УДК 541.18 - 577.15

Коновалова В. В., Бурбан А. Ф., Гузикевич К Є, Олійнічук С. Т.

ДОСЛІДЖЕННЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ α-АМІЛАЗИ НА ЦЕЛЮЛОЗНИХ УЛЬТРАФІЛЬТРАЦІЙНИХ МЕМБРАНАХ

Досліджено іммобілізацію α-амілази на ультрафільтраційних целюлозних мембранах. Іммобілізацію проводили на окиснених целюлозних мембранах шляхом взаємодії аміногруп ферменту з альдегідними групами мембрани. Показано, що кількість прищепленого до мембрани білка залежить від концентрації модифікуючого розчину та розміру пор мембрани. Найкращими біокаталітичними функціями характеризуються мембрани, модифіковані розчином ферменту з концентрацією 1 мг/мл та Cut off 30000. Досліджено стабільність іммобілізованої а-амілази та встановлено параметри регенерації білка на поверхні модифікованих мембран.

Ключові слова: іммобілізація ферментів, біофункціональні мембрани, а-амілаза, пористість мембран.

Вступ

Новим напрямом мембранних технологій є синергетичне поєднання транспортних властивостей традиційних полімерних мембран та специфічної селективності біологічних мембран, так званих біофункціональних мембран. Такі мембрани використовуються в мембранних біореакторах, при розділенні компонентів розчинів (афінні мембрани) та як біосенсори [1-3].

Іммобілізація ферментів на поверхні полімерної плівки є загальновідомим методом створення біокаталітичних мембран [3–4]. Мембрана в такому випадку виконує як розділювальну функцію, так і є носієм для біокаталізатора. Дані літератури свідчать про явні переваги іммобілізованих біокаталізаторів над вільними [5]. Іммобілізовані ферменти мають властивості гетерогенних каталізаторів, їх можна легко відокремити від субстрату або реакційної суміші, в результаті чого створюється можливість їх багаторазового використання та отримання продукту, не забрудненого ферментом. Крім того, в іммобілізованому стані ферменти є стійкішими до дії зовнішніх факторів, температури, pH середовища тощо. Іммобілізацію ферментів на полімерних мембранах проводять як фізичними (адсорбція, включення в матрицю), так і хімічними методами. Системи з іммобілізованими ферментами, отримані хімічними методами, мають щонайменше дві переваги [6]. По-перше, ковалентний зв'язок ферменту з носієм забезпечує високу міцність утвореного кон'югату. По-друге, шляхом багатоточкового ковалентного закріплення білкової структури вдається досягти найбільших ефектів стабілізації ферментів. Зважаючи на значне різноманіття мембран, значний інтерес становить дослідження впливу поверхневої морфології мембран на ефективність їхнього хімічного модифікування.

Метою цієї роботи є дослідження іммобілізації α-амілази на целюлозних мембранах із різним розміром пор та вивчення їхніх біокаталітичних властивостей.

Іммобілізацію α-амілази проводять рідше, ніж інші ферменти, зважаючи на те, що вона каталізує гідроліз крохмалю до макромолекул декстринів, і іммобілізація зазвичай спричинює зниження швидкості реакції за рахунок низького коефіцієнта дифузії субстрату [7]. У випадку ж іммобілізації α-амілази на поверхні полімерних напівпроникних мембран можна значно знизити дифузійні обмеження при підведенні субстрату за допомогою конвективного потоку.

Матеріали і методи досліджень

Реактиви та матеріали

Для дослідження процесу модифікування поверхні було використано целюлозні мембрани марок С005, С010, С030, С100 (Виробництво Nadir, Німеччина), перйодат натрію $NaJO_4$ (Sigma), а-амілаза from Bacillus subtilis (Fluka) з молекулярною масою 50 000 та ферментативною активністю 58 U/мг.

Для визначення розділювальних характеристик мембран використовували стандартну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8200, площа робочої поверхні мембрани - 28,7 см2 (виробництво Millipore, США).

