

УДК 541.18.045+577.15

ІММОБІЛІЗАЦІЯ α -АМІЛАЗИ НА ЦЕЛЮЛОЗНИХ МЕМБРАНАХ, МОДИФІКОВАНИХ ХІТОЗАНОМ ТА CIBACRON BLUE F3G-A

В. В. Коновалова¹**К. Є. Гузикевич**¹**Г. А. Побігай**¹**А. Ф. Бурбан**¹**С. Т. Олійничук**²¹Національний університет «Києво-Могилянська академія»,
Центр мембранних досліджень, Київ²Український науково-дослідний інститут спирту
і біотехнологій продовольчих продуктів, Київ*E-mail: vita@ukma.kiev.ua*

Розроблено метод одержання афінних мембран, що базується на ковалентному зв'язуванні хітозану з поверхнею целюлозних мембран та закріпленні барвника Cibacron Blue F3G-A як афінного ліганду. Досліджено транспортні та поверхневі властивості модифікованих мембран. Підібрано оптимальні умови іммобілізації α -амілази: рН та концентрація розчину модифікування 3,5 та 1 мг/см³, відповідно. Мембрани з іммобілізованим ензимом характеризуються високим ступенем розщеплення крохмалю, що становить 84% для нерегенованої мембрани.

Ключові слова: іммобілізація ензимів, α -амілаза, афінні мембрани.

Останнім часом розроблення способів одержання мембран з поверхневими функціональними групами привертає значну увагу дослідників для вирішення багатьох наукових та практичних завдань [1–3]. Більшість сучасних промислових полімерних мембран на основі полісульфону, поліетерсульфону, поліетилену, нейлону тощо мають задовільну хімічну, термо- та механічну стійкість, однак відсутність реакційноздатних груп на поверхні суттєво обмежує їх застосування під час розроблення нових технологій. Значна кількість відомих способів модифікування поверхні полімерних мембран з використанням різноманітних видів жорсткої фізичної та хімічної обробки може спричинити зміни в морфології мембран [4]. Окрім того, таким мембранам притаманна підвищена неселективна сорбція до протеїнових речовин, а тому вони потребують гідрофілізації. На відміну від багатьох гідрофобних мембран, мембрани на основі целюлози та її похідних характеризуються низькою неспецифічною сорбцією до протеїну, високим рівнем гідрофільності та містять реакційноздатні гідроксильні групи. Іммобілізація на поверхні целюлозних мембран реакційноздатних аміно- та сульфогруп створює широкі можливості для надання їм специфічних функціональних властивостей.

Так, іммобілізація ензимів на поверхні полімерних мембран дає змогу отримувати біокаталітичні, афінні, рН-чутливі, біосенсорні та інші мембрани [5–6]. Афінна хроматографія — загальновідомий метод іммобілізації, виділення, очищення та ідентифікації протеїнових молекул. За цим методом молекулу (ліганд), що має здатність до розпізнавання, закріплюють на нерозчинній матриці, зазвичай на полімерних матеріалах. Протеїнові молекули адсорбуються на ліганді і таким чином виділяються із вихідного середовища. Зміна рН та іонної сили розчину призводить до десорбції іммобілізованих біомолекул. Як ліганд можна використовувати різні функціональні молекули, у тому числі ензими, коензими, кофактори, антитіла, аміно- та нуклеокислоти, поліпептиди. Альтернативою природним лігандам, що залишаються досить дорогими і в більшості випадків специфічними, є застосування синтетичних барвників [7]. Ліганди на основі барвників здатні зв'язувати більшість типів протеїнів та ензимів, дешеві у використанні та закріплюються на матрицях, що містять гідроксильні групи.

Целюлозні мембрани широко використовують як механічну підкладку в композиційних мембранах для очищення протеїнів, але як основа для афінної хроматографії вони мають низьку зв'язувальну ємність [8].

У роботі [9] авторами було розроблено целюлозні композиційні мембрани з іммобілізованим полігліцедилметакрилатом для афінного очищення імуноглобуліну із сироватки крові людини.

