



УДК 541.183.123.8

## Сорбционные параметры глюкоамилазы на сверхсшитых полимерных носителях

Шкутина И.В.<sup>1</sup>, Мироненко Н.В.<sup>2</sup>, Селеменев В.Ф.<sup>2</sup><sup>1</sup> ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 11.01.2019 г.

DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2019.19/644>

Рассмотрена сорбция глюкоамилазы на сверхсшитых сорбентах MN-202 и MN-500 в зависимости от pH среды. Проанализированы изотермы сорбции глюкоамилазы на полимерных носителях с применением адсорбционной теории БЭТ. Рассчитаны равновесные параметры сорбции: предельное количество сорбированной глюкоамилазы, константы, характеризующие взаимодействия типа сорбат-сорбент и сорбат-сорбат. Проведено сравнение свойств свободной и иммобилизованной глюкоамилазы.

**Ключевые слова:** глюкоамилаза, сверхсшитые полимеры, иммобилизация, изотерма сорбции, каталитическая активность, гетерогенный биокатализатор.

## The sorption parameters of glucoamylase on supersewn polymer carriers

Shkutina I.V.<sup>1</sup>, Mironenko N.V.<sup>2</sup>, Selemenev V.F.<sup>2</sup><sup>1</sup>FGBOU VO St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg<sup>2</sup>FGBOU VO Voronezh State University, Voronezh

We previously used supersewn polymer sorbents for amylolytic enzymes immobilization. This type of sorbents has established itself as a promising carrier in the immobilization of macromolecules. The aim of this work is to study the sorption parameters of glucoamylase on supersewn sorbents MN-202 and MN-500.

The sorption capacity of these supersewn polymer carriers with regard to glucoamylase depending on the concentration of hydrogen ions in the solution was investigated. The protein concentration in the equilibrium solution was spectrophotometrically determined by the modified Lowry method. It was shown that the largest amount of protein is adsorbed at pH 4.5-5.0, i.e. in the region of the isoelectric point of glucoamylase, at which most of the enzyme exists in the form of a zwitter-ion.

Isotherms of glucoamylase sorption on MN-202 and MN-500 carriers were obtained in the range of pH values corresponding to the maximum enzyme capacity (pH 4.7). It was noted that in the region of low concentrations (up to  $6 \cdot 10^{-4}$  mmol/l) sorption increases linearly with increasing protein concentration in the equilibrium solution. Further, on the sorption isotherm, there is an inflection and a horizontal section corresponding to the formation of a polymolecular layer of the immobilized enzyme. The high specific surface area of the sorbents determines the possibility of  $\pi$ - $\pi$  electron interaction between the sorbate and the sorbent matrix and promotes the formation of supramolecular complexes. IR spectroscopy was used to explain the nature of the interaction of glucoamylase with carriers.

Adsorption isotherms of glucoamylase on polymer carriers were analyzed using the adsorption theory of BET. The equilibrium parameters of sorption were calculated, i.e. the utmost amount of sorbated glucoamylase, constants characterizing the interaction of the sorbate-sorbent and sorbate-sorbate types.

The paper compares the properties of free and immobilized glucoamylase. The catalytic activity of glucoamylase was measured by photometric method. It is shown that the temperature optimum for both free and immobilized glucoamylase is 60-65 ° C, while the pH optimum of the heterogeneous biocatalyst expands. Experiments on thermal inactivation showed that the heterogeneous biocatalyst has got increased resistance to denaturing effects of temperature and pH compared with the native enzyme. For the immobilized enzyme, a decrease in the inactivation constants in the entire studied temperature range (50-75°C) was noted, which indicates a greater stability of the immobilized enzyme.

**Keywords:** glucoamylase, supersewn polymers, immobilization, sorption isotherm, catalytic activity, heterogeneous biocatalyst.

## Введение

Фермент глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3.) катализирует гидролиз  $\alpha$ -D-гликозидных связей в амилозе, амилопектине, гликогене, мальтоолигосахаридах. Фермент деполимеризует субстрат с нередуцирующего конца, т.е. является амилазой экзо-типа.

