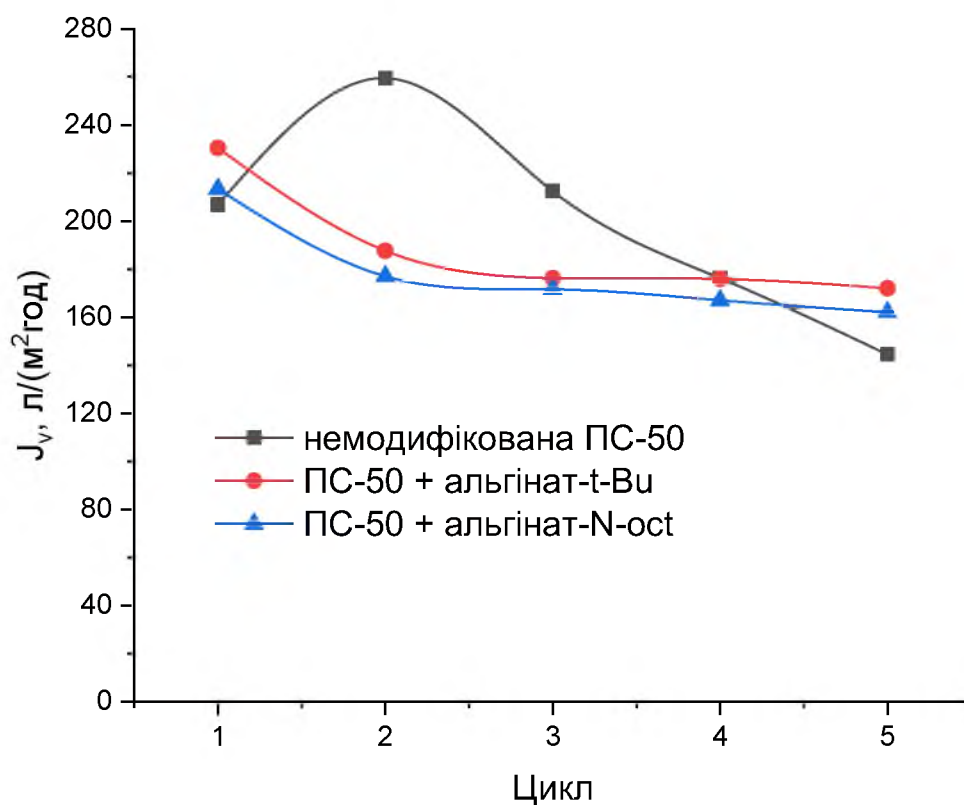


Рис. 3.18. Залежність продуктивності мембран залежно від циклу регенерації

Якщо розглядати залежність затримки БСА на мембранах залежно від циклу регенерації рис 3.19, то протягом перших двох циклів простежується різка затримка БСА на мембранах, протягом двох наступних стабільна та становить в не модифікованій мембрані PC-50 - 90% в мембранах, модифікованих альгінатом- t-Bu та альгінатом-N-oc -98% та 99% відповідно.

