



УДК 541.183.123.8

## Влияние ионной формы полиамфолита АНКБ-2 на иммобилизацию ферментов

Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Лунина В.В.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 29.01.2009 г.

### Аннотация

Рассмотрена иммобилизация  $\alpha$ -амилазы на амфотерном полиэлектролите АНКБ-2 в разных ионных формах. Методом сканирующей растровой электронной микроскопии исследована поверхность носителей. Определена каталитическая активность гетерогенных биокатализаторов. Показано, что наибольшую активность проявляют ферменты (глюкоамилаза, инулаза, амилаза), иммобилизованные на кислотной форме сорбента АНКБ-2.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амилаза, полиамфолит, адсорбционная иммобилизация, сканирующая растровая электронная микроскопия, каталитическая активность

Immobilization of  $\alpha$ -amylase on the amphoteric polyelectrolyte ANKB-2 in various ion-forms was considered. By applying the method of scanning electronic microscopy the surfaces of the carries were investigated. The catalytic activity of heterogeneous biocatalysts was defined. It was stated that the upper-most activity is shown by the enzymes (such as glucoamylase, inylase, amylase) which are immobilized on acid form sorbent ANKB-2.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, polyampholyte, adsorptional immobilization, scanning electronic microscopy, catalytic activity

### Введение

Основой для создания принципиально новых биотехнологических процессов, альтернативных традиционным химическим производствам, могут служить гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных ферментов. Среди различных типов носителей, используемых для иммобилизации ферментов, одними из наиболее перспективных с технологической точки зрения служат ионообменные материалы. Достоинствами таких сорбентов являются: доступность, легкость регенерации, возможность многократного использования, инертность матрицы по отношению к микробной флоре. Наиболее изученными сорбентами, применяемыми для иммобилизации  $\alpha$ -амилазы, являются карбоксильные ионообменники [1,2]. Настоящая работа посвящена исследованию процесса адсорбции гидролитического фермента амилазы на амфотерном комплексобразующем ионообменнике АНКБ-2.

## Эксперимент

В работе исследован гидролитический фермент  $\alpha$ -амилаза *oryzae*. В качестве носителя для иммобилизации  $\alpha$ -амилазы был использован аминокарбоксильный полиэлектролит АНКБ-2 [3]. Подготовку ионообменника к иммобилизации осуществляли путем кондиционирования и переводом ионообменника в нужную ионную форму [4].

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 [5]. Стандартное отклонение полученных результатов не превышало величину 0,01.

Каталитическую активность  $\alpha$ -амилазы определяли фотометрическим методом [6]. Изменение содержания воды в ионообменниках контролировали гравиметрическим методом.

В работе для изучения поверхности сорбентов использовался сканирующий электронный микроскоп JSM-6380LV. Данный микроскоп – низковакуумная модификация (LV) электронного микроскопа JSM-6380, сочетающая в себе возможности работы как в стандартном, так и в LV режимах. Низковакуумный режим работы позволяет исследовать образцы без напыления токопроводящим слоем, в том числе биологические и полимерные материалы.

При подготовке образцов ионообменников для исследований на сканирующем электронном микроскопе они наносились на металлическую подложку с использованием токопроводящего клея. Поскольку гранульный сорбент, используемый в работе, является диэлектриком, на поверхность наносили напылением тонкую пленку электропроводника – золота. Исследования поверхности ионообменников проводили в глубоком вакууме при напряжении электронного пучка 20 кВ [7,8].

## Обсуждение результатов

Проведенные исследования по адсорбционной иммобилизации  $\alpha$ -амилазы на ионообменнике АНКБ-2 показали, что изотермы сорбции имеют S-образный вид и удовлетворительно описываются уравнением Фрейндлиха (рис.1). Первый адсорбционный слой формируется преимущественно за счет электростатических взаимодействий между носителем и ферментом. После окончания формирования мономолекулярного слоя сорбата получается модифицированный молекулами  $\alpha$ -амилазы сорбент. Точка перегиба на кривой сорбции соответствует завершению образования монослоя. Последующая иммобилизация происходит уже за счет взаимодействия молекул  $\alpha$ -амилазы друг с другом, которая может осуществляться в результате контакта как гидрофобных, так и гидрофильных частей молекул. Это приводит к образованию на поверхности сорбента полимолекулярных слоев за счет ассоциации молекул сорбата друг с другом.

