



УДК 541.183.123.8

## Адсорбционная иммобилизация $\alpha$ -амилазы на волокнистых полиэлектролитах

Шкутина И.В.<sup>1</sup>, Стоянова О.Ф.<sup>2</sup>, Селеменев В.Ф.<sup>2</sup><sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 31.01.2017 г.

Рассмотрены закономерности адсорбционной иммобилизации гидролитического фермента  $\alpha$ -амилазы на ионообменниках волокнистой структуры. Исследована сорбционная способность носителей по отношению к ферменту в зависимости от времени иммобилизации, концентрации ионов водорода и белка. Установлена возможность использования иммобилизованного фермента в реакции гидролиза крахмала в течение 10 циклов.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амилаза, волокнистый полиэлектролит, иммобилизация, гетерогенный биокатализатор, коэффициент диффузии, каталитическая активность.

## Adsorption immobilization $\alpha$ -amylase on fibred polyelectrolyte

Shkutina I.V.<sup>1</sup>, Stoyanova O.F.<sup>2</sup>, Selemenev V.F.<sup>2</sup><sup>1</sup> Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg<sup>2</sup> Voronezh State University, Voronezh

The adsorption immobilization of the hydrolytic enzyme of  $\alpha$ -amylase on fibrous aminocarboxylic ion-exchanger the AK-22-1 and the chelating ion-exchanger X-1, containing iminodiacetate groups was held on. With the help of sorption methods of analysis and photometry the sorption capacity of the carries in relation to the enzyme depending on the time of the process, the concentration of hydrogen and protein ions in solution was investigated. It is determined that the time of establishing of balance is 120 min. Calculated values of diffusion coefficients are of the order of  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s. It is shown that maximum sorption of the enzyme is observed at pH 4.5-5.0. The catalytic activity of the obtained heterogeneous biocatalysts is 88% for complex amylase-AK-22-1 and 83% for the complex amylase – X-1 at the activity of the native enzyme. It is exposed that heterogeneous biocatalysts can be used for 10 cycles in the reaction of starch breaking up. As the result of the carried research the possibility of long-range use of studied fibrous polyelectrolyte for amylase immobilization was shown.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, the fibrous polyelectrolyte, immobilization, heterogeneous biocatalyst, diffusion coefficient, the catalytic activity.

### Введение

С каждым годом потребность в ферментных препаратах неуклонно возрастает. В частности, фермент  $\alpha$ -амилаза ( $\alpha$ -1,4-глюк-4-глюканогидролаза, К.Ф. 3.2.1.1) гидролизует  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи в крахмале и гликогене с образованием мальтозы и глюкозы, находит широкое применение в хлебопечении, в кондитерской, фармацевтической промышленности.

Иммобилизация ферментов допускает решение ряда ключевых вопросов энзимологии, таких как обеспечение высокой специфичности действия ферментов и повышение их стабильности, простоту в обращении, возможность повторного использования, применение в реакциях в потоке [1].

В данной работе представлены результаты адсорбционной иммобилизации  $\alpha$ -амилазы *Aspergillus awamori* на волокнистых ионообменниках типа «ФИБАН». Волокнистые полиэлектролиты типа «ФИБАН» ранее были использованы при иммобилизации амилазных ферментов глюкоамилазы и инулазы [2-4]. Применение волокон в качестве носителей в ряде случаев более предпочтительно, чем сорбентов в других формах. Волокнистые полиэлектролиты обладают высокоразвитой поверхностью, химической и осмотической стойкостью. Преимущество волокнистых материалов перед гранульными заключается в исключительно высокой скорости сорбционных процессов и более эффективной регенерации. Физическая форма и свойства получаемого гетерогенного биокатализатора позволяют использовать его в непрерывных процессах, например, в реакторах колонного типа. Включенные в их структуру ферменты защищены от патогенного воздействия микроорганизмов.

