



УДК 541.183.123.8

## Применение волокнистых полиэлектролитов в качестве носителей $\alpha$ -амилазы

Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Кучеренко Е.Ю., Лунина В.В.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

### Аннотация

Рассмотрены некоторые 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. Проведено сравнение каталитических свойств свободного и иммобилизованного фермента

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амилаза, волокнистые полиэлектролиты, адсорбционная иммобилизация, гетерогенный биокатализатор, супрамолекулярные комплексы, каталитическая активность

Some regularities of adsorbntional immobilization of  $\alpha$ -amylase hydrolyte enzyme on the ion-exchanger of fibrous structure were considered. The adsorbntional aptitude of supporters regarding the enzyme subject to the time of immobilization, pH and protein consentration was investigated. Comparison of catalyte properties of free and immobilized enzyme was carried out.

### Введение

В настоящее время ферментные препараты находят широкое применение во многих отраслях промышленности, медицине, сельском хозяйстве. В технологии пищевых продуктов и переработке растительного сырья особая роль принадлежит карбогидразам. В частности, фермент  $\alpha$ -амилаза ( $\alpha$ -1,4 – глюкоан – 4 – глюконогидролаза, К.Ф. 3.2.1.1) гидролизует  $\alpha$  –1,4 – гликозидные связи в крахмале и гликогене с образованием мальтозы и глюкозы [1].

Однако практическое использование нативных биокатализаторов имеет большие трудности, прежде всего это сложность и дороговизна получения достаточных количеств ферментов в чистом виде. Кроме того, приходится сталкиваться с тем, что ферменты при извлечении из природного микроокружения, где они включены в структуру биологических образований, быстро теряют свою активность. Существует и целый набор факторов, не позволяющих стать ферментам “технологичными” катализаторами [2].

Возрастающий интерес к процессу иммобилизации ферментов обусловлен значительными потенциальными возможностями при использовании специфических гетерогенных биокатализаторов, устойчивых к денатурирующим воздействиям среды. Исследование иммобилизации ферментов направлено прежде всего на

получение данных, касающихся оптимизации процесса, предполагающей эффективное сочетание носителя с различными условиями и параметрами системы, обеспечивающее максимальное сохранение активности гетерогенного фермента. Волокнистые ионообменники типа “Фибан” ранее были использованы при иммобилизации амилолитических ферментов глюкоамилазы и инулазы [3-5].

В данной работе представлены результаты адсорбционной иммобилизации  $\alpha$ -амилазы на волокнистых полиэлектролитах с различным типом функциональных групп.

## Эксперимент

В работе исследован гидролитический фермент  $\alpha$ -амилаза *oryzae*. В качестве носителей для иммобилизации  $\alpha$ -амилазы были использованы волокна: сульфокатионообменник К-1, амфолит К-3, содержащий в качестве функциональных  $-\text{NH}_2$ ,  $=\text{NH}$ ,  $\equiv\text{N}$  и  $-\text{COOH}$  группы и карбоксильный катионообменник К-4. Подготовку ионообменников к иммобилизации осуществляли путем кондиционирования и переводом ионообменников в нужную ионную форму [6].

Иммобилизацию  $\alpha$ -амилазы проводили адсорбционным методом в статических условиях при температуре 293 К. Соотношение раствор / сорбент было постоянным и составляло 20 мл / 0,2 г. Для поддержания определенного значения рН среды использовали ацетатный ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) буфер. Десорбция белка в буферные растворы составляла не более 5%. Общее количество белка в нативных ферментных препаратах определяли методом Лоури, в иммобилизованных ферментах – модифицированным методом Лоури [7]. Каталитическую активность  $\alpha$ -амилазы измеряли иодометрическим титрованием. Стандартное отклонение полученных результатов не превышало величину 0,01.