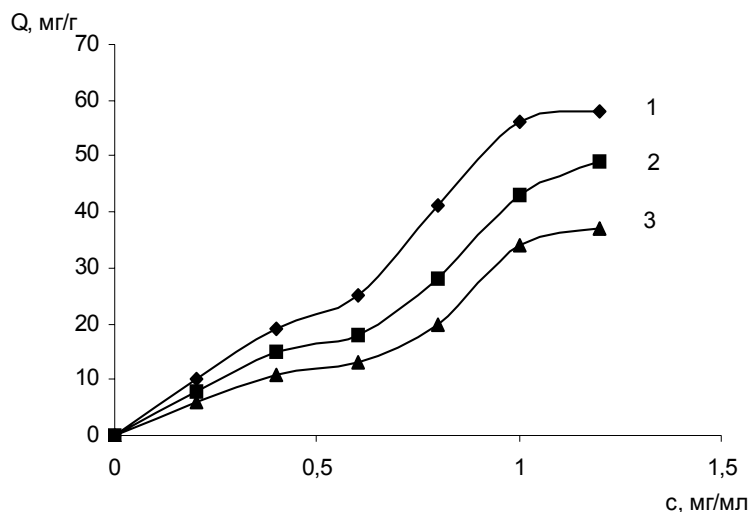
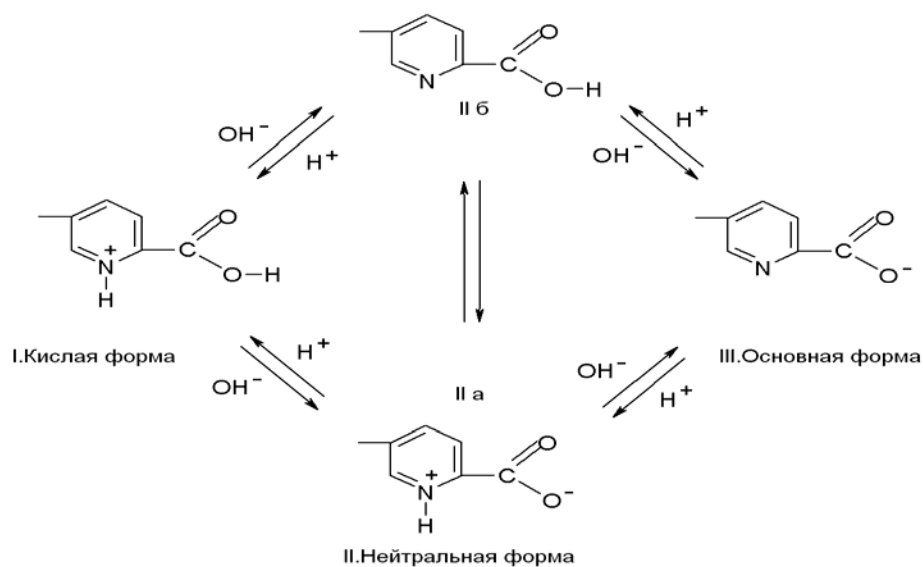


Рис. 1. Изотермы сорбции амилазы на АНКБ-2 при pH 4,7:  
1 – H-Cl, 2 – Na-OH, 3 – H-OH.

Q – количество сорбированной амилазы, мг/г; c – исходная концентрация белка в растворе, мг/мл.

Амфотерный ионообменник АНКБ-2 может существовать в кислотной (H-Cl), нейтральной (H-OH) и основной форме (Na-OH), которые представлены на нижеприведенной схеме.



Формы существования полиамфолита АНКБ-2 в растворе в зависимости от кислотности среды

Для гранульного полиамфолита АНКБ-2 лучшей сорбционной способностью по отношению к  $\alpha$ -амилазе обладает H-Cl-форма. Данный факт, вероятно, объясняется перезарядкой ионов при сорбции белка ионообменником. В соответствии с этим предположением дипольный ион превращается в катион и вступает во взаимодействие с отрицательно заряженной карбоксильной группой сорбента. Таким образом, исчезает электростатическое отталкивание, которое имеет место в том случае, когда цвиттер-ион приближается к отрицательно заряженному носителю.

