

ІММОБІЛІЗАЦІЯ α -АМІЛАЗИ НА ПОЛІЕТАРСУЛЬФОНОВИХ МЕМБРАНАХ МЕТОДОМ «LAYER BY LAYER» (LBL)

Досліджено іммобілізацію α -амілази методом LBL на ультрафільтраційних поліетерсульфонових мембранах. Визначено, що кількість іммобілізованого на мембрані ферменту залежить від рН і концентрації розчину модифікування. Встановлено оптимальні умови проведення іммобілізації. Досліджено біокаталітичні властивості модифікованих мембран. Визначено, що активність іммобілізованого ферменту залежить від кількості нанесених шарів. Найкращими біокаталітичними властивостями характеризується мембрана з одним поліелектролітним шаром [PSS/ α -амілаза]¹.

Ключові слова: метод «layer by layer», іммобілізація ферментів, біофункціональні мембрани, α -амілаза.

Вступ

Створення біофункціональних мембран є новим напрямком розвитку мембранних технологій. Такі мембрани поєднують у собі транспортні властивості синтетичних мембран та специфічні функції біологічних молекул [1–3]. Біокаталітичні мембрани використовують у багатьох процесах харчової, фармацевтичної промисловості, у медицині [1, 2]. Вони є надзвичайно перспективними матеріалами для розробки екологічно чистих промислових процесів, оскільки ферменти характеризуються надзвичайно високим рівнем специфічності порівняно зі звичайними хімічними каталізаторами, що надає можливість суттєво знизити кількість побічних продуктів, реакції відбуваються за м'яких умов, а транспортні властивості мембрани дають змогу швидко виділяти продукти реакцій [1].

Одним зі шляхів створення біокаталітичних мембран є іммобілізація ферментів на поверхні полімерних мембран. Існують фізичні та хімічні методи іммобілізації ферментів. Адсорбція ферменту на поверхні мембрани — найбільш поширений метод фізичної іммобілізації. На цьому явищі заснований і метод «layer by layer». Цей метод, запропонований Г. Дехером [4], полягає у послідовній електростатичній адсорбції негативно та позитивно заряджених поліелектролітів (рис. 1). До переваг згаданого методу належить простота створення багатшарових плівок — він не потребує спеціальної високочутливої апаратури [4, 5].

Під час контакту розчину поліелектроліту з протилежно зарядженою поверхнею відбувається фізична адсорбція поліелектроліту через електростатичні взаємодії [5, 6]. Полімер міцно прикріплюється у декількох точках взаємодії з поверхнею. При накладанні нового шару поліелектроліту кількість зарядів, що несе на собі

останній, достатньо велика для того, щоб нейтралізувати заряд попередньо нанесеного шару, а також змінити як величину, так і знак ξ -потенціалу поверхні мембрани [7].

До факторів, що впливають на процес формування поліелектролітних шарів, належать: іонна сила розчину поліелектроліту, тривалість адсорбції, температура, рН і концентрація розчину, молекулярна маса поліелектролітів тощо [5]. Велику кількість робіт присвячено іммобілізації ферментів за допомогою методу LBL на різноманітних носіях [5–8]. Іммобілізовані таким методом ферменти часто є більш стабільними, зберігають активність у більшому діапазоні рН і температури [7].

Метою цієї роботи є дослідження процесу іммобілізації α -амілази на поліетерсульфонових мембранах методом LBL та вивчення транспортних і біокаталітичних властивостей модифікованих мембран.

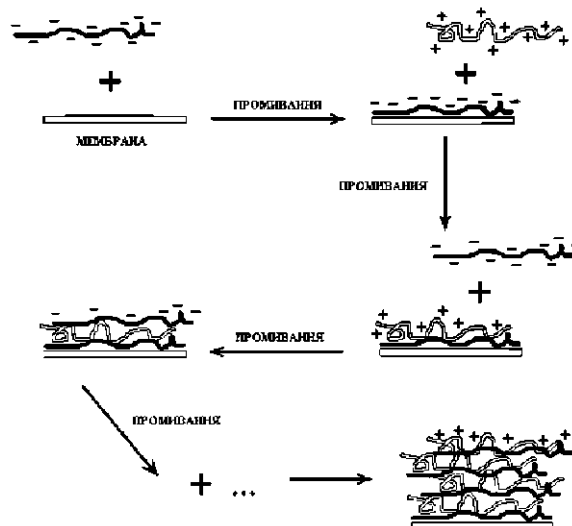


Рис. 1. Схема методу «layer by layer»