## Обсуждение результатов

При иммобилизации  $\alpha$ -амилазы на волокнистых полиэлектролитах в первую очередь было определено время достижения равновесия. Представленные на рис.1. кинетические кривые имеют форму, типичную для процессов адсорбции из растворов, происходящих на пористых поверхностях. Адсорбция представляет собой двухстадийный процесс, при этом первая стадия протекает с высокой скоростью, а затем процесс резко замедляется, и скорость второй стадии близка к нулю. Равновесие при иммобилизации амилазы на ионообменниках К-1, К-4 достигается в течение 40 мин, на К-3 – через 2 часа. Данное время было использовано в последующих сорбционных опытах.

Молекула  $\alpha$ -амилаза *oryzae* содержит 452 аминокислотных остатка и имеет ярко выраженную двухдоменную структуру. На границе доменов располагается активный центр, включающий радикалы аспарагиновой кислоты (рКа 3,2) и гистидина (рКв 6,9), а также  $\text{Ca}^{2+}$ - связывающий центр [8]. Область значений рН, при котором происходит связывание фермента с носителями, будет определяться степенью диссоциации функциональных групп активного центра. Проведенные исследования показали, что максимальная сорбция  $\alpha$ -амилазы происходит в области изоэлектрической точки белка при рН 5,0-5,5 для К-3, К-4 и 4,0 –5,0 для К-1 (рис.2). Расширение оптимального диапазона рН сорбции для К-1 связано с тем, что

сульфокатионообменник может применяться практически при любых значениях pH водных растворов.

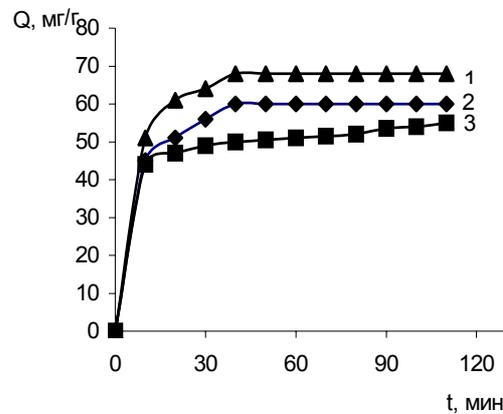


Рис.1. Кинетические кривые сорбции  $\alpha$ -амилазы волокнистыми ионообменниками: 1 – К-4, 2 – К-1, 3 – К-3.  
Q – количество сорбированной  $\alpha$ -амилазы, мг/г; t - продолжительность процесса, ч

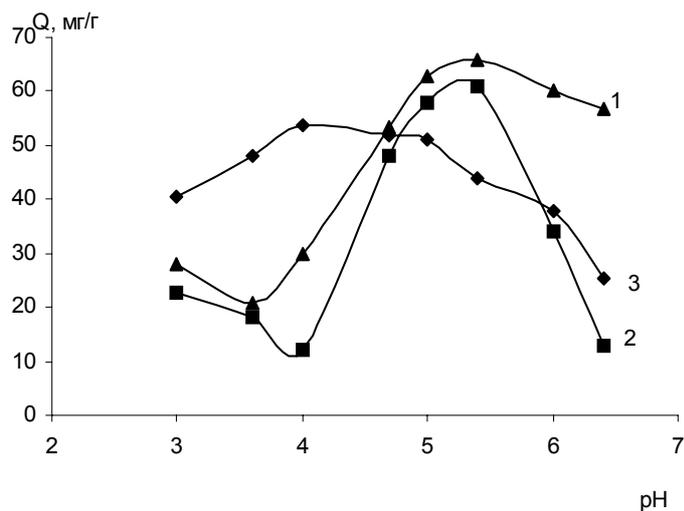


Рис.2. Зависимость количества сорбированной  $\alpha$ -амилазы (Q, мг/г) от pH равновесного раствора : 1 – К-4, 2 – К-1, 3 – К-3

Изотермы сорбции  $\alpha$ -амилазы представлены на рис.3. Зависимости имеют S-образную форму и удовлетворительно описываются уравнениями Фрейндлиха. В результате образования супрамолекулярных комплексов реализуются водородные, электростатические, вандер-ваальсовы, гидрофобные взаимодействия. Поверхность волокнистых сорбентов обеспечивает большую площадь контакта, множественность и комплементарность на уровне взаимодействий между носителем и белком. Наибольшее количество белка связывается с карбоксильным катионообменником К-4 (69,3 мг/г).