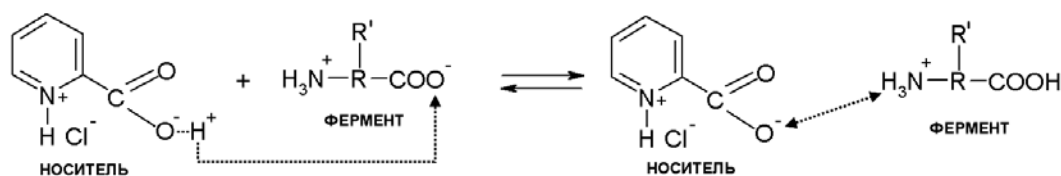


Схема перезарядки ионов при сорбции  $\alpha$ -амилазы ионообменником АНКБ-2 в Н-Сl-форме

Минимальной емкостью по отношению к  $\alpha$ -амилазе обладает Н-ОН-форма АНКБ-2. НОН-форма полиамфолита АНКБ-2 может существовать в незаряженной форме и в форме внутренней соли при переходе протона от карбоксильной группы к гетероатому азота. При этом сорбция в обоих случаях за счёт ионогенных взаимодействий будет затруднена.

Вышеописанный механизм сорбции фермента подтверждают исследования поверхности сорбента с помощью растровой электронной микроскопии. Как видно из рис. 2,3, при сорбции фермента из раствора с концентрацией (0,4 мг/мл) на полиамфолите АНКБ-2 в Na-ОН-форме формирование мономолекулярного слоя приводит лишь к незначительному изменению структуры поверхности сорбента. Однако, уже здесь можно увидеть, как слой фермента «загораживает» первоначальный вид поверхности полиамфолита. При сорбции фермента из раствора с максимальной концентрацией (1,2 мг/мл) вид поверхности носителя полностью изменяется за счёт образования на ней в ходе взаимодействий сорбат–сорбат ровной полимолекулярной пленки  $\alpha$ -амилазы, полностью скрывающей все поры ионообменника. Наиболее существенные изменения поверхности сорбента при сорбции  $\alpha$ -амилазы можно наблюдать для полиамфолита АНКБ-2 в Н-Сl-форме.

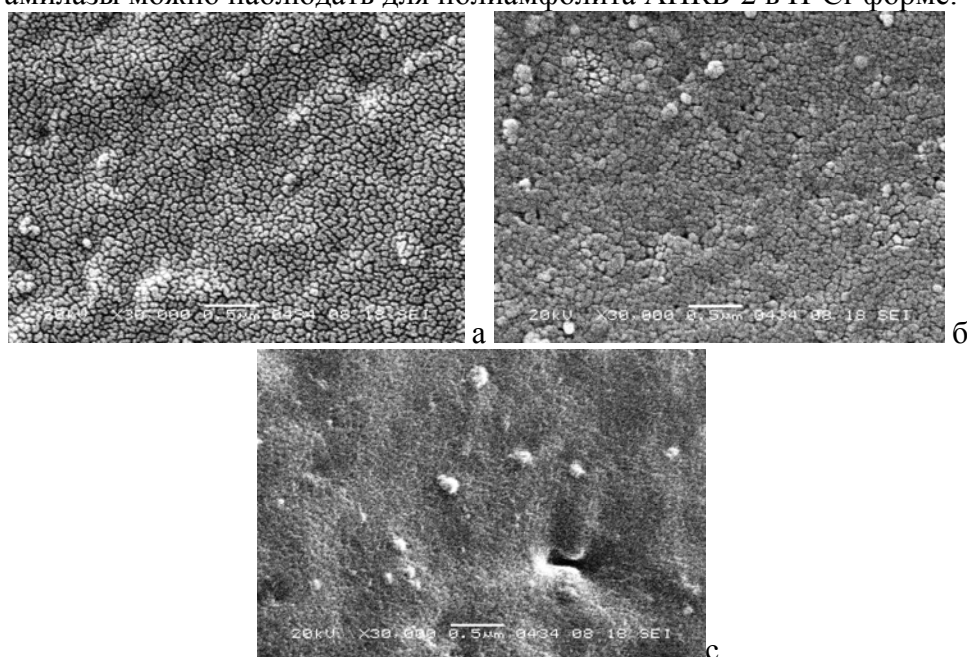


Рис. 2. Электронные микрофотографии поверхности полиамфолита АНКБ-2 в Na-ОН-форме (увеличение  $\times 30000$ ): а – чистый сорбент; б – после сорбции из раствора с  $c=0,4$  мг/мл; с – после сорбции из раствора с  $c=1,2$  мг/мл)

Одновременно с опытами по сорбции был проведен гравиметрический контроль содержания воды в сорбентах (рис.4). Адсорбция белка на полиамфолите

приводит к существенной дегидратации носителя, что свидетельствует об упрочении связи амилаза-сорбент.