Матеріали та методи досліджень

Реактиви та матеріали

У дослідженні було використано поліетерсульфонові мембрани марки UF-PES-050H (виробництво Microdyn-Nadig, Німеччина); α -амілаза з *Bacillus licheniformis* марки Termamyl SC (виробництво Novozymes, Данія) з ферментативною активністю 1000 од/мл; полістиренсульфонат (PSS) з молекулярною масою 70 000 Да (Aldrich); бичачий сироватковий альбумін (BSA) 64 000 Да (Aldrich).

Для визначення роздільних характеристик модифікованих мембран використовували стандартну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8200 (виробництво Millipore, США). Робочий тиск дорівнював 0,1 МПа.

Визначення біокаталітичної активності

Концентрацію крохмалю визначали за концентрацією комплексу крохмаль-йод колориметрично з застосуванням КФК-2.

Біокаталітичні властивості мембрани визначали за ступенем конверсії крохмалю. Ступінь конверсії крохмалю визначали за формулою:

$$\alpha = \frac{C_0V_0 - C_kV_k - C_{п}V_{п}}{C_0V_0} \cdot 100\%,$$

де C_0, V_0 — концентрація та об'єм речовини у початковому розчині, C_k, V_k — концентрація та об'єм речовини у концентраті, $C_{п}, V_{п}$ — концентрація та об'єм речовини у пермеаті.

Методика іммобілізації ферменту

Поліетерсульфонові мембрани попередньо відмивали в дистильованій воді протягом 1 год. Модифікування проводили з боку селективного шару мембрани. Розчин полістиренсульфонату (PSS) з концентрацією 0,02М в 0,5М NaCl наносили на селективний шар мембрани першим та витримували протягом 5 хв. Перед і після нанесення шару α -амілази поверхню мембрани інтенсивно відмивали дистильованою водою. Концентрацію ферменту змінювали від 25 до 1000 од. акт./мл, рН модифікуючого розчину в діапазоні 2–6. Процедуру повторювали до нанесення необхідної кількості шарів.

Результати та їх обговорення

1. Вивчення транспортних властивостей модифікованих мембран

Ферменти — це речовини білкової природи, вони є оліамфолітами. Отже, сумарний заряд молекули ферменту буде залежати від рН середовища. Окрім того, відомо [5], що рН розчину не впливає на заряд полістиренсульфонату і у

зв'язку з цим не впливає на сумарний заряд поверхні, модифікованої ним. Таким чином, рН розчину модифікування головним чином буде впливати на абсорбцію α -амілази.

На рис. 2 показано зміну об'ємного потоку крізь мембрану після нанесення одного шару [PSS/ α -амілаза]¹ при різних значеннях рН розчину модифікування. Так, при збільшенні величини рН розчину α -амілази від 2 до 6 об'ємний потік води крізь мембрану зростає. Найбільша зміна об'ємного потоку крізь модифіковану мембрану (112,14 л/м²·год) порівняно з немодифікованою (206,11 л/м²·год) становить $\Delta J_v = 94$ л/м²·год і спостерігається для мембрани, модифікованої розчином α -амілази з рН = 2, оскільки чим нижчий рН розчину, тим вищий позитивний заряд молекули білка. Однак при такому низькому значенні рН відбувається часткове руйнування його структури.

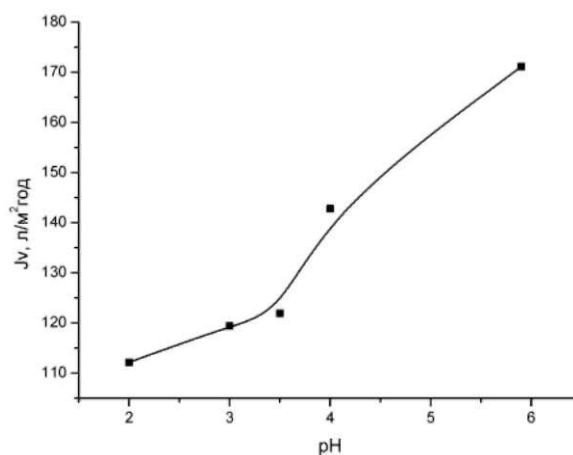


Рис. 2. Залежність об'ємного потоку води через мембрану [PSS/ α -амілаза]¹/PES від рН розчину модифікування