Целью иммобилизации фермента является осуществление гетерогенного супрамолекулярного катализа. Физическая форма, высокая механическая прочность, химическая и осмотическая стойкость волокон дают возможность использовать получаемый биокатализатор в непрерывных процессах, например, в реакторах

колоночного типа. Кроме того, ферменты, включенные в структуру волокон, защищены от инактивирующего воздействия микроорганизмов. Хотя межмолекулярные взаимодействия слабее, чем ковалентные связи, и супрамолекулярные ассоциаты менее стабильны термодинамически, однако они более лабильны кинетически и более гибки динамически [9]. Как показали опыты, иммобилизация  $\alpha$ -амилазы на рассматриваемых ионообменниках приводит к незначительному уменьшению каталитической активности по сравнению со свободным ферментом, что свидетельствует о сохранении структуры белка (табл. 1).

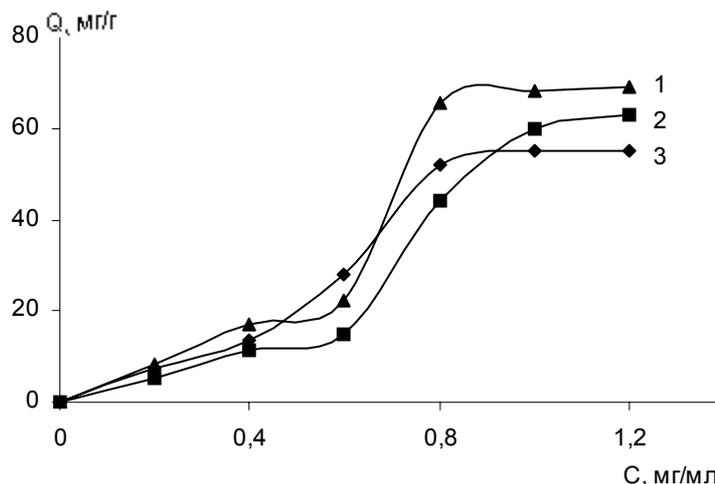


Рис.3. Изотермы сорбции  $\alpha$ -амилазы : 1 – К-4, 2 – К-1, 3 – К-3.  
С – исходная концентрация белка в растворе, мг / м л

Таблица 1. Каталитическая активность иммобилизованной  $\alpha$ -амилазы на волокнистых носителях

Иммобилизованная $\alpha$ -амилаза	Активность, Ед /мг	Процент сохранения активности, %
К-1	2025	81
К-3	1775	73
К-4	2175	87

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования рассматриваемых волокнистых ионообменников для иммобилизации  $\alpha$ -амилазы.

### Список литературы

1. Микробные ферменты и биотехнология / Под ред. В.М.Фогарти, К.Бек, К.Т.Кели и др. – М. : Агропромиздат, 1986. – 318 с.
2. Халгаш Я. Биокатализаторы в органическом синтезе. – М. : Мир, 1991. – 204 с.
3. Патент РФ N 2204600. С.12 N 11/08, 9/34. 2003. Способ получения иммобилизованной глюкоамилазы.
4. Особенности адсорбции инулазы на волокнистых полиэлектролитах / И.В. Шкутина [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2004. – Т.4, №4. – С. 422–427.

5. Шкутина И.В. Особенности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на волокнистых полиэлектролитах / И.В. Шкутина, О.Ф.Стойнова, В.Ф.Селеменев // Журнал прикладной химии. – 2005. – Т.78, №6. – С. 1003-1005.
6. Селеменев В.Ф. Практикум по ионному обмену / В.Ф. Селеменев [и др.]. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. у-та, 2004. – 160 с.
7. Chibata I. Industrial application of immobilized enzyme system / I. Chibata // Pure and Appl. Chem. – 1978. – Vol. 50, N 7. – P. 667–675.
8. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды / О.С.Корнеева. – Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. у-та, 2001. – 184 с.
9. Лен Ж.-М. Супрамолекулярная химия. – Новосибирск : Наука, 1998. – 334 с.