### Эксперимент

В работе был исследован ферментный препарат  $\alpha$ -амилаза *Aspergillus awamori* («Диаэм», Москва). В качестве носителей для иммобилизации  $\alpha$ -амилазы были использованы волокна: аминокарбоксильный ионообменник АК-22-1, содержащий в качестве функциональных  $-\text{NH}_2$ ,  $=\text{NH}$ ,  $\equiv\text{N}$  и  $-\text{COOH}$  группы, и хелатообразующий ионообменник X-1, содержащий иминодиацетатные группы. Подготовку волокон к иммобилизации осуществляли путем кондиционирования и переводом ионообменников в нужную ионную форму.

Кинетические опыты проводили в статических условиях при непрерывном перемешивании растворов методом ограниченного объема. Для этого навески воздушно-сухого сорбента массой 1.0 г помещали в конические колбы с притертой пробкой объемом  $1000 \text{ см}^3$  и заливали раствором  $\alpha$ -амилазы с концентрацией  $1 \text{ мг/см}^3$ . Растворы  $\alpha$ -амилазы готовили на основе ацетатного буфера. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по  $1.0 \text{ см}^3$  каждого из растворов. Общее количество белка в нативных ферментных препаратах определяли методом Лоури, в иммобилизованных ферментах – модифицированным методом Лоури [5]. Процесс считался завершенным, если с течением времени содержание вещества в растворе не изменялось.

Для получения изотерм сорбции использовали метод переменных концентраций. Навески сорбента ( $1.0000 \pm 0.0002 \text{ г}$ ) приводили в контакт с растворами  $\alpha$ -амилазы (рН 4.7) с концентрациями  $0.1 \div 5.0 \cdot 10^{-2} \text{ ммоль/дм}^3$ . Время достижения равновесия было определено в предварительных кинетических опытах. Эксперимент проводили при  $20^\circ\text{C}$ . Концентрацию веществ в равновесном растворе определяли спектрофотометрическим методом. Количество вещества в фазе сорбента вычисляли по разности концентраций исходного и равновесного растворов. Десорбция белка в буферные растворы составляла не более 5%. Каталитическую активность  $\alpha$ -амилазы измеряли иодометрическим титрованием. Стандартное отклонение полученных результатов не превышало величину 0.01.

## Обсуждение результатов

При разработке методики получения гетерогенного биокатализатора с помощью адсорбции одним из условий является определение кинетических закономерностей, что позволяет интенсифицировать процесс. Появляется возможность теоретически обоснованно выбрать сорбент с требуемыми физико-химическими свойствами. Проведенные исследования показали, что время установления равновесия при сорбции  $\alpha$ -амилазы на волокнистых полиэлектролитах составляет 120 мин (рис. 1).

Линейный характер зависимости степени завершенности процесса  $F$  от  $\sqrt{t}$  на начальном участке кривой позволяет сделать предположение о лимитировании процесса сорбции стадией внутренней диффузии (рис. 2). Эффективный коэффициент диффузии был рассчитан с помощью метода моментов [6]. При этом среднее время сорбции ( $\bar{t}_{cp.}$ ) вычисляли методом графического интегрирования значения  $t$ , численно равного площади, ограниченной кинетической кривой, построенной в координатах  $F$ - $t$ .

$$\bar{t}_{cp.} = \int_0^{\infty} t \left( \frac{dF}{dt} \right) dt = \int_0^{\infty} t dF, \quad (1)$$

где  $F$  – степень достижения равновесия за время  $t$ .

$$\bar{t}_{cp.} = \frac{r^2}{15D}, \quad (2)$$

где  $r$  – радиус зерна сорбента в набухшем состоянии (мкм),  $\bar{D}$  – эффективный коэффициент диффузии ( $\text{см}^2/\text{с}$ ).