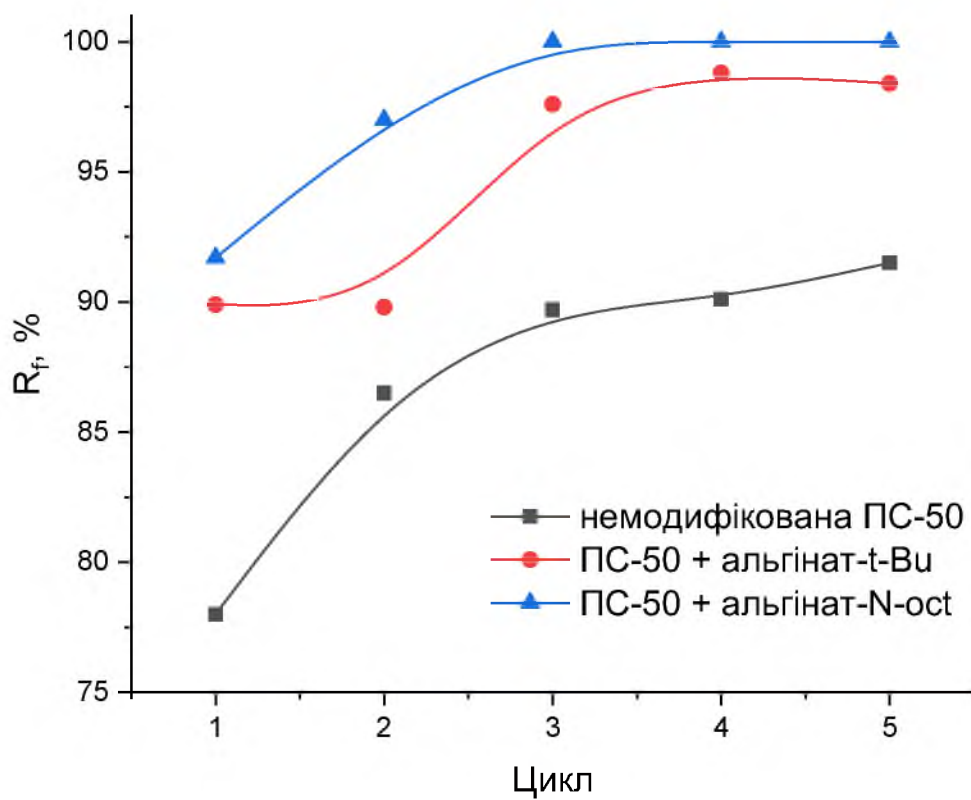


Рис. 3.19. Залежність затримки БСА на мембранах залежно від циклу регенерації

ВИСНОВКИ

1. Синтезовано амфифільні похідні натрій альгінату, модифікованого *трет*-бутиламіном та октан-1-аміном, здатні до утворення полімерних міцел з розмірами як $55,7 \pm 9,0$ нм і 125 ± 20 нм, відповідно.

2. Модифіковано поліетерсульфонові мембрани протеазою, інкорпорованою у полімерні міцели на основі модифікованого натрій альгінату, та досліджено їхні транспортні властивості:

- t-Bu-альгінат+протеаза: $L_p = 6,00 \cdot 10^{-10} \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{с} \cdot \text{Па})$, $R_m = 1,7 \cdot 10^{12} \text{ 1/м}$;

- N-окт-альгінат+протеаза: $L_p = 5,94 \cdot 10^{-10} \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{с} \cdot \text{Па})$, $R_m = 1,7 \cdot 10^{12} \text{ 1/м}$.

3. Встановлено, що мембрани, модифіковані протеазою, інкорпорованою у полімерні міцели на основі модифікованого натрій альгінату, характеризуються антизабруднювальними властивостями у процесі ультрафільтрації БСА. Гідродинамічний опір шару білка на поверхні мембрани знижується у 2 рази порівняно з немодифікованою мембраною і становить при модифікація трет-бутиламіном $0,8 \cdot 10^{12}$, $1,3 \cdot 10^{12}$ і $1,8 \cdot 10^{12} \text{ 1/м}$, октан-1-аміном $1,8 \cdot 10^{12}$, $2,4 \cdot 10^{12}$ і $3,8 \cdot 10^{12} \text{ 1/м}$ при ультрафільтрації БСА з концентрацією 0,05, 0,10 і 0,50 %, відповідно.