Тому оптимальним значенням рН розчину модифікування для іммобілізації α -амілази було обрано рН = 3-3,5, при якому зміна об'ємного потоку між немодифікованою та модифікованою мембраною ΔJ_v дорівнює близько 85 л/м²·год. При підвищенні рН розчину модифікування вище ізоелектричної точки α -амілази спостерігаються незначні зміни значень об'ємного потоку порівняно зі значенням об'ємного потоку води крізь немодифіковану поліетерсульфонову мембрану (206,11 л/м²·год при $p = 100$ кПа), що свідчить про закріплення на мембрані малої кількості ферменту.

Отримані результати підтверджуються дослідом з іммобілізації BSA, ізоелектрична точка якого знаходиться в межах рН 4,7-4,8 [9]. На рис. 3 зображено зміну об'ємного потоку води через модифіковану мембрану залежно від рН розчину білка. Отримана залежність є аналогічною до попередньої, тобто найбільша кількості

білка іммобілізується при найнижчому значенні рН (рН = 2), а при перевищенні ізоелектричної точки об'ємний потік незначно зменшується порівняно з початковим (206,11 л/м²·год при р = 100кПа). Отримані залежності узгоджуються з результатами робіт [5] і [6], присвячених іммобілізації ферментів методом LBL на немембранних носіях.

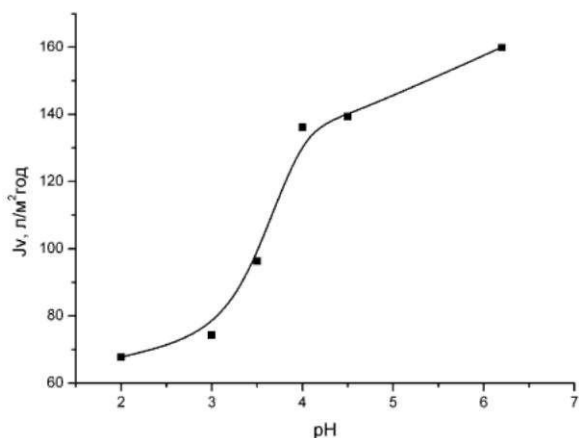


Рис. 3. Залежність об'ємного потоку води крізь мембрану [PSS/BSA]¹/PES від рН розчину модифікування

Кількість іммобілізованого ферменту залежить також і від концентрації модифікуючого розчину, оскільки для повного покриття поверхні мембрани α-амілазою у розчині має міститися достатня кількість молекул.

Як видно з рис. 4, кількість білка, закріпленого на мембрані, залежить від концентрації модифікуючого розчину. Так, при збільшенні активності ферменту від 25 до 50 од. акт./мл потік води через мембрану після модифікування зменшується зі 144 до 122 л/м² год.

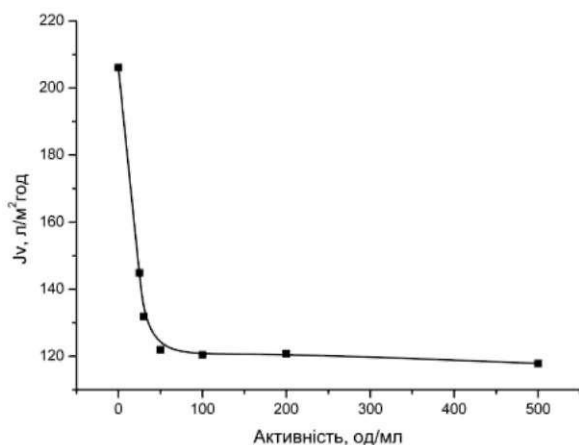


Рис. 4. Залежність об'ємного потоку через мембрану [PSS/α-амілаза]¹/PES від концентрації розчину модифікування

При подальшому зростанні концентрації модифікуючого розчину спостерігаються незначні

зміни об'ємного потоку від 119 до 121 л/м²·год (див. рис. 4), що може свідчити про те, що при збільшенні концентрації вище 50 од. акт./мл на мембрані іммобілізується однакова кількість ферменту. Таким чином, за оптимальну концентрацію модифікуючого розчину α-амілази обрано 50 од. акт./мл.