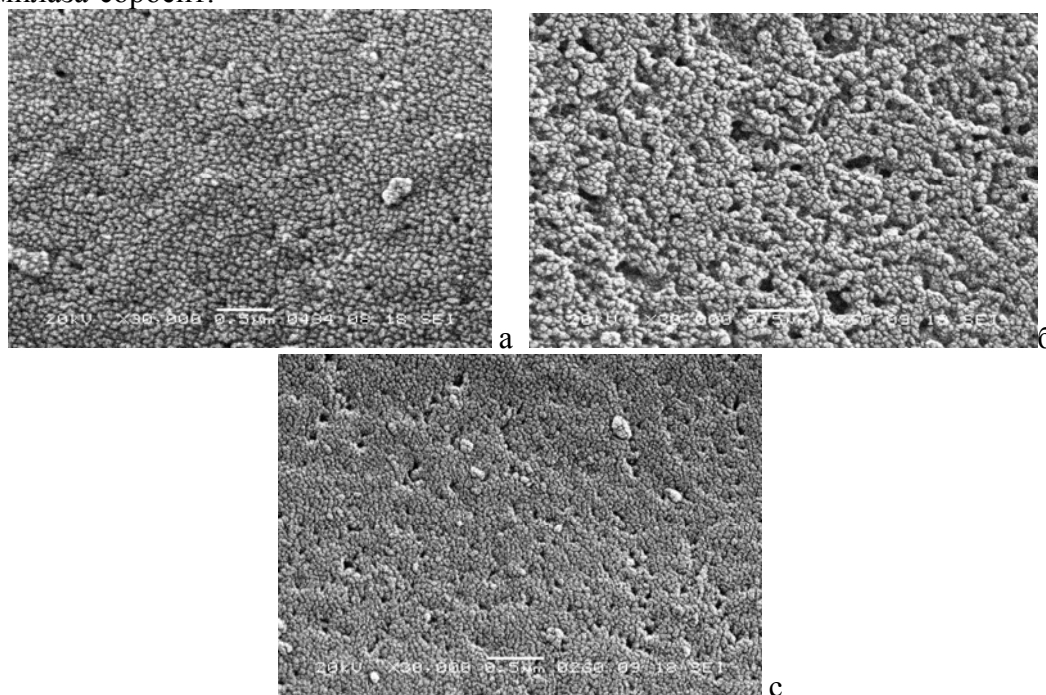


Рис. 3. Электронные микрофотографии поверхности полиамфолита АНКБ-2 в Н-Сl-форме (увеличение  $\times 30000$ ): а – чистый сорбент; б – после сорбции из раствора с  $c=0,4$  мг/мл; с – после сорбции из раствора с  $c=1,2$  мг/мл)

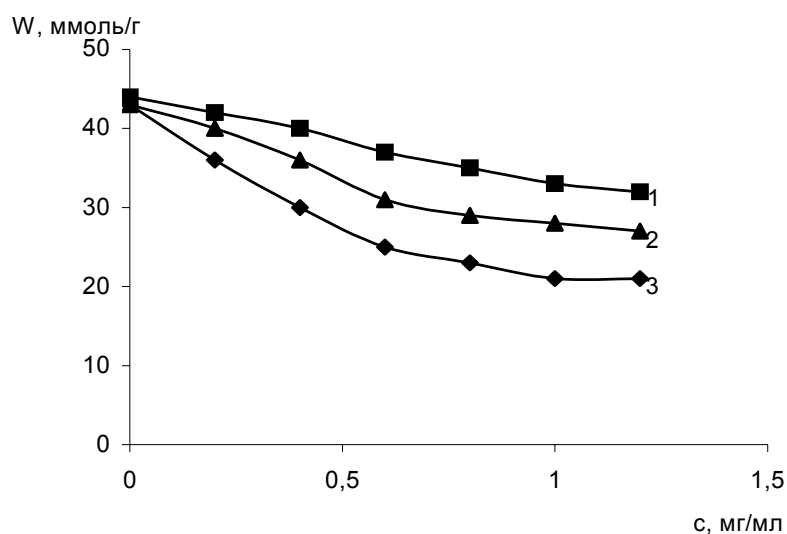


Рис. 4. Изменение содержания воды в ионообменниках при сорбции амилазы: 1 – Н-ОН, 2 – Na-ОН, 3 – Н-Сl. W – количество воды в сорбенте, ммоль/г; с – исходная концентрация белка в растворе, мг/м л

Основными стабилизирующими факторами иммобилизованных ферментов считаются защита от действия микроорганизмов, недоступность ферментов для действия ингибиторов и непосредственное влияние матрицы на конформацию белковой молекулы. Однако при иммобилизации каталитическая активность ферментов, как правило, может существенно снижаться. Потеря каталитических свойств может происходить как в результате неспецифической ассоциации в

адсорбционных слоях и образования неактивных олигомеров, так и вследствие изменения структуры белковых глобул при взаимодействии с носителем.