© *Коновалова В. В., Бурбан А. Ф., Гузикевич К. Є., Олійнічук С. Т.,* 2007

Методика іммобілізації ферменту

Для прищеплення α-амілази до поверхні целюлозних промислових мембран їх окиснювали до діальдегід целюлози 0,1 М розчином $NaJO_4$ протягом 1 год за температури 55 °С. Окиснені мембрани витримували в розчині α-амілази з pH = 8,3 та концентрацією від 0,1 до 1 мг/мл при кімнатній температурі. Час модифікування 2 год. pH розчину модифікування не змінювали, оскільки реакція між альдегідними групами окисленої мембрани та амінними групами ферменту з утворенням основ Шиффа найкраще проходить при pH > 8.

Після модифікування мембрани відмивали в дистильованій воді протягом години.

Методика деіммобілізації ферменту

Модифіковані мембрани струшували за допомогою шейкера в розчині соляної кислоти при pH = 2 протягом години, після чого відмивали в дистильованій воді.

Аналітичні методи

Концентрацію комплексу крохмаль-йод визначали фотоколориметрично при довжині хвилі 650 нм. Ступінь конверсії крохмалю розраховували як

$$\alpha = \frac{C_0 \cdot V_0 - C_k \cdot V_k}{C_0 \cdot V_0},$$

де C_0, V_0 – концентрація та об'єм речовини у початковому розчині, C_k, V_k – концентрація та об'єм речовини у концентраті.

Концентрацію α-амілази визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм.

Концентрацію білка, іммобілізованого на мембрані, визначали двома способами:

1) за різницею концентрацій модифікуючого розчину до та після іммобілізації;

2) за концентрацією білка в розчині після деіммобілізації.

Результати та їх обговорення

1. Визначення параметрів модифікування целюлозних мембран а-амілазою.

Для іммобілізації ферментів на мембранах використовуються різноманітні методи, та зазвичай кількість іммобілізованого ферменту визначають як масовий баланс розчину до та після модифікування. Біокаталітична активність мембран, модифікованих ферментами, буде тим вища, чим більшу кількість білка буде закріплено на поверхні мембрани. Як видно з рис. 1, кількість білка, іммобілізованого на одиницю площі мембрани, залежить від початкової концентрації а-амілази в розчині модифікування. Зі збільшенням концентрації α-амілази від 0,1 до 0,4 мг/мл кількість прищепленого ферменту збільшується несуттєво - від 0,08 до 0,022 мг/см^2. Суттєве зростання кількості ферменту, іммобілізованого на мембрані, до 0,092-0,1 мг/см^2 спостерігається для концентрації модифікуючого розчину 0,08-1,0 мг/мл. За подальшого збільшення концентрації α-амілази до 2 мг/мл кіль-

