УДК 663.813

ОМЕЛЬЧЕНКО В.С., асист., НТУ «ХПІ»

НАУКОВЕ ОБГРУНТУВАННЯ ПАРАМЕТРІВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ АМІЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ НА МІКРОЧАСТОЧКИ Fe_3O_4

Стаття присвячена комплексному дослідженню основних параметрів іммобілізації ферментів амілолітичного комплексу за допомогою біфункційного агенту – глутарового альдегіду. При активації аміномодифікованої кремнійвмісної поверхні часточок Fe_3O_4 глутаральдегідним розчином з різною масовою часткою глутарового альдегіду спостерігається закономірне зниження масової частки білка в контактному розчині. Визначено раціональну концентрацію фермента при іммобілізації, вище якої не спостерігається значних змін у величинах активності іммобілізованих амілолітичних ферментів.

Ключові слова: комплекс амілолітичних ферментів, глутаровий альдегід, ковалентна іммобілізіція, магнітні частки, адсорбційна іммобілізація.

Постановка проблеми.

Ферменти є високоактивними і селективними каталізаторами численних хімічних перетворень. Проте використання їх для потреб технології тривалий час обмежувалося відносно високою вартістю і низькою стабільністю в порівнянні з каталізаторами звичайного типу [1].

В останні десятиріччя в даній галузі був досягнутий значний прогрес, в основному, завдяки розробці техніки іммобілізації, тобто закріплення молекул ферментів на поверхні твердих водонерозчинних носіїв або включення їх в структуру гелів. Процес іммобілізації вирішує два основні завдання: перетворює фермент в гетерогенний каталізатор, забезпечуючи його багаторазове використання в проточних системах, і збільшує його операційну стабільність, що є основним чинником, який визначає впровадження біокаталізу в практику. На даний час іммобілізовані ферменти знаходять широке застосування в харчовій і фармацевтичній промисловості, медицині та аналітичної хімії [2].

Перспективи застосування ферментів в харчових технологіях у промисловому масштабі пов'язані з отриманням високостабільних і активних біокаталізаторів, іммобілізованих адсорбцією, включенням в гель

© В.С. Омельченко. 2015

або іммобілізацією на мікрочасточках. Органічні матеріали мають досить високий гідродинамічний опір і не стійкі у водних середовищах. Продуктивність таких процесів, як правило, невелика. Неорганічні матеріали мають ряд переваг перед органічними: високу механічну міцність; жорсткий скелет, що не змінюються при варіюванні середовища; можливість регенерації; прийнятні гідродинамічні характеристики. Ці властивості дозволяють використовувати мікрочасточки у високопродуктивних реакторах проточного типу практично необмежений час [2, 3].

Створення перспективного науково-обґрунтованого способу іммобілізації амілолітичних ферментів на мікро- і наночасточках для харчової промисловості є актуальним науковим завданням.

Сучасний стан проблеми.

Існує величезна кількість методів іммобілізації , які об'єднуються в дві великі групи – фізичні та хімічні за природою приєднання ферменту до носія [4]. В свою чергу фізичні методи розподіляються на адсорбційну іммобілізацію, наприклад закріплення у шпарах , катіонний обмін , інкапсулювання , іммобілізацію у гелях гідрофобно-гідрофільними взаємодіями. Адсорбційна іммобілізація при цьому дозволяє майже у повному обсязі зберегти активність ферменту – вона застосовується як правило у великомасштабних промислових процесах [2]. Хімічна або ковалентна іммобілізація застосовується у лабораторних дослідах – аналізі та отриманні високочистих речовин. Велике значення для вирішення чи застосовувати іммобілізований фермент має ціна носія та самого ферментного препарату [5].

Дослідження в напрямку удосконалення технології іммобілізації ферментів описано в роботах таких науковців як І.В. Шкутина, О.В. Анисенко, І.Н. Андреєва, A. Dyal, K. Loos, M. Noto та інших.

Мета і основні задачі дослідження.

В даній роботі *об'єктом дослідження* є процес іммобілізації амілолітичних ферментів на мікрочасточки Fe_3O_4. *Предмет дослідження* – масова частка білка в контактному розчині, активність іммобілізованого ферментного препарату.

Метою даної роботи є наукове обґрунтування параметрів іммобілізації амілолітичних ферментів на мікрочасточки Fe_3O_4. Для досягнення мети треба вирішити *наступні задачі*:

– визначити та проаналізувати залежність масової частки білка в контактному розчині від масової частки конденсую чого агенту;

– визначити та проаналізувати вплив концентрації амілолітичних ферментів на активність іммобілізованого ферментного препарату.

Результати роботи.

В роботі досліджено два способи іммобілізації амілолітичних ферментів на мікрочасточки Fe_3O_4: глутаральдегідний і адсорбційний.