Останнім часом також досліджують мембрани на основі хітозану та хітину [10]. Ці матеріали мають високу зв'язувальну ємність завдяки присутності у молекулі хітозану як аміно-, так і гідроксильних груп, що уможливорює закріплення ліганду в м'яких умовах, проте слабкі механічні властивості таких мембран перешкоджають їх широкому застосуванню.

Метою цієї роботи є дослідження умов іммобілізації α -амілази на промислових целюлозних мембранах методом афінної хроматографії. Лігандом слугував барвник Cibacron Blue F3G-A, закріплений на целюлозній мембрані, модифікованій хітозаном. Іммобілізацію хітозану на целюлозних мембранах проводили ковалентним зв'язуванням барвника з поверхнею мембрани.

Матеріали і методи

Реактиви та матеріали

У роботі для дослідження процесу модифікування поверхні використовували целюлозні мембрани марки C010F (виробництво Microdyn-Nadir, Німеччина) з відсікальною здатністю за молекулярною масою (cut off) 10 кДа, перйодат натрію NaJO_4 (Sigma, США), хітозан з молекулярною масою 400 кДа (Fluka, Швейцарія), барвник Cibacron Blue F3G-A (Fluka) з молекулярною масою 774 Да, бактеріальну (*Bacillus subtilis*) α -амілазу (Fluka) з молекулярною масою 50 кДа та ензиматичною активністю 58 У/мг, поліетиленгліколь (ПЕГ) з молекулярною масою 4000 Да (Fluka).

Для визначення транспортних та біокаталітичних властивостей, водопроникності J_w та коефіцієнта затримки R , ступеня конверсії крохмалю α , характеристик мембран застосовували стандартну ультрафільтраційну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8200 (Millipore, США).

Метод модифікування

Для окиснення целюлози в діальдегідцелюлозу використовували 0,1 М перйодат натрію. Окиснення проводили при температурі 55 °С протягом 1 год.

Окиснені мембрани витримували в розчині хітозану при кімнатній температурі протягом 20 год. Як модифікуючий розчин використовували 1% (мас) розчин хітозану

в 1% -й оцтовій кислоті. Після модифікування мембрани відмивали в дистильованій воді протягом 1 год.

Мембрани з прищепленим хітозаном витримували в розчині барвника Cibacron Blue F3G-A (рис. 1) протягом 1 год при температурі 55 °С. Розчин барвника готували таким чином: 1 г барвника розчиняли в 100 см³ дистильованої води, додавали 1,2 г хлориду натрію та 0,4 г карбонату натрію. Після модифікування мембрани відмивали в дистильованій воді до знебарвлення промивного розчину.

Модифіковані мембрани витримували в розчині α -амілази з концентрацією від 0,1 до 1 мг/мл при кімнатній температурі протягом 2 год; рН розчину змінювали від 2 до 5.

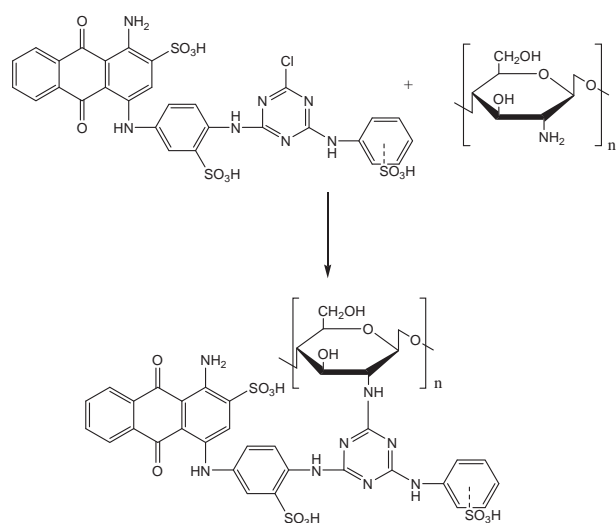


Рис. 1. Ковалентне зв'язування молекули барвника Cibacron Blue F3G-A з молекулою хітозану

Методика деіммобілізації α -амілази

Мембрани з іммобілізованим ензимом витримували в 0,5 М розчині роданіду калію (елюати) та протягом 1 год струщували за допомогою шейкера.