Логічно припустити, що об'ємний потік води крізь модифіковану мембрану визначається кількістю нанесених шарів [PSS/α-амілаза]ⁿ. Очевидно, що чим більше макромолекул адсорбовано на мембрані, тим менша її водопроникність. Як видно з рис. 5, найбільше падіння водопроникності спостерігається на мембрані з нанесеним першим шаром, оскільки при рН = 3,5 ΔJ_v після нанесення першого шару становить 86,65 л/м²·год, а ΔJ_v після нанесення наступних шарів не перевищує 7 л/м²·год. Експериментальні дослідження засвідчили, що найбільший внесок у падіння об'ємного потоку при формуванні на поверхні мембрани першого поліелектролітного комплексу спричинює адсорбція на поверхні мембрани негативно зарядженого полістиренсульфонату (PSS), що адсорбується на поверхні мембрани за рахунок гідрофобно-гідрофобних взаємодій. Так, для рН = 4, коли адсорбція α-амілази незначна, об'ємний потік знижується з 206,11 до 140 л/м²·год (рис. 5). В основному це відбувається за рахунок нашарування PSS.

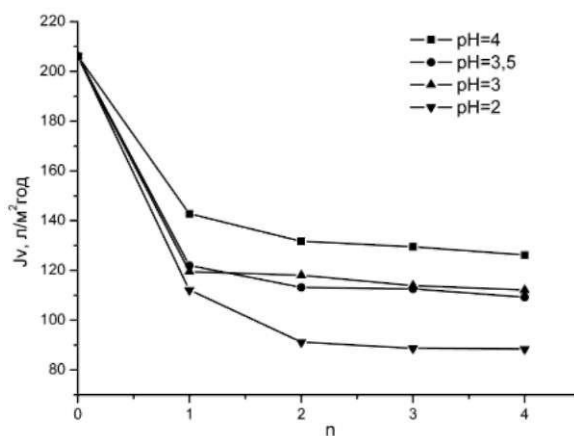


Рис. 5. Зміна об'ємного потоку води через мембрану залежно від кількості поліелектролітних шарів ([PSS/α-амілаза]ⁿ)

При нанесенні другого шару [PSS/α-амілаза] падіння об'ємного потоку є не таким значним порівняно з падінням при нанесенні першого шару. Це відбувається внаслідок того, що під час іммобілізації білкової молекули на мембрані, вже модифікованій шаром PSS, не відбувається зміни заряду поверхні на протилежний, оскільки наявності порівняно невеликої кількості позитивно заряджених аміногруп у ланцюзі молеку-

ли білка недостатньо для зміни знака заряду поверхні мембрани.

Як показано в роботах [7] і [10], під час адсорбції білкової молекули на негативно заряджену поверхню відбувається лише невелике підвищення ζ -потенціалу поверхні, тоді як при адсорбції позитивно заряджених поліелектролітів (поліаліламінігдихлорид, полідіалілдиметиламонію хлорид) відбувається зміна знака ζ -потенціалу. Отже, під час нанесення наступного шару PSS він практично не адсорбується на негативно зарядженій поверхні мембрани.

При подальшому збільшенні кількості поліелектролітних шарів падіння продуктивності модифікованої мембрани майже не відбувається. А отже, кількість білка, іммобілізованого у верхньому шарі мембрани, зменшується з додаванням кожного наступного поліелектролітного шару.

2. Вивчення біокаталітичних властивостей модифікованих мембран

Ферментативна активність α -амілази полягає в розщепленні глікозидних зв'язків крохмалю [11]. Тому біокаталітичні властивості мембран з іммобілізованою α -амілазою вивчали за ступенем конверсії крохмалю під час ультрафільтрації останнього через модифіковану мембрану.

При іммобілізації ферментів методом LBL важливо дослідити: визначатиметься біокаталітична активність мембрани загальною кількістю поліелектролітних шарів, нанесених на мембрану, чи тільки кількістю ферменту, іммобілізованого у верхньому шарі мембрани. Якщо припустити, що біокаталітична активність мембрани буде тим вища, чим більшу кількість ферменту буде закріплено на мембрані, то, вочевидь, біокаталітична активність мембрани зростатиме зі збільшенням кількості поліелектролітних шарів, нанесених на мембрану, оскільки загальна кількість іммобілізованого білка буде підвищуватися.