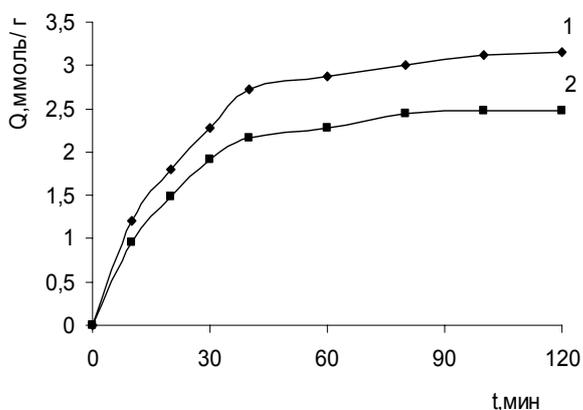


Рис. 1. Кинетические кривые сорбции  $\alpha$ -амилазы волокнистыми полиэлектролитами: 1 – АК-22-1; 2 – Х-1.  
 $Q$  – количество сорбированной  $\alpha$ -амилазы

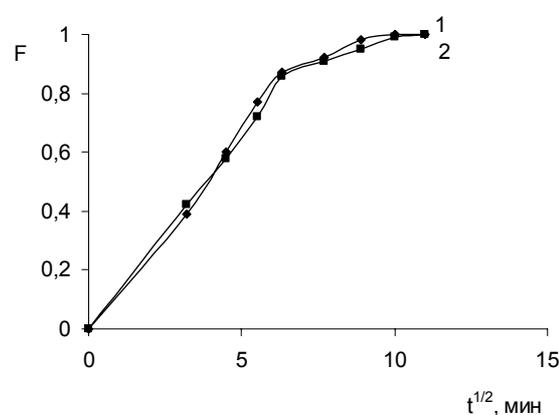


Рис. 2. Зависимость степени заполнения  $F$  от  $\sqrt{t}$  при сорбции  $\alpha$ -амилазы на АК-22-1 (1) и Х-1 (2).  
 $F$  – степень достижения равновесия за время  $t$

Таблица. Кинетические параметры сорбции  $\alpha$ -амилазы на волокнах

Носитель	Среднее время сорбции, $\bar{t}_{cp.} \cdot 10^2$ , с	Коэффициент диффузии, $\bar{D}$ , $\text{см}^2/\text{с}$
АК-22-1	21.84	$2.42 \cdot 10^{-9}$
Х-1	22.64	$3.15 \cdot 10^{-9}$

Порядок величин полученных коэффициентов диффузии (табл.) составляет  $10^{-9}$  см<sup>2</sup>/с, что соответствует величинам коэффициентов диффузии сорбированных ионообменниками биомакромолекул, приводимых в литературе [7].

Амилазы содержат большое количество ионизирующихся групп, поэтому они могут находиться в виде целого ряда различных ионных форм, однако каталитическая активность ферментов проявляется, как правило, в узком интервале рН. При этом область значений рН, при котором происходит связывание фермента с носителями, также будет определяться степенью диссоциации функциональных групп активного центра. Молекула  $\alpha$ -амилаза *Aspergillus awamori* имеет ярко выраженную двухдоменную структуру. На границе доменов располагается активный центр, включающий радикалы аспарагиновой кислоты (рК<sub>а</sub> 3.2) и гистидина (рК<sub>б</sub> 6.9), а также Ca<sup>2+</sup>-связывающий центр [8]. Проведенные исследования показали, что максимальная сорбция  $\alpha$ -амилазы происходит в области изоэлектрической точки белка при рН 4.5-5.0 (рис.3).

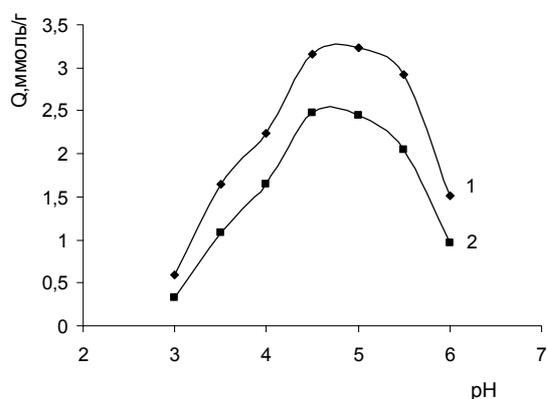


Рис. 3. Зависимость количества сорбированной  $\alpha$ -амилазы от рН равновесного раствора : 1 –АК-22-1; 2 - Х-1.