Глюкоамилаза присутствует во всех биологических объектах: низших и высших растениях, в организме человека и животных, в плесневых грибах. В медицине препараты глюкоамилазы незаменимы при лечении ряда наследственных заболеваний, вызванных непереносимостью крахмала и мальтозы, ведущих к заболеваниям ЖКТ. Отсутствие кислой глюкоамилазы у человека может привести к гликогенезу, связанного с накоплением гликогена в клетках печени, мышцах и других органах.

Исключительно велико прикладное значение глюкоамилазы для пищевой промышленности (получение концентрированных растворов крахмальных гидролизатов, кристаллической глюкозы) [1].

Одним из перспективных направлений является разработка методов иммобилизации ферментов. При этом основной задачей является изучение сорбционных свойств сорбента с целью создания комплекса сорбент-сорбат, обладающего высокой активностью, способностью к многократному использованию, устойчивостью к денатурирующим факторам.

Сверхсшитые полимеры типа Стиросорб способны интенсивно поглощать органические вещества из водных растворов, увеличивая объем и проявляя высокую сорбционную емкость, превышающую емкость известных типов органических сорбентов. Высокая удельная поверхность сорбентов "Стиросорб" обуславливает также возможность проявления  $\pi$ - $\pi$  электронного взаимодействия между сорбатом и матрицей сорбента и способствует формированию супрамолекулярных комплексов.

Ранее нами была исследована иммобилизация амилотических ферментов на сверхсшитых сорбентах [2-4]. Целью настоящей работы является изучение процесса сорбции глюкоамилазы на сорбентах MN-202 и MN-500.

## Эксперимент

В работе был использован ферментный препарат глюкоамилазы, полученный осаждением этанолом из вытяжки поверхностной культуры *Aspergillus awamori*. Молекулярная масса фермента составляет 90 000 Да. Объектами исследования являлись неионогенный сорбент MN-202 и сульфокатионообменник MN-500 (сорбенты фирмы «Purolite»). Данные сорбенты относятся к группе сверхсшитых полимерных материалов типа «Стиросорб» на основе стирола и дивинилбензола с высокоразвитой удельной поверхностью (900-1200 м<sup>2</sup>/г) и макропористой структурой.

Для получения изотерм сорбции использовали метод переменных концентраций [5]. Навески сорбента ( $1.0000 \pm 0.0002$  г) приводили в контакт с растворами глюкоамилазы с концентрациями  $0.1 \div 4.0 \cdot 10^{-4}$  ммоль/дм<sup>3</sup>. Соотношение раствор / сорбент было постоянным и составляло 100/1. Растворы готовили на основе ацетатного буфера с разным значением рН среды. В ходе предварительных кинетических опытов было установлено, что время достижения равновесия составляет 4 ч. Эксперименты проводили при 293 К. Концентрацию белка в равновесном растворе определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Лоури [6]. Количество вещества в фазе сорбента вычисляли по разности концентраций исходного и равновесного растворов. Каталитическую активность глюкоамилазы измеряли фотометрическим методом [7]. Стандартное отклонение полученных результатов не превышало величину 0.01.

Термоинактивацию нативного и иммобилизованного ферментов осуществляли термостатированием в 0.1 М ацетатном буфере при рН 4.7, температурах 60-75°C. Для этого в пробирки помещали соответственно по 10 см<sup>3</sup> раствора глюкоамилазы и навески 100 мг иммобилизованного препарата, добавляли по 10 см<sup>3</sup> ацетатного буфера. Растворы инкубировали при данных условиях и через определенные промежутки времени определяли остаточную активность образцов по отношению к  $5 \cdot 10^{-6}$  М раствору крахмала. ИК спектры образцов глюкоамилазы снимали на ИК-спектрометре Bruker VERTEX-70 в интервале частот 400-4000 см<sup>-1</sup>.