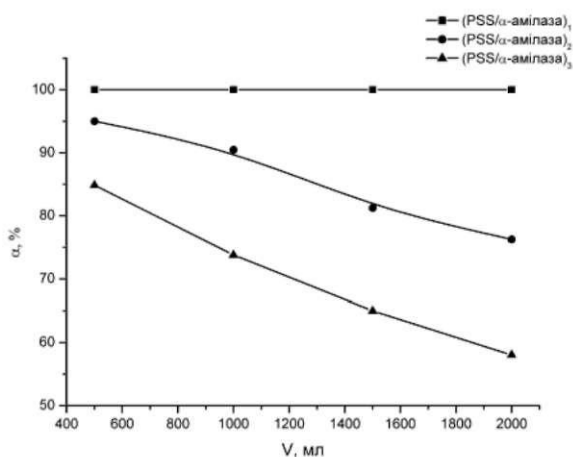


Рис. 6. Залежність ступеня конверсії крохмалю від кількості поліелектролітних шарів [PSS/α-амілаза]

Як видно з рис. 6, ступінь конверсії крохмалю на мембрані, вкритій одним поліелектролітним шаром [PSS/α-амілаза]¹, становить 100 %. При нанесенні [PSS/α-амілаза]² спостерігається падіння ступеня конверсії на 20 %. А при нанесенні третього шару початковий ступінь конверсії крохмалю становить 85 %, яка в процесі фільтрування падає до 60 %.

Таким чином, біокаталітична активність мембран у даному випадку визначається не кількістю поліелектролітних шарів, а кількістю ферменту, закріпленого у верхньому шарі мембрани. При нанесенні кожного наступного шару активні центри ферменту попереднього шару блокуються, що тягне за собою втрату каталітичних властивостей мембрани.

Цей факт також було підтверджено проведенням дослідження щодо фільтрації розчину крохмалю крізь мембрану, модифіковану одним поліелектролітним шаром [PSS/α-амілаза] і вкрити додатковим шаром PSS. Отримана таким чином мембрана характеризувалася ступенем конверсії крохмалю 20 %, що також свідчить про блокування активних центрів іммобілізованого ферменту.

Отже, результати досліджень свідчать, що кількість білка, іммобілізованого у верхньому шарі мембрани, зменшується зі зростанням кількості поліелектролітних шарів, тому найкращими каталітичними властивостями характеризується мембрана [PSS/α-амілаза]¹/PES.

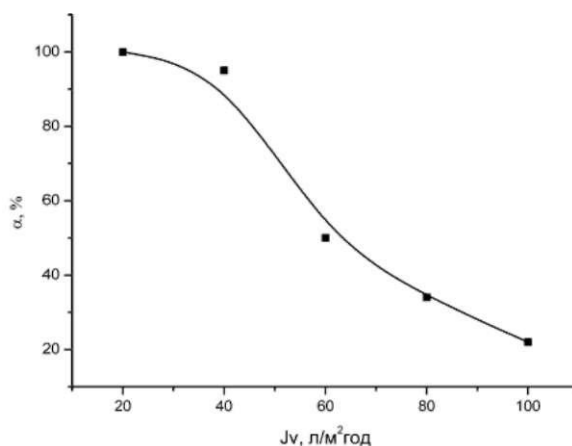


Рис. 7. Залежність ступеня конверсії крохмалю (%) від величини об'ємного потоку (ΔJ_v) через мембрану [PSS/α-амілаза]¹/PES після одного циклу ультрафільтрації

Ступінь конверсії також визначатиметься швидкістю ультрафільтрації, що обумовлено зміною часу перебування крохмалю в зоні реакції і концентрацією його в примембранному шарі внаслідок впливу трансмембранного потоку. Як видно з рис. 7, при об'ємному потоці крізь модифіковану мембрану до 40 л/м² год не відбу-

вається концентрування крохмалю в примембранному шарі, а отже, швидкість потоку через мембрану менша за швидкість декстрування крохмалю. Ступінь конверсії крохмалю при цьому становить 100 %.