Было установлено, что иммобилизованная  $\alpha$ -амилаза проявляет максимальную каталитическую активность в диапазоне значений pH субстрата 4,7–5,0, и на всех исследуемых носителях сохраняется довольно высокая активность  $\alpha$ -амилазы (табл.). Для  $\alpha$ -амилазы, иммобилизованной на H-Cl форме ионообменника, активность составляла 75% и являлась максимальной из всех форм.

Ранее нами были проведены исследования по адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы и инулазы на полиэлектролите АНКБ-2 (табл.) [9,10].

Таблица. Иммобилизация карбогидраз адсорбционным методом на АНКБ-2

Фермент	Форма ионообменника	Количество иммобилизованной амилазы, мг/г	Процент сохранения активности, %
Амилаза	H-Cl	58	75
	H-OH	37	57
	Na-OH	49	61
Глюкоамилаза	H-Cl	6,8	79
	H-OH	3,2	40
	Na-OH	5,3	58
Инулаза	H-Cl	6,4	63
	H-OH	2,3	36
	Na-OH	4,5	47

Таким образом, сравнивая значения сорбционной способности и каталитической активности карбогидраз, иммобилизованных на различных формах полиамфолита, следует отметить, что для иммобилизации амилолитических ферментов предпочтительно использовать кислотно-хлоридную форму ионообменника АНКБ-2.

### Список литературы

1. Киселева Е.М., Миргородская О.А., Момот Н.Н., Москвичев Б.В., Самсонов Г.В. Изучение сорбции бактериальной  $\alpha$ -амилазы на карбоксильных катионитах // Прикладная биохимия и микробиология. 1978. Т.14. № 5. С. 730 -734.
2. Потехина Т.С. Изучение взаимодействия  $\alpha$ -амилаз с катионитами различной структуры // Прикладная биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 5. С. 579-583.
3. Салдадзе К.М., Копылова-Валова В.Д. Комплексообразующие иониты (комплекситы) // М. : Химия. 1980. 336 с.
4. Селеменев В.Ф., Славинская Г.В., Хохлов и др. Практикум по ионному обмену. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. у-та, 2004. 160 с.
5. Chibata I. Industrial application of immobilized enzyme system // Pure and Appl. Chem. 1978. Vol. 50. N 7. P. 667— 675.
6. ГОСТ Р 51228-98 (ИСО 3983-77) от 15.12.98. №447. Зерно и зерновые продукты. Фотометрический метод определения активности  $\alpha$ -амилазы.
7. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. М : Мир. 2003. 684 с.
8. Бушнев Л.С., Колобов Ю.Р., Мышляев М.М. Основы электронной микроскопии : учебное пособие. Томск : Изд-во Том. ун-та. 1990. 218 с.

9. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф., Григорьева Г.А. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах. Журнал физической химии. 2001. Т.75. №11. С.2008 - 2010.

10. Стоянова О.Ф., Шкутина И.В., Селеменев В.Ф., Меркулова Ю.Д. Гетерогенные катализаторы на основе амфотерных ионообменников // Сорбционные и хроматографические процессы. 2004. Т.4. №5. С.667-671.

---

**Шкутина Ирина Викторовна** – к.б.н., доц. кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. (4732) 20-89-32

**Стоянова Ольга Федоровна** – к.х.н., доц. кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. (4732) 20-98-32

**Лунина Вероника Викторовна** – магистрант кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж

**Shkutina Irina V.** – Assistant Professor, Candidate of Biological Science, Department of analytic chemistry, Voronezh State University

**Stoyanova Olga F.** - Assistant Professor Candidate of Chemical Science, Department of analytic chemistry, Voronezh State University

**Lunina Veronica V.** – Master of Chemistry, Department of analytic chemistry, Voronezh State University