## Обсуждение результатов

При иммобилизации ферментов одним из основных определяющих факторов является рН среды. Фермент глюкоамилаза имеет мультидоменную структуру и характеризуется наличием N-терминального домена, состоящего из 440 аминокислотных остатков, которые в зависимости от рН среды могут находиться в виде различных ионных форм [8]. Для экспериментов по иммобилизации был выбран диапазон значений рН, в котором глюкоамилаза проявляет наибольшую каталитическую активность. В активный центр глюкоамилазы входят карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот и имидазольная группа гистидина, и связывание фермента с носителями, будет определяться прежде всего степенью диссоциации функциональных групп активного центра. Результаты проведенных опытов показали, что наибольшее количество белка сорбируется при рН 4.5-5.0, т.е. в области изоэлектрической точки глюкоамилазы, при которой большая часть фермента существует в виде цвиттер-иона (рис. 1). При этом, анализируя кривые, можно отметить, что сорбент оказывает меньшее влияние на процесс иммобилизации, чем фермент.

Изотермы сорбции были получены при рН 4.7, соответствующем максимальной емкости фермента (рис. 2). В области малых концентраций (до  $6 \cdot 10^{-4}$  ммоль/дм<sup>3</sup>) сорбция возрастает линейно с увеличением концентрации белка в равновесном растворе. Далее на изотерме сорбции наблюдается перегиб и горизонтальный участок, соответствующий формированию мономолекулярного слоя иммобилизованного фермента. Гидрофобные взаимодействия играют определяющую роль при иммобилизации глюкоамилазы на сверхсшитых сорбентах. Предполагается, что при связывании глюкоамилазы происходит формирование  $\pi$ - $\pi$ -электронного взаимодействия прежде всего между гетероциклами гистидина, триптофана, бензольным кольцом тирозина и бензольными кольцами носителей. Поскольку в молекуле глюкоамилазы аминокислотные остатки с алкильными боковыми цепями (Ala, Val, Met, Ile) составляют более 30% [9], то при

иммобилизации они также могут вступать в гидрофобные взаимодействия с носителем. На носителе MN-500 незначительная доля фермента, кроме того, может сорбироваться за счет ионного обмена, так как данный сорбент содержит сульфогруппы.

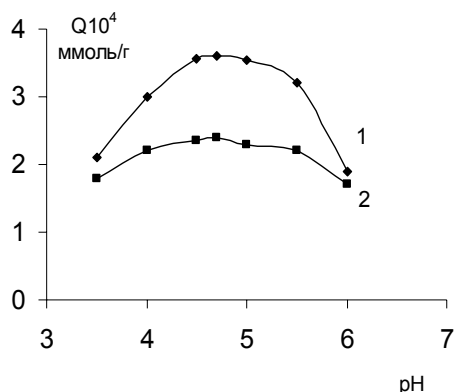


Рис. 1. Зависимость количества сорбированной глюкоамилазы ( $Q$ , ммоль/г) от pH равновесного раствора: 1 – MN-500; 2 – MN-202.

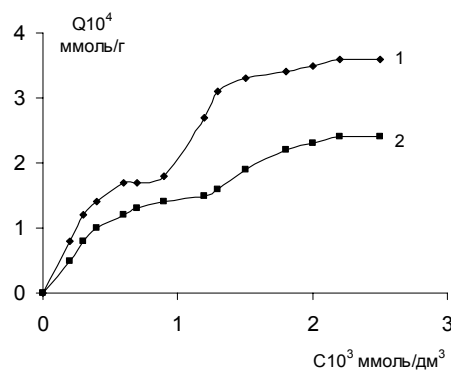


Рис.2. Изотермы сорбции глюкоамилазы при pH 4.7: 1 – MN-500; 2 – MN-202.  $C$  – равновесная концентрация белка в растворе, ммоль/дм<sup>3</sup>.