За більш високих значень трансмембранного потоку швидкість концентрування крохмалю в розчині над мембраною перевищує швидкість його гідролізу іммобілізованою на поверхні мембрани α -амілазою. Так, при збільшенні продуктивності від 60 до 100 л/м² год ступінь конверсії крохмалю знижується з 50 до 22 %.

Висновки

Методом «layer by layer» було проведено іммобілізацію α -амілази на промислових поліетерсульфонових мембранах UF-PES-050H. Визначено, що оптимальними умовами проведення іммобілізації α -амілази є: значення рН модифі-

куючого розчину ферменту — 3,5; концентрація α -амілази — 50 од. акт./мл.

Визначено, що об'ємний потік води через модифіковані мембрани знижується зі збільшенням кількості нанесених поліелектролітних шарів, і найбільша кількість α -амілази адсорбується на мембрані у першому поліелектролітному шарі, що засвідчує найбільша зміна продуктивності мембрани (84,36 л/м² год) порівняно зі зміною продуктивності після накладання наступних поліелектролітних шарів.

Дослідження біокаталітичних властивостей модифікованих мембран показало, що найкраща амілолітична активність спостерігається для мембрани [PSS/ α -амілаза]¹/PES (з одним поліелектролітним шаром). Стабільність такої мембрани в процесі фільтрування підтверджується максимальним ступенем конверсії крохмалю, який становив 100 % і не зменшувався в процесі фільтрування.

1. *Giorno L., Drioli E.* Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives // Trends in biotechnology. — 2000. — Vol. 18. — P. 339–349.
2. *Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D., Sanchez J.* Progress in enzymatic membrane reactors — a review // Journal of Membrane Science. — 2004. — Vol. 242. — P. 189–196.
3. *Коновалова В. В., Бурбан А. Ф., Гузікевич К. Є., Олійничук С. Т.* Дослідження іммобілізації α -амілази на целюлозних ультрафільтраційних мембранах // Наукові записки НАУКМА. — 2007. — Т. 66: Хім. науки і техн. — С. 8–13.
4. *Decher G.* Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites // Science. — 1997. — Vol. 277. — P. 1232–1237.
5. *Yi S.-J., Yuk J.S., Jung S.-H. et al.* Investigation of selective protein immobilization on charged protein array by wavelength interrogation-based SPR sensor // Molecules and Cells. — 2003. — Vol. 15. — P. 333–340.
6. *Lvov Y., Ariga K., Ichinose I. et al.* Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic Layer-by-layer adsorption // Journal of the American Chemical Society. — 1995. — Vol. 117. — P. 6117–6123.
7. *Caruso F., Schüler C.* Enzyme multilayers on colloidal particles: Assembly, stability, and enzymatic activity // Langmuir. — 2000. — Vol. 16. — P. 9595–9603.
8. *Nguyen Q. T., Ping Z., Nguyen T. et al.* Simple method for immobilization of bio-macromolecules onto membranes of different types // Journal of Membrane Science. — 2003. — Vol. 213. — P. 85–95.
9. *Chaiyasut C., Tsuda T.* Isoelectric points estimation of proteins by electroosmotic flow: pH relationship using physically adsorbed proteins on silica gel // Chromatography. — 2001. — Vol. 22. — P. 91–95.
10. *Etienne O., Picart C., Taddei C. et al.* Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of Defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2004. — Vol. 48. — P. 3662–3669.
11. *Gupta R., Gigras P., Mohapatra H. et al.* Microbial α -amylases: a biotechnological perspective // Process Biochemistry. — 2003. — Vol. 38. — P. 1599–1616.

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

A-AMYLASE IMMOBILIZATION ON POLYETHERSULFONE MEMBRANES BY «LAYER BY LAYER» METHOD

Immobilization of α -amylase on polyethersulfone ultrafiltration membranes by LBL method was studied. It was shown, that the amount of immobilized enzyme depends on pH and concentration of modifying solution. Optimal conditions of immobilization were determined. Biocatalytic properties of modified membranes were investigated. It was shown, that immobilized enzyme activity depends on the number of deposited layers. The membranes with one polyelectrolyte layer [PSSM-amylase]₁ are characterized by the best catalytic properties.

Key words: «layer by layer» method, enzyme immobilization, biofunctional membranes, α -amylase.