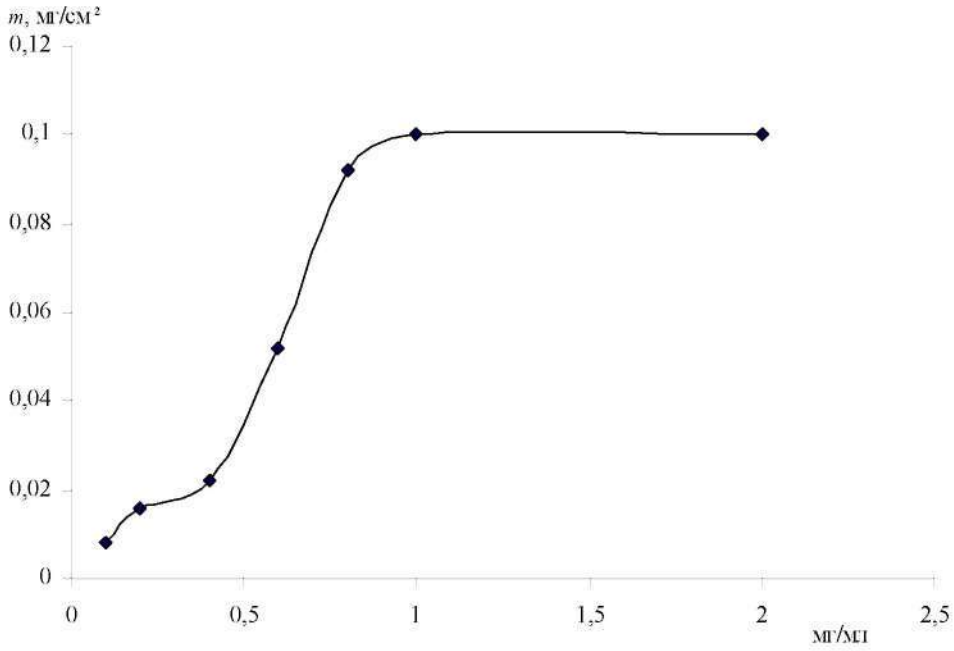

Рис. 1. Залежність кількості білка, іммобілізованого на мембрані С005 F, від початкової концентрації розчину модифікування

кість прищепленого на мембрані білка не змінюється. Отже, для модифікування мембрани С005 F оптимальною концентрацією модифікуючого розчину є концентрація а-амілази 1 мг/мл.

2. Дослідження стабільності α-амілази, іммобілізованої на целюлозних ультрафільтраційних мембранах.

Основним фактором, що обумовлює економічність біотехнологічних процесів із використанням біокаталізаторів, є їх стабільність і, як наслідок, кількість їх витрат на виробництво одиниці маси продукту. Основною перевагою іммобілізованих ферментів над вільними є їх вища стабільність. Стандартна вільна енергія нативної конформації за звичайних умов лише на 20-40 кДж/моль менше від денатурованої форми [8]. Тому навіть незначних відхилень зовнішніх умов від оточення ферменту в клітині достатньо для їх інактивації.

Стабільність іммобілізованого ферменту вивчали шляхом ультрафільтрації розчину крохмалю з концентрацією 1 г/дм^3 через біокаталітичну мембрану, після чого досліджували ступінь конверсії крохмалю (а). Каталітична активність α-амілази полягає у розчепленні глікозидних зв'язків крохмалю. Тому ступінь конверсії крохмалю розраховували як кількість гідролізованого крохмалю до його початкової кількості.

Як видно з рис. 2, початкова ступінь конверсії крохмалю для мембрани С005 F з іммобілізованою α-амілазою становить 33 % і залишається незмінною протягом тривалого часу. Зменшення активності ферменту на 50 % від початкової активності спостерігається після відбору 1500 мл пермеату. Зменшення каталітичної активності може бути спричинено зміною конформації молекули, що призводить до порушення структури його активного центру а також перекриття до нього доступу субстрату.

3. Установлення параметрів регенерації целюлозних мембран з іммобілізованою а-амілазою.

Системи з іммобілізованими ферментами мають досить високу вартість, а тому загальною проблемою є необхідність їх багаторазового використання. Основним компонентом цієї системи є мембрана, експлуатаційний термін роботи якої в багато разів перевищує тривалість роботи біокаталізатора. Тому методи іммобілізації ферментів на мембранах мають враховувати і способи їх регенерації після зниження або втрати біокаталітичної активності.

Характерною особливістю азометинових зв'язків є те, що вони легко руйнуються в кислому середовищі з регенерацією вихідних сполук реакції.