4. Показано, що мембрани, модифіковані протеазою у полімерних міцелах, витримують 5 циклів регенерації 70 % розчином етанолу зі зниженням продуктивність на 20 %.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Yu-ke Cen . Immobilization of enzymes in/on membranes and their applications Yu-ke Cen, Yu-Xiao Liu , Ya-Ping Xue, , Yu-Guo Zheng // *Biochemical Engineering Journal*. —2019. —Vol. 125. —P. 190-195.
2. Trends in Biotechnology / [L. Gardossi, P. B. Poulsen, A. Ballesteros, K. Hult, V. K. Svedas, D. Vasic-Racki, G. Carrea, A. Magnusson, A. Schmid, R. Wohlgemuth and P. J. Halling].— 2010. — Vol. 28.— P. 171–180.
3. Zhang X. H. A integrated process for nitrilase-catalyzed asymmetric hydrolysis and easy biocatalyst recycling by introducing biocompatible biphasic system / X. H. Zhang, Z. Q. Liu, Y. P. Xue, B. Yang, M. Xu, Y. G. Zheng // *Journal. Biocatalysis and Biotransformation*—2016. —Vol. 34. —P. 205-211.
4. Zeuner B. An integrated membrane system for the biocatalytic production of 3'-sialyllactose from dairy by-products / B. Zeuner, J. Q. Luo, C. Nyffenegger, V. Aumala, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer // *Enzyme and Microbial Technology*—2014. —Vol. 55, 85-93.
6. Mou P. Chemistry and fabrication of polymeric nanofiltration membranes / Mou P., Jons S.D. // *Polymer* – 2016. – V.103. – P.417–456.
7. S. T. Morthensen, A. S. Meyer, H. Jorgensen, M. Pinelo, *Biochemical Engineering Journal*. —2017. —Vol. 117. —P. 41-47.
8. Zdarta, A. S. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility / Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo // *Advances in Colloid and Interface Science* —2018. —Vol. 258 .P. 1-20.
9. Xue Y. P. A Novel Integrated Bioprocess for Efficient Production of (R)-(-)-Mandelic Acid with Immobilized *Alcaligenes faecalis* ZJUTB10 / Y. P. Xue, M. Xu, H. S. Chen, Z. Q. Liu, Y. J. Wang, Y. G. Zheng, // *Organic Process Research & Development* . —2013. —Vol. 17. —P. 213-220.

10. Dong J. L. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies / J. L. Dong, W. J. Ning, W. J. Liu // *Bruening, Analyst*—2017. —Vol. 142. —P. 2578-2586.

11. Hou, G. Enzymatic degradation of bisphenol-A with immobilized laccase on TiO₂ sol-gel coated PVDF membrane / Hou, G. Dong, Y. Ye, V. Chen // *Journal of Membrane Science*—2014. —Vol. 452. — P. 229-240.

12. Luo J. Q. Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO₂ to methanol / J. Q. Luo, A. S. Meyer, G. Jonsson, M. Pinelo // *Biochemical Engineering Journal*. —2015.—Vol. 83. —P. 79-89.

13. Jochems P. Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs) / P. Jochems, Y. Satyawali, L. Diels, W. Dejonghe // *Green Chemistry*—2011. —Vol. 13. — 1609-1623.

14. Zdarta J. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility / A. S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, // *The Journal of Colloid and Interface Science*—2018, — Vol. 258. — P.1-20

15. Chao C. Surface modification of halloysite nanotubes with dopamine for enzyme immobilization / C. Chao, J. Liu, J. Wang, Y. Zhang, B. Zhang, , X. Xiang, R. Chen // *ACS Applied Materials & Interfaces Forums*. —2013. —Vol. 5. — P. 10559-10564.

16. Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid proteins pharmaceuticals / W. Wang // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1999. – Vol. 185. – P. 129-188.

17. . Kamal H. Controlling of degradation effects in radiation processing of starch / H. Kamal, G. M. Sabry, S. Lotfy, N. M. Abdallah, J. Rosiak, E. S. A. Hegazy // *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*—2008.—Vol. 45. —P. 65-75.

18. Tyagi C. Surface modification of cellulose filter paper by glycidyl methacrylate grafting for biomolecule immobilization: Influence of grafting parameters and urease immobilization / C. Tyagi, L. K. Tomar, H. Singh // *Journal of Applied Polymer Science*—2010. —Vol. 111. — P. 1381-1390.

19. Regenhardt S. A. Hydrolysis of lactose from cheese whey using a reactor with β -galactosidase enzyme immobilised on a commercial UF membrane / S. A. Regenhardt, E. J. Mammarella, A. C. Rubiolo // *Chemical and Process Engineering*.—2013. —Vol. 34. — P. 375-385.