Глутаровий альдегід – найбільш розповсюджений конденсуючий агент, що використовується для активації поверхнею з аміногрупами. Це гомобіфункційна молекула здатна взаємодіяти з двома аміногрупами білкової молекули.

Для вибору оптимальної концентрації глутарового альдегіду, що використовується при іммобілізації амілолітичних ферментів на мікрочасточки Fe_3O_4, проведена серія експериментів, результати якої представлені на рис. 1.

Рис. 1. Залежність масової частки білка в контактному розчині від масової частки конденсуючого агенту – глутарового альдегіду

Залежність масової частки білка в контактному розчині від масової частки конденсуючого агенту – глутарового альдегіду описується рівняннями другого ступеня.

Рівняння регресії цієї залежності в діапазоні заданих концентрацій глутарового альдегіду у розчині при величині достовірності апроксимації R не менш, ніж 0,98 мають такий вигляд:

$$Y = 1{,}535x^2 - 26{,}483x + 120{,}84 \qquad (1)$$

де Y – масова частка білка в контактному розчині, % від вихідної; x – масова частка глутарового альдегіду в розчині, %.

З рис. 1 випливає: при активації аміномодифікованої кремнійвмісної поверхні часточок Fe_3O_4 глутаральдегідним розчином з різною масовою часткою глутарового альдегіду спостерігається закономірне зниження масової частки білка в контактному розчині аж до масової частки конденсуючого агенту 10 %, що свідчить про поступовий перехід ферменту в тверду фазу.

Мінімальна досліджувана концентрація глутарового альдегіду становила 0,50 %.

Для подальших досліджень було обрано концентрацію глутарового альдегіду 10 %.

Слід зазначити, що іммобілізація амілолітичних ферментів на наночасточки Fe_3O_4, не оброблені глутаровим альдегідом, дозволяє отримати гетерогенні препарати з ефективністю іммобілізації 27 ± 5 %.

Подальші дослідження були спрямовані на визначення раціональної концентрації розчину амілолітичних ферментів, що використовується для іммобілізації глутаральдегідним і адсорбційним способами, яку варіювали в діапазоні від 0 до 50 % (рис. 2).

Залежність концентрації амілолітичних ферментів на активність іммобілізованого ферментного препарату описується рівняннями другого ступеня.

Рівняння регресії (1) та (2) даних залежностей в діапазоні заданих концентрацій глутарового альдегіду у розчині для мікрочасточок Fe_3O_4, модифікованих глутаровим альдегідом і немодифікованих мікрочасточок Fe_3O_4 при величині достовірності апроксимації R не менш, ніж 0,96 мають такий вигляд:

$$Y_1 = -2{,}2955\ x^2 + 34{,}738\ x - 35{,}333 \qquad (1)$$

$$Y_2 = -1{,}1526\ x^2 + 16{,}776\ x - 14{,}714 \qquad (2)$$

де Y_1 – активність іммобілізованого ферментного препарату на мікрочасточках Fe_3O_4, модифікованих глутаровим альдегідом, % від нативного;

Y_2 –активність іммобілізованого ферментного препарату для немодифікованих мікрочасточок Fe_3O_4, % від нативного;

x – концентрація амілолітичних ферментів в розчині, %.

Як випливає з рис. 2, раціональна концентрація ферменту для іммобілізації препарату у всіх досліджуваних зразках досягається при 25 – 30 %, вище якої не спостерігається значних змін у величинах активності іммобілізованих амілолітичних ферментів.