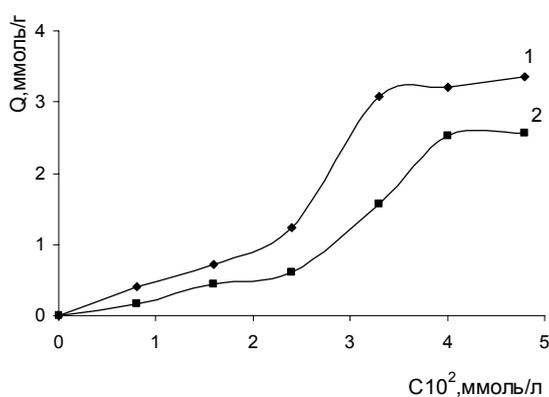


Рис. 4. Изотермы сорбции  $\alpha$ -амилазы: 1–АК-22-1; 2 - Х-1.  
С – исходная концентрация белка в растворе

Изотермы сорбции  $\alpha$ -амилазы при рН 4.7 удовлетворительно описываются уравнениями Фрейндлиха (рис.4). При адсорбционном взаимодействии белка с рассматриваемыми ионообменниками могут образовываться супрамолекулярные комплексы за счет взаимодействий одновременно с катионными, анионными и нейтральными центрами связывания за счет реализации водородных, электростатических, вандер-ваальсовых, гидрофобных взаимодействий. Очевидно, при малых концентрациях фермента в растворе процесс адсорбции может происходить в результате ионного обмена. Далее взаимодействие молекул сорбата друг с другом является более эффективным, чем взаимодействие сорбент-сорбат, и последующее распределение белка в фазе носителя осуществляется преимущественно за счет неионообменного связывания. Высокая удельная поверхность волокнистых носителей обуславливает возможность проявления  $\pi$ - $\pi$  электронного взаимодействия между сорбатом и матрицей сорбента. Полученные гетерогенные биокатализаторы имеют достаточно высокую каталитическую активность, которая составляет 88% для биокатализатора амилаза – АК-22-1и 83% для амилаза – Х-1 от активности нативного энзима.

При иммобилизации активность ферментов в большинстве случаев снижается, однако интегральная активность, определяемая суммарным количеством полученного продукта, будет выше. В работе было проведено исследование цикличности действия гетерогенного биокатализатора. Для этого носитель с иммобилизованным

ферментом (100 мг) помещали в пробирки с субстратом ( $10 \text{ см}^3 \cdot 5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$  раствора крахмала) и проводили гидролиз, меняя через каждый час субстрат.

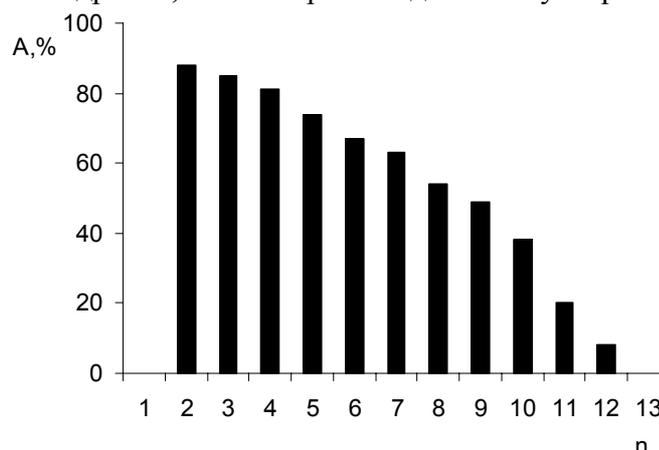


Рис. 5. Кратность использования иммобилизованной амилазы в реакции гидролиза крахмала.

