# ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ α-АМИЛАЗЫ

*© Шкутина Ирина Викторовна [1], Мироненко Наталья Владимировна[2], Селеменев Владимир Федорович[2]*

[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 применяется 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 фактором, 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/дм$^3$. 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 вещества 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$^0$С. 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 (~ $10^{-9}$ см$^2$/с) и энергии активации при температурах 5$^0$ и 20$^0$ 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 сульфокатионообменнике 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 поверхности 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$^{o}$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.