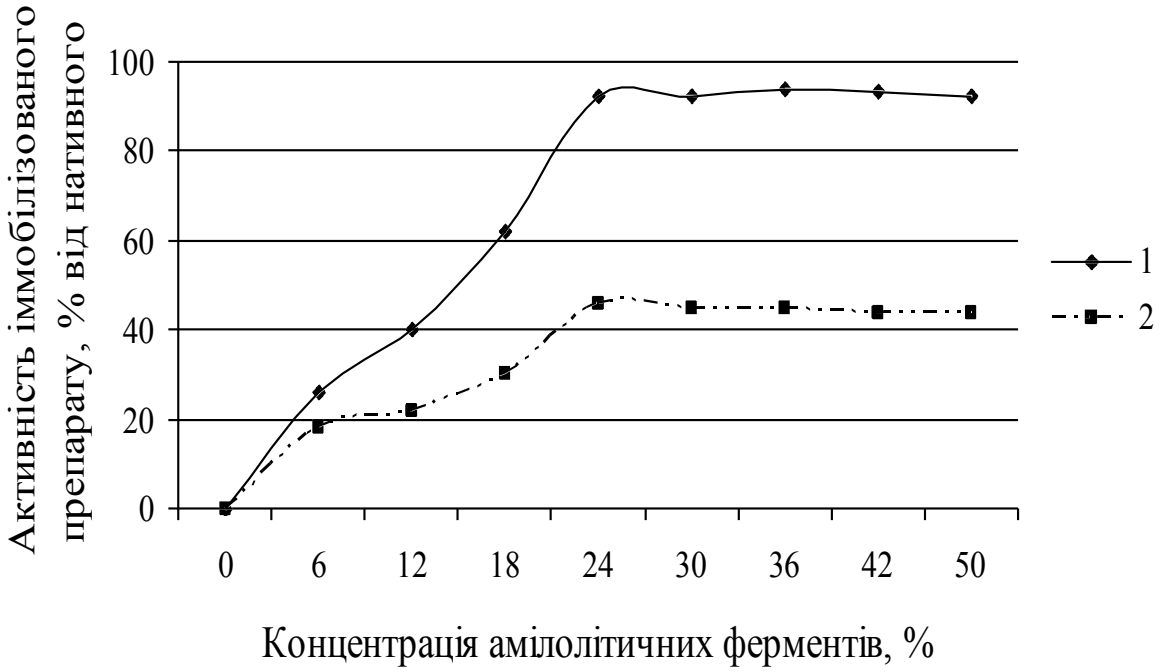

Рис. 2. Вплив концентрації амілолітичних ферментів на активність іммобілізованого ферментного препарату: 1 – мікрочасточки Fe_3O_4, модифіковані глутаровим альдегідом; 2 – немодифіковані мікрочасточки Fe_3O_4

Висновки.

На підставі результатів досліджень обґрунтовано параметри іммобілізації амілолітичних ферментів на мікрочасточки Fe_3O_4 за допомогою біфункційного агенту – глутарового альдегіду.

Таким чином, при активації аміномодифікованої кремнійвмісної поверхні часточок Fe_3O_4 глутаральдегідним розчином з різною масовою часткою глутарового альдегіду спостерігається закономірне зниження масової частки білка в контактному розчині.

Визначено раціональну концентрацію ферменту при іммобілізації, вище якої не спостерігається значних змін у величинах активності іммобілізованих амілолітичних ферментів.

Список литературы: **1.** *Lu X.* Anilinedimer-COO Hassisted preparation of well-dispersed polyaniline Fe_3O_4 nanoparticles / *X. Lu, Y. Yu, L. Chen* // Nanotechnology. – 2005. – № 16. – P. 1660 – 1665. **2.** *Шкутина И. В.* Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах / *И. В. Шкутина, О. Ф. Стоянова, В. Ф. Селеменев* // Журнал физической химии. – 2001. – Т. 75. – № 11. – С. 2080 – 2010. **3.** *Патент №2327738 РФ* C12N11/00, C12N11/04, C12N11/12, C12N11/14 Способ получения иммобилизованной 3-фруктофуранозидазы / *Корнеева О.С.* – №2006141092/13; заявл. 20.11.2006; опубл. 27.06.2008. **4.** *Liang Y. Y.* Bioconjugation of papain on super paramagnetic nanoparticles decorated with carboxymethylateded citosan / *Y. Y. Liang, L. M. Zhang, Y. Y. Liang* // Biomacromolecules. – 2007. – № 8. – P.1480 – 1486. **5.** *Sharma R.* Composition dependent magnetic properties of ironoxide-polyaniline nanoclusters / *R. Sharma, S. Lamba, S. Annapoorni* // J. Appl. Phys. – 2005. – № 97. – P. 14311 – 14311.

Bibliography (transliterated): **1.** *Lu X.* Anilinedimer-COO Hassisted preparation of well-dispersed polyaniline Fe_3O_4 nanoparticles / *X. Lu, Y. Yu, L. Chen* // Nanotechnology. – 2005. – No. 16. – P. 1660 – 1665. **2.** *Shkutina I. V.* Adsorbcionnaja immobilizacija gljukoamilazy na amfoternyh polijelektrolitah / *I. V. Shkutina, O. F. Stojanova, V. F. Selemenev* // Zhurnal fizicheskoj himii. – 2001. – T. 75. – No. 11. – P. 2080 – 2010. **3.** *Patent №2327738 RF* C12N11/00, C12N11/04, C12N11/12, C12N11/14 Sposob poluchenija immobilizovannoj 3-fruktofuranozidazy / *Korneeva O.S.* – No. 2006141092/13; zajavl. 20.11.2006; opubl. 27.06.2008. **4.** *Liang Y.Y.* Bioconjugation of papain on super paramagnetic nanoparticles decorated with carboxymethylateded citosan / *Y. Y. Liang, L.M. Zhang, Y.Y. Liang* // Biomacromolecules. 2007. – No. 8. – P. 1480 – 1486. **5.** *Sharma R.* Composition dependent magnetic properties of ironoxide-polyaniline nanoclusters / *R. Sharma, S. Lamba, S. Annapoorni* // J. Appl. Phys. – 2005. – No. 97. – P. 14311 – 14311.

Поступила (*Received*) *27.02.15*