

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ α -АМИЛАЗЫ

© Шкутина Ирина Викторовна¹, МIRONENKO Наталья Владимировна², Селеменев Владимир Федорович²

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

² Воронежский государственный университет. 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1.

E-mail: irn55@mail.ru

Ключевые слова: α -амилаза; хитозан; сверхсшитые полимеры; иммобилизация; каталитическая активность

Введение. α -Амилаза (α -1.4 — глюкан — 4 — глюканогидролаза, К.Ф. 3.2.1.1) гидролизует α -1.4 — гликозидные связи в крахмале и гликогене с образованием мальтозы и глюкозы. Препараты α -амилазы применяются в заместительной энзимотерапии для лечения амилазной недостаточности и заболеваний органов ЖКТ как у взрослых, так и у детей. Иммобилизация фермента способствует контролируемому высвобождению белка, позволяющему пролонгировать терапевтический эффект и способствует повышению устойчивости препаратов к денатурирующим факторам, по сравнению с нативным веществом. Создание и изучение свойств препаратов иммобилизованных ферментов является задачей, представляющей повышенный интерес.

Цель исследования. Изучение процесса адсорбционной иммобилизации α -амилазы на сорбентах различного типа.

Материалы и методы. В работе был использован ферментный препарат α -амилаза *Aspergillus awamori* ("Диаэм"). Носителями для иммобилизации α -амилазы служили хитозан — природный аминополисахарид и сверхсшитые полимеры на основе стирола и дивинилбензола — MN-100, MN-500 ("Purolite"). MN-100 — анионообменник слабоосновного типа с третичными аминогруппами, MN-500 — сульфокатионнообменник.

Для получения изотерм сорбции использовали метод переменных концентраций. Навески сорбента (1.0000 ± 0.0002 г) приводили в контакт с растворами α -амилазы с концентрациями $0.1 \div 5.0 \cdot 10^{-2}$ ммоль/дм³. Соотношение раствор / сорбент было постоянным и составляло 100 / 1. Растворы готовили на основе ацетатного буфера с разным значением pH среды. Эксперименты проводили при 293 К. Концентрацию веществ в равновесном растворе определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Лоури. Количество веще-

ства в фазе сорбента вычисляли по разности концентраций исходного и равновесного растворов. Для изучения поверхности сорбентов использовался сканирующий электронный микроскоп JSM-6380LV.

Каталитическую активность α -амилазы измеряли фотометрическим методом. Термическую и кислотную инактивацию нативных и иммобилизованных ферментных препаратов проводили термостатированием в 0,1 М ацетатном буфере, температурах 40–70°C. Остаточную активность образцов определяли по отношению к $5 \cdot 10^{-4}$ М раствору крахмала. Стандартное отклонение полученных результатов не превышало величину 0.01

Результаты. Исследованы кинетические особенности сорбции α -амилазы *Aspergillus awamori* на хитозане, MN-270, MN-500. Определено, что время установления равновесия составляет 120–140 мин в зависимости от использованного сорбента. Рассчитанные значения эффективных коэффициентов диффузии ($\sim 10^{-9}$ см²/с) и энергии активации при температурах 5° и 20° С (5,8–7,3 кДж) позволяют предположить, что процесс сорбции лимитируется стадией внутренней диффузии.

При изучении зависимости количества связанного с носителями фермента от различных значений pH среды было показано, что иммобилизацию α -амилазы следует проводить при pH 5,0–5,5, т.е. в области изоэлектрической точки белка.

Получены изотермы сорбции фермента в диапазоне значений pH, соответствующих наибольшему количеству иммобилизованного белка. Выявлено, что наибольшее количество белка сорбируется на сульфокатионнообменнике MN-500 (4,1 ммоль/г). Предполагается, что при связывании α -амилазы со сверхсшитыми полимерами происходит формирование π - π -электронного взаимодействия между гетероциклами гистидина, триптофана, бензольным

кольцом тирозина и бензольными кольцами носителя. Аминокислоты, содержащие неполярные алифатические и ароматические боковые группы (аланин, валин, лейцин, изолейцин и фенилаланин) и входящие в макромолекулу белка, также вступают в гидрофобные взаимодействия с сорбентом. После завершения формирования мономолекулярного слоя сорбата дальнейший процесс сорбции происходит уже за счет взаимодействия молекул амилазы друг с другом, которое может осуществляться как в результате контакта гидрофобных, так и гидрофильных частей макромолекул. Определенная доля фермента, кроме того, может сорбироваться за счет ионного обмена.

Связывание белка с хитозаном происходит преимущественно за счет образования водородных связей, а также ионного взаимодействия аминогрупп полисахарида и карбоксильных групп аминокислот, входящих в состав белка.

Важную роль во всех сорбционных процессах играет также растворитель. Его количество и состояние в сорбенте, изменение состояния в процессе сорбции и перераспределение между фазами контролировалось с помощью гравиметрического метода. Вышеописанный механизм сорбции фермента был подтвержден исследованием по-

верхности сорбента с помощью растровой электронной микроскопии

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

Выявлена высокая активность полученных гетерогенных биокатализаторов, которая составляет 68–89% от активности нативной α -амилазы. Установлено, что препараты иммобилизованного фермента по сравнению с нативным ферментом обладают повышенной устойчивостью к денатурирующим воздействиям температуры и pH среды.

Отмечено, что полученные ферментные препараты при температуре хранения 0–2°C сохраняли свою каталитическую активность практически неизменной в течение 1 года.

Заключение. Из рассматриваемых сорбентов наибольшей каталитической активностью и устойчивостью к денатурирующим факторам обладает носитель MN-500. Проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения и использования процесса иммобилизации α -амилазы на сверхсшитом полимере.