Так, целюлозні мембрани з іммобілізованою α-амілазою регенерували в розчині соляної кислоти (pH = 2), після чого регенеровані мембрани інкубували в модифікованому розчині білка. Каталітичну активність мембран визначали після кожного етапу регенерації. Результати проведених досліджень показують (рис. 3), що ступінь конверсії крохмалю на мембрані поступово змен-

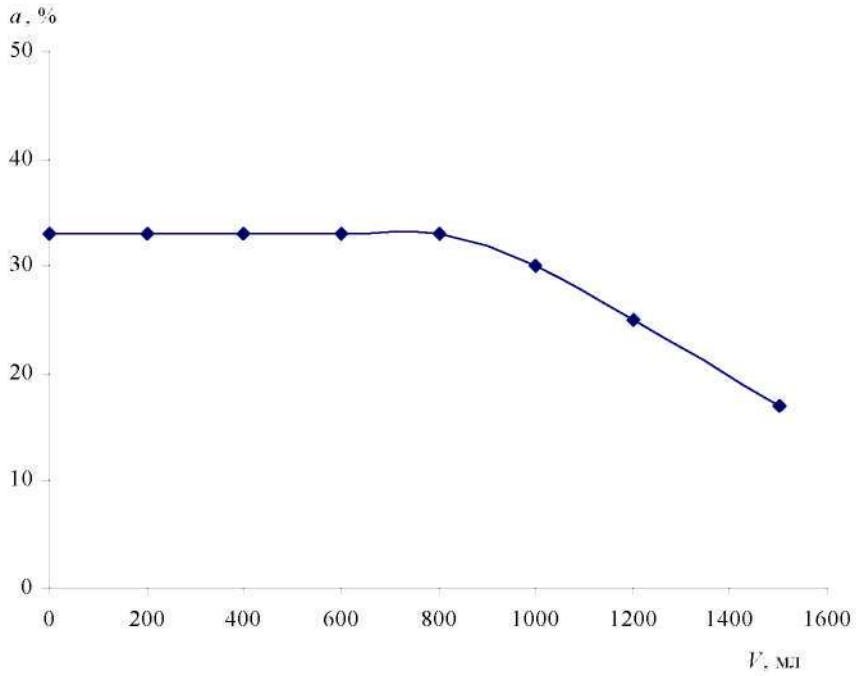

Рис. 2. Залежність ступеня конверсії крохмалю від об'єму субстрату, пропущеного крізь мембрану С005 F з іммобілізованою α-амілазою (ΔP = 0,1 МПа)

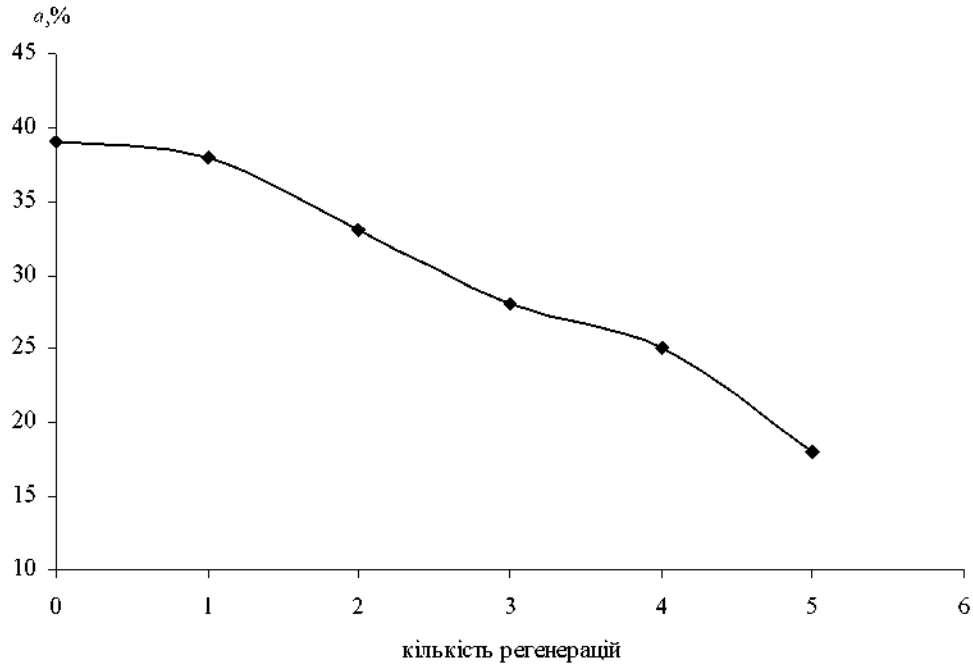

Рис. 3. Залежність ступеню конверсії крохмалю на мембрані С005 F з іммобілізованою α-амілазою від кількості регенерацій мембрани (ΔP = 0,1 МПа)

шується після кожної наступної регенерації. 50-відсоткова втрата початкової біокаталітичної активності (з 33 % до 7 %) спостерігається після п'ятиразового регенерування.