20. Machsun A. L. Membrane microreactor in biocatalytic transesterification of triolein for biodiesel production / A. L. Machsun, M. Gozan, M. Nasikin, S. Setyahadi, Y. J. Yoo, // *Biotechnology and Bioprocess Engineering* —2010. —Vol. 15, —P. 911-916.

21. Chen T. Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties / T. Chen, G. Kumar, M.T. Harris, P.J. Smith, G.F. Payne // *Journal Biotechnology & Bioengineering* .— 2000. — Vol. 70.— P. 564–573.

22. Nigiz F. U. Simultaneous separation performance of a catalytic membrane reactor for ethyl lactate production by using boric acid coated carboxymethyl cellulose membrane / F. U. Nigiz, N. D. Hilmioglu // *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*— 2016.—Vol. 30. — P. 381-391.

23. Ranieri G. Use of a ceramic membrane to improve the performance of two-separate-phase biocatalytic membrane reactor / G. Ranieri, R. Mazzei, Z. T. Wu, K. Li, L. Giorno // *Molecules* — 2016.—Vol. 21. — P. 14.

24. Nguyen L. T. Continuous hydrolysis of carboxymethyl cellulose with cellulase aggregates trapped inside membranes / L. T. Nguyen, K. R. S. Neo, K.-L. Yang // *Enzyme and Microbial Technology*. —2015. —Vol. 78. — P. 34-39.

25. Malik N.N. Drug discovery: past, present and future / N.N. Malik // *Drug Discovery Today*. – 2008. – Vol. 13. – P. 909-912.

26. Taraboulsi FA Jr. Multienzymatic sucrose conversion into fructose and gluconic acid through fed-batch and membrane-continuous processes. / Taraboulsi

FA Jr, E. J. Tomotani, M. Vitolo // *Enzyme and Microbial Technology*— 2007. — Vol. 40. — P. 1020-1025.

27. Cao X. T. Mussel-inspired co-deposition to enhance bisphenol A removal in a bifacial enzymatic membrane reactor / X. T. Cao, J. Q. Luo, J. M. Woodley, Y. H. Wan // *Chemical Engineering Journal* — 2018. — Vol. 336. — P. 315-324.

28. M. de Cazes Design and optimization of an enzymatic membrane reactor for tetracycline degradation M. de Cazes, M. P. Belleville, E. Petit, M. Llorca, S. Rodríguez-Mozaz, J. de Gunzburg, D. Barceló, J. Sanchez-Marcano // *Catal. Today* — 2014. — Vol. 236. 146-152.

29. Mei D, Preparation of capric acid/halloysite nanotube composite as form-stable phase change material for thermal energy storage D Mei, B Zhang, R Liu, Y Zhang, J Liu/ *Solar Energy Materials and Solar Cells* — 2011. — Vol. 95(10). — P. 2772-2777.

30. Zhao Z. Y. Highly stable enzymatic membrane for fast treatment of antibiotic-polluted water / Z. Y. Zhao, Y. Feng, E. Shamsaei, J. C. Song, H. T. Wang, L. Z. He // *Journal of Membrane Science* — 2016. — Vol. 518. — P. 1-9.

31. Kaliyaperumal A. Immunogenicity assessment of therapeutic proteins and peptides / A. Kaliyaperumal, S. Jing // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. — 2009. — Vol. 10, № 4. — P. 352-358.

32. Pouliot Y. Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes / Y. Pouliot, S.F. Gauthier and C. Bard // *The Journal of Membrane Science*. — 1993. — Vol. 80.— P. 257–264.

33. Dong J. L. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies J. L. Dong, W. J. Ning, W. J. Liu, M. L. Bruening, *Analyst* —2017.—Vol. 142. — P. 2578-2586.

34. D. M. F. Prazeres Enzymatic membrane bioreactors and their applications / D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral // *Enzymatic Membrane Bioreactors and Their Applications*. — 1994. — Vol. 16. — P. 738-750.

35. Hoq M. M. Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview / M. M. Hoq, T. Yamane, S. Shimizu, T. Funada, S. Ishida // *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* —1986. — Vol. 49. — P. 3171-3178.

