



УДК: 66.097.3-039.7

ОСНОВНІ АСПЕКТИ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ НА ПРИКЛАДІ ЛІПАЗ

Студ. Д.В. Ахтямова, гр.БХФ-2-15

Студ. Ю.С. Савіна, гр.БХФ-2-15

Наук.керівник доц. Т.А.Пальчевська

Київський національний університет технологій та дизайну

Мета і завдання. Розглянути та порівняти основні технічні засоби іммобілізації ферментів (адсорбція, ковалентне зшивання з носієм, включення) на прикладі ліпаз.

Об'єкт і предмет дослідження: Іммобілізовані ферменти - ліпази. Вивчення пливку різноманітних технік іммобілізації на біологічну активність ліпаз.

Методи та засоби дослідження. Адсорбція ліпаз *Candida rugosa* на багат шарових вуглецевих нанотрубках; адсорбція ліпаз *Candida cylindracea* на філосілікатах — сепіоліт, палигорскіт і монтморілоніт; адсорбція ліпази на CaCO_3 ; включення ліпази в Са-альгінатний гель; включення CaCO_3 -іммобілізованої ліпази в Са-альгінатний гель.

Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів. У роботі набуло подальшого розвитку вивчення різних методів іммобілізації ферментів, які дають можливість отримувати каталізатори з широко варійованими властивостями й змінювати напрямок їхнього застосування.

Результати дослідження. Іммобілізація ферментів дозволяє отримувати технологічні біокаталізатори, які можуть бути багаторазово використані, легко відділяються від реакційної суміші і дозволяють препиняти реакцію в будь-який заданий момент часу. В даній роботі розглянуті різні засоби іммобілізації водорозчинного ліполітичного фермента ліпаза, що каталізує гідроліз нерозчинних естерів - ліпідних субстратів, допомагаючи перетравлювати, розчиняти і фракціонувати жири.

Іммобілізація за допомогою адсорбції забезпечує велику площу поверхні, що важливо для ліполітичних ферментів, які здійснюють каталіз на поверхні поділу фаз - між міцеллою та водою. Це пояснюється легкістю протікання процесу зв'язування, невисокою ціною носія й відсутністю токсичних речовин. У більшості випадків адсорбція незначно знижує активність ліпаз і, що вкрай важливо, не впливає на їх специфічність.

Для іммобілізації ферментів за допомогою адсорбції використовують різноманітні носії: пористий нейлон і латекс, гідрофобний цеоліт, синтетичні смоли, поліпропілен, оксид алюмінію, кизельгур, амберліт тощо. При адсорбції на гідрофобних носіях більшість ліпаз виявляють значне підвищення активності. Було показано, що ця особливість пов'язана з конформаційними змінами ферменту, що утворює відкритий і доступний для субстрату активний сайт. Таким чином, ліпази розпізнають гідрофобні поверхні схожі на їх природні субстрати та піддаються поверхневій активації в процесі іммобілізації.

Shah і співавт. провели адсорбцію ліпаз *Candida rugosa* на багат шарових вуглецевих нанотрубках з високим збереженням їх біологічної активності (97%). Початкова швидкість переетерифікаційної активності отриманого іммобілізованого біокаталізатора підвищилася в порівнянні з ліофілізованим порошковим ферментом у 2,2 рази в безводній гексановій, і в 14 разів у водонезмішуваними іонними рідинами. Автори припускають, що взаємодія з гідрофобною поверхнею нанотрубок викликало

конформаційні зміни, які привели структуру ліпази в стан «відкритої кришки». Подібні техніки іммобілізації ферментів на нанорозмірних носіях створюють ґрунт для розробки біореакторів менших розмірів і мініатюрних біосенсорних пристроїв.

При гідролізі різних етилових ефірів, ферменти, іммобілізовані на волокнистих матеріалах (палігорськіт і сепіоліт) проявили найбільш високу гідролітичну активність в порівнянні з іммобілізованими на шаруватих силікатах (монтморилоніт) і сферичних частинках аніонообмінної смоли Duolite A-568). Іммобілізація ліпаз за допомогою нековалентної адсорбції виявилася корисною в безводних системах.

При іммобілізації ферментів за допомогою ковалентного зшивання з носієм відбувається утворення міцних хімічних зв'язків між ферментом і носієм, що унеможливує розчинення ферменту в реакційному середовищі. Процеси активації за цим методом проектується з метою створення електрофільних груп на носії, які на етапі зшивання реагують з сильними нуклеофільними групами на поверхні білків. Виділена й очищена ліпаза *Pseudomonas aeruginosa* SRT9 була іммобілізована на три (4-формілфеноксі) ціанурат з формуванням підстави Шиффа. Вихід іммобілізації склав 85%. Вільні та іммобілізовані ліпази використовувалися при гідролізі оливкової олії у водному середовищі. Термостабільність іммобілізованої ліпази зросла на 20-25%, початкова активність склала 75% після 7-ми циклів. Також препарат показував хорошу стабільність в органічних розчинниках (особливо в 30% ацетоні й метанолі).

Метод іммобілізації шляхом включення заснований на фіксації ферменту всередині полімерної мережі, яка утримує фермент, а також дозволяє субстрату і продуктам каталізу проходити крізь неї. На відміну від ковалентного методу, при іммобілізації включенням, фермент не зв'язується з носієм або мембраною. Існують різні способи включення ферментів, наприклад, включення в гель або волокна, а також мікроінкапсулювання. Практичне використання цих методів обмежує межі перенесення мас крізь мембрани або гелі. М. Phisalaphong зі співавт. досліджували отримання біодизелю з пальмової олії з використанням вільної та іммобілізованої форм ліпази *Candida rugosa*. Було вивчено три методи іммобілізації: 1) адсорбція ліпази на CaCO_3 ; 2) включення ліпази в Са-альгінатний гель; 3) включення CaCO_3 -іммобілізованої ліпази в Са-альгінатний гель. Ліпаза, включена в Са-альгінатний гель після 48 годин ферментації показала найбільш високий вихід етилового ефіру (74%), в порівнянні з ліпазами, іммобілізованими іншими методами, тоді як при використанні вільних ліпаз спостерігався вихід етилового ефіру в 83% після 24 годин.

Висновки. Таким чином, при правильно підібраних способах іммобілізації — методу, носія, умов каталітичного процесу, можна отримувати такі комплекси фермент-носій, які будуть мати певні переваги над властивостями нативного фермента.

Іммобілізація біокаталізаторів дозволяє значно розширити сфери застосування певних ферментів, що відкриває нові горизонти для біотехнологічної промисловості.

Ключові слова. Іммобілізація ферментів, ліпази.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Биохимия : учеб. для вузов / В. П. Комов, В. Н. Шведова. — М. : Дрофа, 2004. — 638, [2] с.; ил. — (Высшее образование : Современный учебник) ISBN 5-7107-5613-X.
2. Дехтяренко Н. В. Фермент ліпаза: аналіз галузей використання, продуцентів, способів одержання / Н. В. Дехтяренко, Л. О. Пескова. // Наукові вісті НТУУ "КПІ". — 2014. — №3. — С. 63–72.
3. Ключева М. В. Основные аспекты иммобилизации ферментов на примере липаз // Молодой учёный Ежемесячный научный журнал. — 2014. — №8. — С. 320–325.