Аналітичні методи

Дослідження поверхневих шарів зразків мембран проводили на спектрометрі Tensor-37 (Bruker, Німеччина) методом багаторазового порушеного повного відбиття. Цей метод дозволяє отримати ІЧ-спектри відбиття з поверхневого шару зразка до глибини близько 2–3 мкм.

Вимірювання ξ -потенціалу поверхні модифікованих та немодифікованих мембран здійснювали на електрокінетичному аналізаторі Anton-Paar ЕКА Streaming Potential Meter (Австрія) відносно водного $1 \cdot 10^{-3}$ М розчину хлориду калію.

Наступні дослідження целюлозних мембран з прищепленим хітозаном та барвником Cibacron Blue F3G-A проводили з метою вивчення їхніх транспортних та поверхневих властивостей. Результати їх свідчать, що прищеплення хітозану до поверхні мембран супроводжується суттєвим зниженням водопроникності мембрани (табл. 1). Зміна цього параметра може опосередковано свідчити про ступінь модифікування мембрани: чим більша величина падіння водопроникності модифікованої мембрани порівняно з немодифікованою, тим більшою мірою хітозан прищеплюється до поверхні мембрани. Попередні дослідження показали, що оптимальними параметрами модифікування целюлозних мембран є концентрація модифікуючого розчину хітозану 1% та тривалість модифікування 20 год [11].

Таблиця 1. Зміна водопроникності (Jw) та коефіцієнта затримки (R) мембран, модифікованих хітозаном (робочий тиск 200 кПа)

Мембрана	Jw, л/м ² год	R _{NaCl} , %	R _{MgCl₂} , %	R _{ПЕГ4000} , %
Модифікована	23,8	13,4	30,7	90,75
Немодифікована	50	3,4	6,3	56

Мембрани, модифіковані хітозаном, мають коефіцієнт затримки ПЕГ₄₀₀₀ 90,75%, виходячи з чого можна стверджувати, що відсікальна здатність за молекулярною масою отриманої мембрани становить 4 000, тимчасом як немодифікованої мембрани — 10 000. Це вказує на те, що на мембранній поверхні формується тонкий селективний шар з хімічно прищепленого хітозану. Водночас мембрани виявляють суттєву затримку щодо електролітів типу 1:1 та 2:1. Так, коефіцієнт затримки хлориду натрію та хлориду магнію становить 13,4 та 30,7%, відповідно. Збільшення коефіцієнта затримки електроліту на мембрані, модифікованій хітозаном, свідчить про наявність заряджених груп на її поверхні.

Це припущення також підтверджує результати вимірювання ξ -потенціалу поверхні модифікованих мембран. Закріплення хітозану на поверхні мембрани призводить до зростання її ξ -потенціалу поверхні порівняно з немодифікованою мембраною з -13,66 до 6,33 мВ (табл. 2). Подальше ковалентне зв'язування барвника Cibacron Blue F3G-A з іммобілізованим хітозаном, що містить у своєму складі негативно заряджені сульфогрупи, знижує ξ -потенціал поверхні до -15,8 мВ.

Таблиця 2. Зміна величини заряду поверхні целюлозних мембран у процесі модифікування та іммобілізації α -амілази

Мембрана C010F	Немодифікована	Модифікована хітозаном	Модифікована хітозаном та барвником Cibacron Blue F3G-A	Модифікована хітозаном 161, барвником Cibacron Blue F3G-A та α -амілазою
ξ -Потенціал, мВ	-13,66±0,64	6,33±1,37	-15,81±0,96	-14,65±1,26

Примітка. Умови вимірювання: електроліт -0,001M KCl; рН = 6; електропровідність =25,22 μ Sm.

Після закріплення ліганду Cibacron Blue F3G-A на модифікованих хітозаном целюлозних мембранах проводили дослідження іммобілізації α -амілази на поверхні отриманих афінних мембран.

Зважаючи на амфолітичні властивості протеїнів, заряд поверхні мембран з іммобілізованою α -амілазою суттєво залежить від рН середовища. У кислому середовищі у разі зміни рН від 2 до 4 заряд поверхні мембран є позитивним і становить 10–15 мВ. У лужному середовищі заряд поверхні мембрани характеризується негативним ξ -потенціалом, величина якого сягає -20 мВ, рН = 10 (рис. 3).