36. Belhocine D. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor / D. Belhocine, H. Mokrane, H. Grib, H. Lounici, A. Pauss and N. Mameri, // *The Chemical Engineering Journal*.— 2000.— P. 189–196

37. Kaliyaperumal A. Immunogenicity assessment of therapeutic proteins and peptides / A. Kaliyaperumal, S. Jing // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2009. – Vol. 10, № 4. – P. 352-358.

38. Machsun A. L. Membrane microreactor in biocatalytic transesterification of triolein for biodiesel production A. L. Machsun, M. Gozan, M. Nasikin, S. Setyahadi, Y. J. Yoo, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*—2010. —Vol. 15. — P. 911-916.

39. Balcão V.M. Bioreactors with immobilized lipase state / V.M. Balcão, A.L. Pavia and F.X. Malcata // *Enzyme and Microbial Technology*. —1996. — Vol.18.— P. 392–416.

40. Ranieri G. Use of a ceramic membrane to improve the performance of two-separate-phase biocatalytic membrane reactor / G. Ranieri, R. Mazzei, Z. T. Wu, K. Li, L. Giorno // *Molecules* .—2016.—Vol. 21.— P. 14.

41. Machsun A. L. Membrane microreactor in biocatalytic transesterification of triolein for biodiesel production / A. L. Machsun, M. Gozan, M. Nasikin, S. Setyahadi, Y. J. Yoo, // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.—2010 .—Vol. 15.— P. 911-916.

42. Zhuang P. and D.A. Butterfield, Optimization of covalently coupling enzymes to polymeric membranes: EPR studies of papain / *The Journal of Applied Polymer Science*.— 1993.— P. 1329–1338.

43. Werle M. Oral protein delivery: a patent review of academic and industrial approaches / M. Werle, A. Makhlof, H. Takeuchi // *Recent Patents on Drug Delivery*. – 2009. – Vol. 38. – P. 94-104.
44. Jain N.K. Advances in controlled and novel drug delivery / N.K. Jain // Cbs publisher and distributors, 2008. – P. 86-90.
45. Mustranta A., Use of lipase in the resolution of racemic ibuprofen. *Applied Microbiology and Biotechnology*.— 1992. — Vol.38.— P. 175–180.
46. Nori M.P. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation / M.P. Nori, C.S. Favaro-Trindade, S. Matias de Alencar // *LWT-Food Science Technology*. – 2011. – Vol. 44. – P. 429–435.
47. Zou G.L. Preparation and characterization of microcapsulated hexadecane used for thermal energy storage / G.L. Zou, Z.C. Tan, X.Z. Lan // *Chinese Chemical Letters*. – 2004. – Vol. 15. – P. 729-732.
48. Aryee N. A. Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours / N. A. Aryee, B. K. Simpson, R. I. Cue, L. E. Phillip // *Food Research International* — 2011.—Vol. 35. — P. 4149-4157.
49. Lisboa P. Poly (vinyl alcohol)/chitosan asymmetrical membranes: Highly controlled morphology toward the ideal wound dressing / P. Lisboa, A. R. Rodrigues, J. L. Martin, P. Simoes, S. Barreiros, A. Paiva // *Journal of membrane science* — 2014.—Vol. 85.— P. 31-40.
50. Giorno L. Lipase-catalyzed optical resolution of racemic naproxen in biphasic enzyme membrane reactors / L. Giorno, E. Drioli, G. Carvoli, A. Cassano, L. Donato, // *Journal of Membrane Science* — 2001.—Vol. 72. — P. 77-84.
51. Algieri C. Biocatalytic zeolite membrane for the production of L-DOPA / C. Algieri, L. Donato, P. Bonacci, L. // *Journal of membrane science* — 2012.—Vol. 66. — P. 14-19.
- 52 Yon L. S. Enzymatic Deracemization of (R,S)-Ibuprofen Ester via Lipase-catalyzed Membrane Reactor L. S. Yon, F. N. Gonawan, A. H. Kamaruddin, M. H.

Uzir, Industrial & Engineering Chemistry Research — 2013.—Vol. 52. — P. 9441-9453.