При концентрации глюкоамилазы в растворе  $0.7 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup> сорбция резко возрастает, приобретая полимолекулярный характер. После завершения формирования мономолекулярного слоя сорбата дальнейший процесс сорбции происходит уже за счет взаимодействия молекул глюкоамилазы друг с другом, которое может осуществляться как в результате контакта гидрофобных, так и гидрофильных частей макромолекул. На носителе MN-500 количество иммобилизованной глюкоамилазы больше, чем на MN-202, что, вероятно, связано с более высокой удельной поверхностью сорбента. Подобная зависимость отмечена при сорбции  $\alpha$ -амилазы на данных сверхсшитых полимерах [10]. Активность глюкоамилазы, иммобилизованной на MN-500, составляет 85% от активности нативного фермента, для MN-202 – 79%.

Методом ИК спектроскопии были проанализированы изменения, происходящие в ИК спектрах при иммобилизации глюкоамилазы на MN-500. В ИК спектрах рассматриваемых сорбентов после связывания с ферментом появляются новые полосы, характерные для глюкоамилазы. В области частот  $1500\text{--}1750\text{ см}^{-1}$  следует отметить сильные полосы поглощения Амид I и Амид II. Первая отвечает валентным колебаниям групп  $C=O$  пептидной связи и состоит из четырех составляющих: основной максимум при  $1654\text{ см}^{-1}$  и три выступающих пика при  $1624$ ,  $1633$  и  $1665\text{ см}^{-1}$ . Для полосы Амид II, характеризующей деформационные колебания NH в плоскости пептидной группы, можно отметить основные максимумы при  $1500$ ,  $1521$ ,  $1532$ ,  $1541$  и  $1555\text{ см}^{-1}$ . Также в спектрах иммобилизованной глюкоамилазы наблюдаются полосы поглощения Амид III ( $1211\text{--}1255\text{ см}^{-1}$ ) и Амид V ( $613\text{--}679\text{ см}^{-1}$ ), обусловленные соответственно плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH групп [11].

Для количественного описания полимолекулярной сорбции использовали модель БЭТ, в основу которой положено представление об образовании на поверхности сорбента адсорбционных комплексов с одной, двумя и т.д. молекулами сорбента [12].

$$Q = \frac{Q_{\infty} K_L c_p}{(1 - K_S c_p)(1 - K_S c_p + K_L c_p)}, \quad (1)$$

где  $Q$  – количество сорбируемого белка, ммоль/г;  $Q_{\infty}$  – предельное количество сорбированного белка (емкость монослоя), ммоль/г;  $c_p$  – равновесная концентрация раствора, ммоль/дм<sup>3</sup>;  $K_L$  – константа сорбционного равновесия, характеризующая интенсивность процесса сорбции, дм<sup>3</sup>/ммоль;  $K_S$  – константа сорбционного равновесия для полимолекулярного слоя, дм<sup>3</sup>/ммоль.

Для определения значений констант, входящих в уравнение изотермы БЭТ, использовали линейаризованное уравнение:

$$\frac{c_p}{Q(1-K_S c_p)} = \left( \frac{K_L - K_S}{Q_{\infty} K_L} \right) c_p + \frac{1}{Q_{\infty} K_L}. \quad (2)$$

Сорбционную емкость по БЭТ определяли из уравнений (3-4):

$$Q_{\infty} = \frac{1}{b \cdot K_L}, \quad (3)$$

$$K_L = \frac{k}{b} + K_S. \quad (4)$$

Параметр  $K_S$  подбирали, исходя из максимальной величины достоверности аппроксимации прямой в координатах  $c_p - c_p / Q(1 - K_S c_p)$ . Полученные значения параметров, входящих в уравнения моделей, а также коэффициенты корреляции представлены в табл. 1.