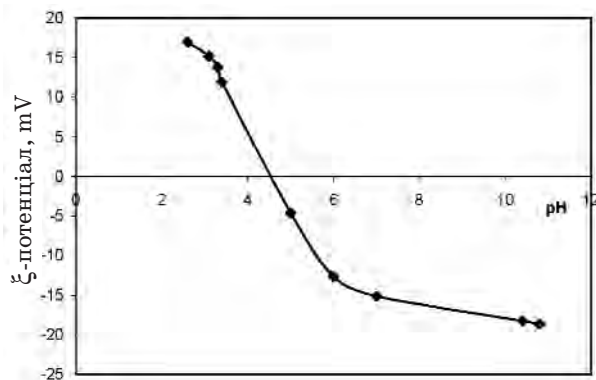


Рис. 3. Дослідження зміни заряду поверхні мембран C010F з прищепленим хітозаном, барвником Cibacron Blue F3G-A та іммобілізованою α -амілазою залежно від рН

Визначення оптимальних параметрів іммобілізації α -амілази у процесі модифікування целюлозних мембран з барвником Cibacron Blue F3G-A

Біокаталітичні властивості мембран залежать від кількості ензиму, іммобілізованого на одиниці поверхні, яка, за таким способом, визначатиметься передусім рН та концентрацією модифікуючого розчину. Зважаючи на те, що мембрана, модифікована хітозаном та барвником Cibacron Blue F3G-A, має негативний заряд поверхні завдяки наявності сульфогруп у структурі барвника, іммобілізацію амілази краще проводити в кислому середовищі, в якому вона має позитивний заряд. Каталітичні властивості іммобілізованої α -амілази оцінювали за ступенем розщеплення крохмалю на мембрані, який визначали як відношення кількості гідролізованого крохмалю до його початкової кількості.

Як видно з рис. 4, рН модифікуючого розчину ензиму суттєво впливає на біокаталітичні властивості мембрани. Так, ступінь розщеплення крохмалю на біокаталітичній мембрані зростає від 44 до 58% у разі збільшення рН модифікуючого розчину від 3 до 3,5.

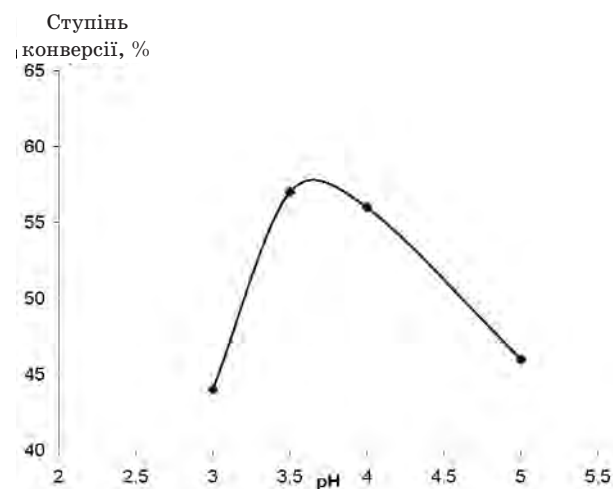


Рис. 4. Залежність ступеня розщеплення крохмалю на мембрані з іммобілізованою α -амілазою від рН модифікуючого розчину ($\Delta P = 0,1$ МПа). Початкова концентрація протеїну 0,2 мг/мл, крохмалю — 1г/л

Подальше збільшення рН розчину модифікування призводить до зниження біокаталітичної активності. Це пов'язано з величиною ізоелектричної точки протеїну, яка для бактеріальної α -амілази становить 3,7–3,9. Відомо, що в ізоелектричній точці

протеїни не мають заряду, тому максимальна адсорбція їх із водних розчинів найчастіше відбувається при значеннях рН, близьких до ізоелектричної точки.