53. P. Ramalingam, Improved oral delivery of resveratrol from N-trimethyl chitosan-g-palmitic acid surface-modified solid lipid nanoparticles/ P. Ramalingam, Y.T. Ko. // Journal Colloids Surfaces B Biointerfaces, — 2016.— Vol. 139.— P. 52-61.

54. Choudhury M.R. Fouling and wetting in the membrane distillation driven wastewater reclamation process / Choudhury M.R., Anwar N., Jassby D. // Advances in Colloid and Interface Science .— 2019 .—Vol. 269. – P.370–399.

55. Warsinger D.M. A review of polymeric membranes and processes for potable water reuse / Warsinger D.M., Chakraborty S., Tow E.W., Jassby D. // Progress in Polymer Science – 2018. —Vol. 81. – P. 209–23

56. Mou P. Chemistry and fabrication of polymeric nanofiltration membranes / Mou P., Jons S.D. // Polymer – 2016.—Vol.103. – P.417–456.

57. Zhao C. Modification of polyethersulfone membranes – a review of methods / Zhao C, Xue J, Ran F, // Journal Progress in Materials Science — 2013.—Vol. 58.— P. 76–150.

58. Johnson RN. Poly (aryl ethers) by nucleophilic aromatic substitution. I. Synthesis and properties / Johnson R.N, Farnham A.G, Clendinning R.A. // Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. — 1967 .—Vol. 5. — P. 2375–2398

59. Rahimpour A. Synthesis of a novel poly (amide-imide)(PAI) and preparation and characterization of PAI blended polyethersulfone (PES) membranes. / Rahimpour A, Madaeni SS, Mehdipour-Ataei S. //Journal of Membrane Science— 2008.—Vol. 311— P. 349–359.

60. Kim E. Spontaneous current of polyethersulfone investigated through the measurements of space charge distribution by the pulsed electroacoustic method and thermally stimulated current/ Kim E, Takeda T, Ohki Y // IEEE Transactions on Fundamentals and Materials— 1995.—Vol. 115. — P. 437–444.

61. Ahmad AL. Recent development in additives modifications of polyethersulfone membrane for flux enhancement. / Ahmad AL, Abdulkarim AA, Ooi BS. // *Chemical Engineering Journal* — 2013.—Vol. 223. — P. 246–267.
62. Rana D. Surface modifications for antifouling membranes / Rana D, Matsuura T. // *Chemistry. Review*— 2010.—Vol. 110.— P. 2448–2471.
63. Guan R. Polyethersulfone sulfonated by chlorosulfonic acid and its membrane characteristics. / Guan R, Zou H, Lu D. // *European Polymer Journal*— 2005.—Vol. 41.— P. 1554–1560.
64. Van der Bruggen B. Chemical modification of polyethersulfone nanofiltration membranes: a review. / Van der Bruggen B. // *Journal of Applied Polymer Science*. — 2009.—Vol. 114.— P. 630–642.
65. Vatanpour V. Fabrication and characterization of novel antifouling nanofiltration membrane prepared from oxidized multiwalled carbon nanotube/polyethersulfone nanocomposite. / Vatanpour V, Madaeni SS, Moradian R. // *Journal of Membrane Science*— 2011.—Vol. 375.— P. 284–294.
66. Orooji Y. Nanostructured mesoporous carbon polyethersulfone composite ultrafiltration membrane with significantly low protein adsorption and bacterial adhesion. / Orooji Y, Faghieh M, Razmjou A. // *Carbon*. — 2017.—Vol. 111— P. 689–704.
67. Buonomenna MG. New PVDF membranes: the effect of plasma surface modification on retention in nanofiltration of aqueous solution containing organic compounds. / Buonomenna MG, Lopez LC, Favia P. // *Journal Water Research*— P. 2007.—Vol. 41.— P. 4309–4316.
68. Duarte LT. Polyurethane/polyethersulphone composite hollow fibers produced by simultaneous spinning of two polymer solutions. / Duarte LT, Pereira CC, Habert AC. // *Journal of Membrane Science* —2008.—Vol. 311. — P. 12–22.