4. Вплив Cut off модифікованих мембран на їхні біокаталітичні властивості.

Морфологічна структура мембран має суттєве значення для іммобілізації ферментів. Нами досліджено процес іммобілізації білка на поверхні модифікованих та немодифікованих вузькопористих та широкопористих мембран із різною відсікаючою здатністю (*Cut off)* за молекулярною масою. Як видно з рис. 4, кількість білка, адсорбованого на поверхні немодифікованих мембран, дещо збільшується при використанні мембран із меншим розміром пор. Цей факт можна пояснити тим, що зменшення розміру пор призводить до збільшення їх питомої поверхні й відповідно до зростання кількості адсорбованого ферменту. Целюлозні мембрани характери-

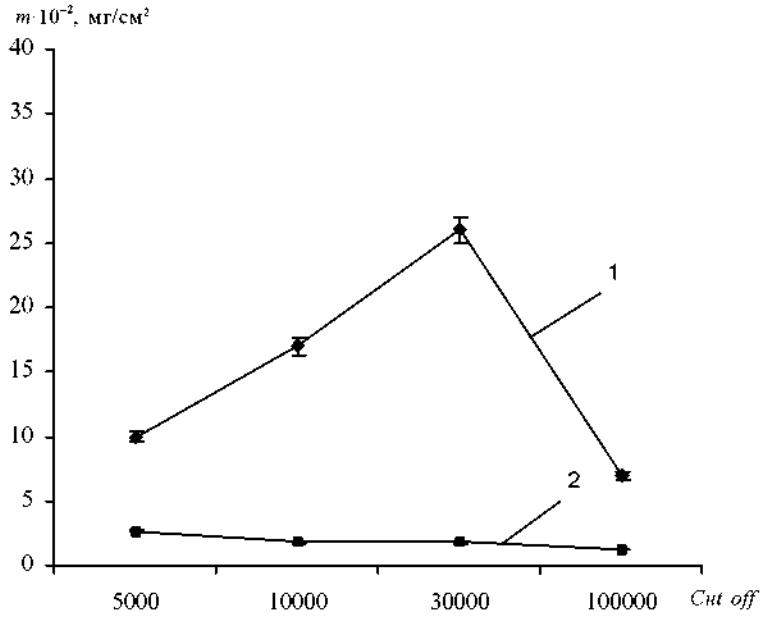

Рис. 4. Залежність кількості білка, іммобілізованого на модифікованій (1) та немодифікованій (2) мембранах від розміру пор мембрани (C_0 = 1мг/мл)

зуються неспецифічною сорбцією білка [4], тому його кількість на немодифікованій мембрані не перевищує 0,02 мг/см^2. Кількість білка, іммобілізованого на поверхні активованих мембран, є значно більшою. Мінімальна кількість ковалентно закріпленого білка становить 7 мг/см2 для найбільш широкопористої мембрани С100. При переході до мембрани із середнім розміром пор спостерігається різке збільшення кількості іммобілізованого ферменту. Але для тонкопористих мембран зменшення *Cut off* призводить до зниження кількості іммобілізованого ферменту.

Зважаючи на подібність систем для модифікування целюлозних та ацетатцелюлозних мембран [8], можна припустити, що окиснення тонкопористих мембран призводить до зниження сумарного об'єму пор та їх питомої поверхні. Крім того, для мембран, отриманих тим самим методом зменшення розміру пор, що зазвичай оцінюється величиною об'ємного потоку, супроводжується і зменшенням загальної пористості мембрани. Як видно з таблиці 1, водопроникність води через тонкопористі мембрани С005 та С010 після окиснення знижується на 40 та 34 % відповідно. Продуктивність же широкопористих мембран змінюється несуттєво.