Каталітична активність іммобілізованого на мембрані протеїну також залежить від початкової концентрації α -амілази в розчині (рис. 5). Для визначення оптимальних параметрів іммобілізації концентрацію протеїну в розчині змінювали від 0,1 до 1мг/см³. Так, ступінь розщеплення крохмалю під час ультрафільтрації його через мембрану з іммобілізованою α -амілазою тим вища, чим більша концентрація ензиму в модифікуючому розчині. За концентрації 0,1мг/см³ ступінь розщеплення крохмалю становить 35 та 30% для мембран, модифікованих при рН 3,5 та 5, відповідно. Збільшення концентрації модифікуючого розчину в 10 разів призводить до підвищення біокаталітичної активності на 50% і становить 84 та 80% для мембран, модифікованих при рН 3,5 та 5, відповідно.

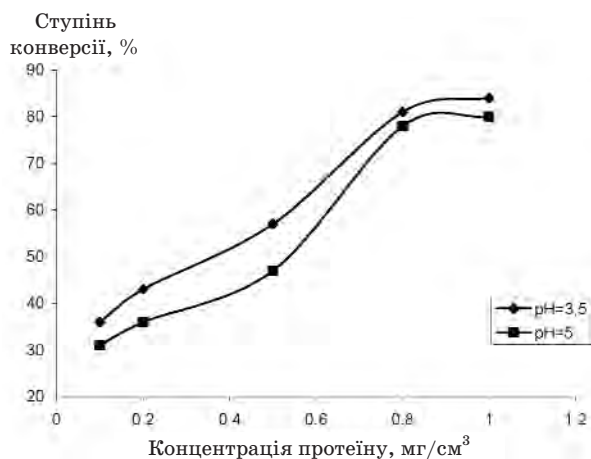


Рис. 5. Залежність ступеня розщеплення крохмалю на мембрані з іммобілізованою α -амілазою від початкової концентрації розчину модифікування

Отже, оптимальними умовами іммобілізації α -амілази на целюлозних мембранах, модифікованих хітозаном та барвником Cibacron Blue F3G-A за цим способом, є рН і концентрація розчину модифікування 3,5 та 1 мг/см³, відповідно.

Дослідження стабільності мембран з іммобілізованою α -амілазою та параметрів їх регенерації

Відомо [15], що ензими в іммобілізованому стані значно стабільніші порівняно з вільними молекулами, однак пряма залежність між зміною стабільності та активності не є загальним правилом.

Стабільність іммобілізованого ензиму вивчали ультрафільтрацією розчину крох-

малю з концентрацією 1 мг/см³ через біокаталітичну мембрану, після чого досліджували ступінь розщеплення крохмалю.

Як видно з рис. 6, нерегенована мембрана характеризується високим початковим ступенем розщеплення крохмалю — 84%. У процесі роботи α-амілаза досить стабільна, біокаталітична активність мембрани падає поступово. Падіння активності становить 30% після відбору 1 400 мл пермеату. Кожна наступна регенерація іммобілізованого ензиму також призводить до падіння каталітичної активності мембрани на 8–10%. Так, після третьої регенерації ступінь розщеплення крохмалю на тій самій мембрані становить близько 60%.

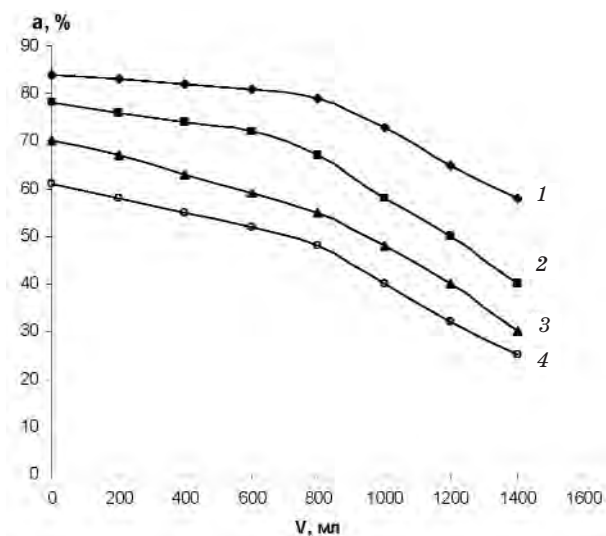


Рис. 6. Залежність ступеня розщеплення крохмалю від об'єму субстрату, пропущеного через мембрану з іммобілізованою α-амілазою (ΔP = 0,1 МПа): 1 — нерегенована мембрана; 2 — мембрана після першої регенерації; 3 — мембрана після другої регенерації; 4 — мембрана після третьої регенерації