Таблица 1. Значения сорбционных параметров, рассчитанных с использованием уравнений БЭТ

| Сорбент | $K_L$ , дм <sup>3</sup> /ммоль | $Q_{\infty}$ , ммоль/г | $K_S$ , дм <sup>3</sup> /ммоль | $R^2$ |
|---------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------|
| MN-202  | 1.87                           | $2.4 \cdot 10^4$       | 0.14                           | 0.98  |
| MN-500  | 2.34                           | $3.6 \cdot 10^4$       | 0.16                           | 0.95  |

Высокое значение коэффициента корреляции и сопоставимость величин констант  $K_L$  и  $K_S$  с литературными данными [13,14] позволяют применять уравнение БЭТ для описания полимолекулярной сорбции глюкоамилазы на поверхности сорбента. Изучение зависимости активности фермента от концентрации ионов водорода и температуры позволило установить оптимальные условия функционирования гетерогенного биокатализатора (табл. 2). Температурный оптимум как для свободной, так и для иммобилизованной глюкоамилазы составляет 63-65°C, в то время как рН-оптимум гетерогенного биокатализатора расширяется.

Таблица 2. Физико-химические свойства свободной и иммобилизованной глюкоамилазы

| Определяемая характеристика   | Свободная глюкоамилаза | Иммобилизованная глюкоамилаза |         |
|---|------------------------|-------------------------------|---------|
|   |                        | MN-202                        | MN-500  |
| рН-оптимум активности   | 4.7-5.0                | 4.2-5.2                       | 4.0-5.2 |
| Температурный оптимум активности, °С  | 63-65                  | 63-65                         | 63-65   |
| Константа скорости термоинактивации при 60°C, $k \cdot 10^{-3}$ , мин <sup>-1</sup> | 7.91                   | 1.72                          | 1.47    |
| Константа скорости термоинактивации при 70°C, $k \cdot 10^{-2}$ , мин <sup>-1</sup> | 19.02                  | 2.12                          | 1.97    |

Третичная структура глюкоамилазы в ходе сорбции на носителях упрочняется, и сорбент выступает в роли дополнительной ее сшивки, препятствуя деформационному разворачиванию белковой макромолекулы. Опыты по термоинактивации [15] показали, что иммобилизованная глюкоамилаза обладает повышенной устойчивостью по отношению к совместному денатурирующему воздействию температуры и рН среды по сравнению с нативным белком. Для иммобилизованного фермента можно отметить снижение констант инактивации во всем исследуемом температурном интервале (60-75°C), что свидетельствует о большей стабильности гетерогенного биокатализатора.

## Заключение

Исследована сорбционная способность сверхсшитых полимерных носителей MN-202 MN-500 по отношению к глюкоамилазе. Получены изотермы сорбции фермента в диапазоне значений рН, соответствующих наибольшему количеству иммобилизованного белка.

Изотермы сорбции глюкоамилазы проанализированы с применением адсорбционной теории БЭТ, и рассчитаны равновесные параметры сорбции: предельное количество сорбированной глюкоамилазы, константы, характеризующие взаимодействия типа сорбат-сорбент и сорбат-сорбат.

Выявлена высокая активность полученных гетерогенных биокатализаторов. Установлено, что гетерогенный биокатализатор по сравнению со свободным ферментом обладает повышенной устойчивостью к денатурирующим воздействиям температуры и рН среды. Причем для иммобилизованной глюкоамилазы на сульфокатионообменнике отмечена и наибольшая активность, и большая устойчивость к денатурирующим факторам, чем для комплекса фермент – неионогенный носитель MN-202.