A – активность (% от максимальной); n – количество реакционных циклов.

Выявлено, что гетерогенный биокатализатор можно использовать в среднем в течение 10 циклов. Активность амилазы, иммобилизованной адсорбционным методом на АК-22-1, после десяти реакционных циклов составляла 21% от исходной активности (рис.5).

## Заключение

Определены оптимальные условия адсорбционной иммобилизации амилазы на полиэлектролитах волокнистой структуры: время иммобилизации – 2 часа, pH – 4.5-5.0, концентрация сорбата –  $4.5 \div 5.0 \cdot 10^{-2}$  ммоль/дм<sup>3</sup>. Выявлено, что гетерогенные биокатализаторы можно использовать в течение 10 циклов. Полученные в работе данные свидетельствуют о целесообразности использования и дальнейшего изучения процесса иммобилизации  $\alpha$ -амилазы на волокнистых полиэлектролитах АК-22-1 и X-1.

## Список литературы

1. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М. Академия.2005. 472 с.
2. Селеменев В.Ф., Стоянова О.Ф., Шкутина И.В. Патент РФ, N 2204600, 2003.
3. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф., Меркулова Ю.Д. и др. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2004. Т. 4. № 4. С. 422-427.
4. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф. // *Журнал прикладной химии*. 2005. Т. 78. № 6. С. 1003-1005.
5. Chibata I. // *Pure and Appl. Chem.* 1978. Vol. 50. No 7, pp. 667-675.
6. Знаменский Ю.П., Бычков Н.В. Кинетика ионообменных процессов. Обнинск, Принтер. 2000. 204 с.
7. Кокотов Ю.А., Пасечник В.А. Равновесие и кинетика ионного обмена. Л. Химия. 1970. 336 с.
8. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. Воронеж. Изд-во Воронеж. гос. у-та, 2001. 184 с.

## References

1. Varfolomeev S.D. Himicheskaya ehnzimologiya. M., Akademiya, 2005, 472 p.
2. Selemenev V.F., Stoyanova O.F., Shkutina I.V. Patent RF, No 2204600, 2003.
3. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Selemenev V.F., Merkulova Yu.D. et al., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2004, Vol. 4, .No4, pp. 422-427.
4. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Selemenev V.F. *J. Applied Chemistry*, 2005, Vol. 78, .No 6, pp. 1003-1005.
5. Chibata I. *Pure and Appl. Chem.*, 1978, Vol. 50, No 7, pp. 667-675.
6. Znamenskij YU.P., Bychkov N.V. Kinetika ionoobmennyyh processov. Obninsk, Printer, 2000, 204 p.
7. Kokotov YU.A., Pasechnik V.A. Ravnovesie i kinetika ionnogo obmena. Leningrad, Himiya, 1970, 336 p.
8. Korneeva O.S. Karbogidrazy: preparativnoe poluchenie, struktura i mekhanizm dejstviya na oligo- i polisaharidy. Voronezh, Izd-vo Voronezh. gos. un-ta, 2001, 184 p.

**Шкутина Ирина Викторовна** – к.б.н., старший преподаватель кафедры аналитической химии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, Санкт-Петербург

**Стоянова Ольга Федоровна** – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

**Селеменев Владимир Федорович** – д.х.н., профессор, заведующий кафедры аналитической химии, химического факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

**Shkutina Irina V.** – assistant of department of analytical chemistry of State Chemical-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, e-mail: [irn55@mail.ru](mailto:irn55@mail.ru)

**Stoyanova Olga F.** – lecturer of department of analytical chemistry, chemical faculty, Voronezh State University, Voronezh

**Selemenev Vladimir V.** – doctor of science, professor, head of Department of analytical chemistry, chemical faculty, Voronezh State University, Voronezh