Адсорбційно-десорбційний цикл α-амілази на мембранах, модифікованих хітозаном та барвником Cibacron Blue F3G-A, проводили чотириразово в 0,5М розчині KSCN для вивчення можливості їх багаторазового використання. Як видно з рис. 7, адсорбційна ємність афінних мембран незначною мірою, але поступово зменшується з кожним циклом проведеної адсорбції–десорбції. Кількість десорбованого протеїну в елюаті становить 90% від кількості адсорбованого, а тому можна стверджувати, що модифіковані за таким способом афінні мембрани можна повторно використовувати після їх регенерації.

У результаті проведених досліджень розроблено методику одержання афінних

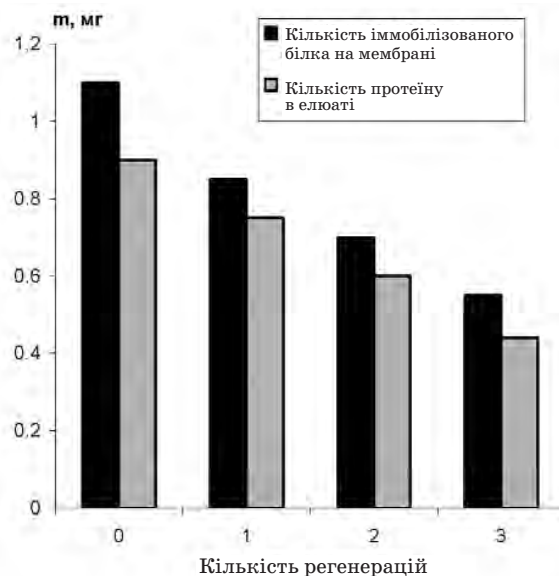


Рис. 7. Кількість протеїну, адсорбованого-десорбованого на мембрані, модифікованій хітозаном та Cibacron Blue F3G-A

напівпроникних целюлозних мембран з поверхневими функціональними властивостями. Метод базується на ковалентному зв'язуванні хітозану з поверхнею целюлозних мембран та закріпленні барвника Cibacron Blue F3G-A як афінного ліганду. Досліджено транспортні та поверхневі властивості модифікованих мембран. Показано, що найбільший вплив на розділювальні характеристики мембран має іммобілізація на поверхні хітозану, яка призводить до падіння продуктивності мембрани, зменшення її відокремлювальної здатності з 10 000 до 4 000 та збільшення коефіцієнта затримки стосовно низькомолекулярних електролітів. Показано, що в процесі модифікування відбувається зміна заряду поверхні мембрани до позитивних значень — після іммобілізації хітозану, за наявності аміногруп — та в зворотному напрямку до негативних значень — після закріплення барвника, що містить сульфогрупи.