Таблиця 1. **Вплив модифікування на водопроникність мембран (*ΔP* = 100 кПА)**

Мембрана	*Jw*, л/м^{2}год		
	Початкова	Після окиснення	Після іммобілізації
С005	28,5	16,9	16,1
С010	37,6	24,6	23,7
С030	298,6	348,3	321,5
С100	347,2	375,4	348,3

Таким чином, активовані мембрани з середнім розміром пор характеризуються оптимальною морфологічною структурою для іммобілізації ферменту. Біокаталітична активність, а саме ступінь конверсії крохмалю, для них становила 58%.

Висновки

Підібрано оптимальні параметри іммобілізації α-амілази на ультрафільтраційних целюлозних мембранах шляхом ковалентного зв'язування аміногруп ферменту з альдегідними групами окисленої целюлози. Окислення мембран значно підвищує їх сорбційну ємність до білка. Показано, що кількість прищепленого до мембрани білка зростає при збільшенні концентрації модифікуючого розчину. Оптимальною концентрацією розчину модифікування є розчин ферменту 1 мг/мл.

Досліджено залежність іммобілізації а-амілази від морфологічної структури мембран. Установлено, що найкращою біокаталітичною активністю, а саме ступенем конверсії крохмалю 58%, характеризуються модифіковані мембрани з середнім розміром пор та *Cut off* 30000.

Досліджено стабільність іммобілізованої α-амілази та встановлено параметри регенерації білка на поверхні модифікованих мембран.

1. *Butterfield D., Bhattacharyya D., Daunert S., Bachas L.* Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: a review // Journal of Membrane Sci.- 2001.- V. 181.- P. 29-37.
2. *Giorno L., Drioli E.* Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives // TIBTECH.- 2000.- Vol. 18.- P. 339-349.
3. *Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D., Sanchez J.* Progress in enzymatic membrane reactors - a review // J. of Membr. Sci.- 2004.- V. 242.- P. 189-196.
4. *Bora U., Kannan K., Nahara P.* A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules // J. of Membr. Sci.- 2005.- V. 250.- P. 215-222.
5. Linqiu Cao Immobilised enzymes: science or art? // Biocatalysis and biotransformation. Current Opinion in Chemical Biology.- 2005.- V. 9.- P. 217-226.
6. *Березин И. В.* Иммобилизованные ферменты.- М.: Высшая школа, 1987.- 159 с.
7. *Bayramoglu G., Yilmaz M., Arica M.* Immobilization of a thermostable α-amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis // Food Chemistry.- 2004.- V. 84.- P. 591-599.
8. *Брык М. Т., Нигматуллин Р. Р., Атаманенко И. Д. и др.* Пористая структура ультрафильтрационных ацетатцелюлозных мембран различной степени омыления // Высокомолекулярные соединения (А).- 1990.- Т. 32, № 7.- С. 1473-1481.

V. Konovalova, A. Burban, K. Guzykevych, S. Oliynichuk

STUDY OF a-AMILASE IMMOBILIZATION ON CELLULOSE ULTRAFILTRATION MEMBRANE

Immobilization ofa-amilase on cellulose ultrafiltration membrane has been studied. Immobilization was carry out on oxidized cellulose membrane by interaction of enzyme amino groups and aldehyde groups of membrane. It has been shown that amount of attached to membrane protein depend on modifying solution concentration and membrane pore size. The optimal condition for membrane modification was concentration of modifying enzyme solution 1 mg/ml and membrane Cut off 30000. Stabilization of immobilized a-amilase and membrane regeneration parameters has been studied.

Key words: enzyme immobilization, biofunctional membranes, α-amilase, membrane porosity.