## Список литературы

- 1 Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М. Академия. 2005. 472 с.
- 2 Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф. // *Журнал прикладной химии*. 2001. Т. 74. № 5. С. 869-871.
- 3 Селеменев В.Ф., Стоянова О.Ф., Шкутина И.В. Патент РФ, №2181770, 2002.
- 4 Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф. // *Химия растительного сырья*. 2012. № 2. С. 27-31.
- 5 Селеменев В.Ф. и др. Практикум по ионному обмену. Воронеж, Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2004. 160 с.
- 6 Chibata I. // *Pure and Appl.Chem*. 1978. Vol. 50. No 7. pp. 667-675.
- 7 Рухляева А.П., Польшгалына Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М. Легкая и пищевая пр-ть. 1981. 288 с.
- 8 Aleshin A., Golubev A., Firsov L., Honzatko R. // *J.Biol.Chem*. 1992. Vol. 267. №27, pp. 19291-19298.
- 9 Golubev A., Aleshin A., Neustroev K., Firsov L. // *J. Mol. Biol*. 1992. Vol. 226. № 1. pp. 271-272.
- 10 Красовицкая И.А., Глазова Н.В., Котова Н.В. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2017. Т. 17. № 4. С.601-607.
- 11 Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. М. Наука, 1965. 136 с.
- 12 Amanollah E., Jafar S., Soltan M. et al. // *Adsorption*. 2009. Vol. 15. No 1. pp. 65-73.
- 13 Котова Д.Л., ФамТхи Гам, Крысанова Т.А., Васильева С.Ю. и др. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2014. Т. 14. № 4. С.572-577.
- 14 Мироненко Н.В., Смусева С.О., Селеменев В.Ф., Бородкина Т.А. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2017. Т. 17. № 4. С.557-563.
- 15 Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М. Мир. 1990. 350 с.

## References

1. Varfolomeyev S.D. Chemical Enzymology. M., Academy, 2005, 472 p.
2. Skutina I.V., Stoyanova O.F. Selemenev V.F., *J. of applied chemistry*, 2001, Vol. 74, No 5, pp. 869-871.
3. Selemenev V.F., Stoyanova O.F., Shkutina I.V. Patent RF, no. 2181770, 2002.
4. Skutina I.V., Stoyanova O.F. Selemenev V.F., *Chemistry of vegetable raw materials*, 2012, No 2, pp. 27-31.
5. Selemenev V.F., et al. Workbook on ion exchange, Voronezh, Publishing house Voronezh state University, 2004, 160 p.
6. Chibata I., *Pure and Appl.Chem.*, 1978, Vol. 50, No 7, pp. 667-675.
7. Rukhledev A. P., Polyhaline G. V. Methods for determining the activity of hydrolytic enzymes. Moscow, Light and food Avenue, 1981, 288 p.
8. Aleshin A., Golubev A., Firsov L., Honzatko R., *J.Biol.Chem.*, 1992, Vol. 267, No 27, pp. 19291-19298.
9. Golubev A., Aleshin A., Neustroev K., Firsov L., *J. Mol. Biol.*, 1992, Vol. 226, No 1, pp. 271-272.
10. Krasovitskaya I.A., Glazova N.V., Kotova N.V., *Sorptionsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2017, Vol. 17, No 4, pp. 601-607.
11. Chirgadze Yu.N. Infrared spectra and structure of polypeptides and proteins, M., Nauka, 1965, 136 p.
12. Amanollah E., Jafar S., Soltan M. et al., *Adsorption*, 2009, Vol. 15, No 1, pp. 65-73.
13. Kotova D.L., Fathi DIN, Krysanova T.A., Vasilieva S.Yu. et. al., *Sorptionsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2014, Vol. 14, No 4, pp. 572-577.
14. Mironenko N.V., Samuseva S.O., Selemenev V.F., Borodkina T.A., *Sorptionsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2017, Vol. 17, No 4, pp. 557-563.
15. T. Keleti Fundamentals of enzyme kinetics, M., Mir, 1990, 350 p

**Шкутина Ирина Викторовна** – к.б.н., доцент кафедры общей и медицинской химии им. проф. В.В. Хорунжего, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

**Мироненко Наталья Владимировна**, к.х.н., ассистент кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Селеменев Владимир Федорович** – д.х.н., профессор, заведующий кафедрой аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж.

**Shkutina Irina V.** – assistant professor of general and medical chemistry department after prof. V.V. Khorunzhii, State Pediatric Medical University, St. Petersburg, e-mail: [irn55@mail.ru](mailto:irn55@mail.ru)

**Mironenko Nataliay V.** – assistant of analytical chemistry department of chemical faculty, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [nata-shamir@yandex.ru](mailto:nata-shamir@yandex.ru)

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