Проведено іммобілізацію α-амілази на одержаних афінних мембранах. Підбрано оптимальні умови іммобілізації ензиму за цим способом, рН та концентрація розчину модифікування 3,5 та 1мг/см³, відповідно. Мембрани з іммобілізованою α-амілазою характеризуються високим ступенем розщеплення крохмалю, що становить 84% для нерегенованої мембрани. Регенерування мембрани не змінює її механічні та хімічні властивості. Експерименти в динамічному режимі підтверджують стабільність та біокаталітичну активність іммобілізованої α-амілази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Avramescu M. E., Sager W. F. C., Mulder M. H. V., Wessling M. Preparation of ethylene vinylalcohol copolymer membranes suitable for ligand coupling in affinity separation // *J. Membr. Sci.* — 2002. — V. 210. — P. 155–173.
2. Roper D. K., Lightfoot E. N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes // *J. Chromatogr. A.* — 1995. — V. 702. — P. 3–26.
3. Suen S.-Y., Liu Y.-C., Chang C.-S. Exploiting immobilized metal affinity membranes for the isolation or purification of therapeutically relevant species // *J. Chromatogr. B.* — 2003. — V. 797. — P. 305–319.
4. Matsuyama H., Berghmans S., Lloyd D. R. Formation of hydrophilic microporous membranes via thermally induced phase separation // *J. Membr. Sci.* — 1998. — V. 142. — P. 213–224.
5. Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D., Sanchez J. Progress in enzymatic membrane reactors — a review // *Ibid.* — 2004. — V. 242. P. 189–196.
6. Liu Y.-C., Suen Sh.-Y., Huang Ch.-W., Chien Ch. Effects of spacer arm on penicillin G acylase purification using immobilized metal affinity membranes // *Ibid.* — 2005. — V. 251. — P. 201–207.
7. Denizli A., Piskin Er. Dye-ligand affinity systems // *J. Biochem. Biophys. Meth.* — 2001. — V. 49. — P. 391–416.
8. Liu Ch, Bai R. Preparation of chitosan/cellulose acetate blend hollow fibers for adsorptive performance // *J. Membr. Sci.* — 2005. — V. 267. — P. 68–77.
9. Jia L., Yang L., Zou H. et al. Protein A tangential flow affinity cartridge for extracorporeal immunoabsorption therapy // *Biomed. Chromatogr.* — 1999. — V. 13. — P. 472–478.
10. Ruchenstein E., Zeng X. Albumin separation Cibacron Blue carrying macroporous chitosane and chitin affinity membranes // *J. Membr. Sci.* — 1998. — V. 142. — P. 13–26.
11. Коновалова В. В., Побігай Г. А., Брик М. Т., Бурбан А. Ф. Модифікування целюлозних мембран хітозаном та їх антимікробні властивості // *Доповіді АН України.* — 2005. — №11. — С. 134–139.

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ α -АМИЛАЗЫ
НА ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАНАХ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХИТОЗАНОМ
И CIBACRON BLUE F3G-A**

В. В. Коновалова¹, К. Е. Гузикевич¹,
Г. А. Побігай¹, А. Ф. Бурбан¹,
С. Т. Олійничук²

¹Национальный университет
«Киево-Могилянская академия»,

Центр мембранных исследований, Киев

²Украинский научно-исследовательский институт спирта и биотехнологий продовольственных продуктов, Киев

E-mail: vita@ukma.kiev.ua

Разработан метод получения аффинных мембран, базирующийся на ковалентном связывании хитозана с поверхностью целлюлозных мембран и закреплении красителя Cibacron Blue F3G-A в качестве аффинного лиганда. Исследованы транспортные и поверхностные свойства модифицированных мембран. Подобраны оптимальные условия иммобилизации α -амилазы: pH и концентрация раствора 3,5 и 1 мг/см³, соответственно. Мембраны с иммобилизованным энзимом характеризуются высокой степенью расщепления крахмала, которая составляет 84% для нерегенерированной мембраны.

Ключевые слова: иммобилизация энзимов, α -амилаза, аффинные мембраны.

**α -AMILASE IMMOBILIZATION
ON CELLULOSE MEMBRANES
MODIFIED BY CHITOSANE
AND CIBACRON BLUE F3G-A**

V. V. Konovalova¹, K. E. Guzikevich¹,
G. A. Pobigay¹, A. F. Burban¹,
S. T. Oliynichuk²

¹National University of Kiev Mohyla-Academy,
Membrane Research Center, Kyiv

²Ukrainian research institute of alcohol
and biotechnology of foods, Kyiv

E-mail: vita@ukma.kiev.ua

A method of the affinity membranes producing based on chitosane covalent bonding with cellulose membranes surface and Cibacron Blue F3G-A dye fixing as affine ligand has been developed. Transport and surface properties of the modified membranes have been studied. Optimum α -amilase immobilization is found to be the following: pH and solution concentration are 3.5 and 1 mg/sm³ respectively. Starch conversion of unregenerated membranes with immobilized enzyme was up to 84%.

Key words: enzyme immobilization, α -amylase, affine membranes.