

К. Є. Гузикевич, В. В. Коновалова, Г. А. Побігай, А. Ф. Бурбан

## Розроблення нового методу іммобілізації ліпази на целюлозних мембранах

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Т. Картелем)

*Розроблено метод іммобілізації ліпази на целюлозних ультрафільтраційних мембранах, модифікованих поліетиленіміном та прищепленими тіольними групами. Підібрано оптимальні умови іммобілізації ліпази за даним способом: рН 7,5, концентрація розчину модифікування 1 мг/см<sup>3</sup>. Отримані мембрани характеризуються великою кількістю іммобілізованого ферменту (0,307 мг/см<sup>2</sup>), високим ступенем збереження активності (57%) та здатністю до регенерації.*

Створення мембран з біокаталітичними властивостями на основі синтетичних полімерних мембран є новим напрямом розвитку мембранних технологій. Біокаталітичні мембрани створюють шляхом іммобілізації різних ферментів (амілази, ліпази, протеази, целюлази, пектинази тощо) на синтетичних мембранах [1].

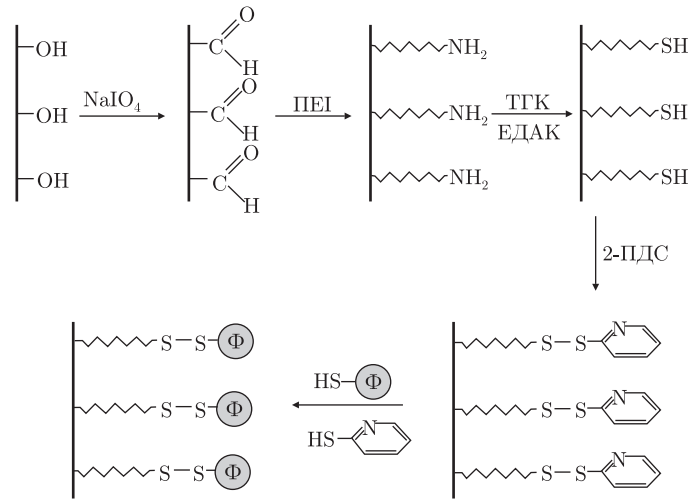
Велика різноманітність реакцій та висока хемо-, регіо- й енантіоспецифічність ліпаз становлять їх в один з важливіших класів ферментів, широко застосованих у багатьох галузях промисловості, зокрема харчовій, фармацевтичній, текстильній, паперовій, у виробництві детергентів, косметичних засобів, біодизеля, а також при органічному синтезі тощо [2–4]. Переважна більшість реакцій, які каталізує ліпаза, відбувається на межі поділу фаз олія — вода. Активність ферменту в такому випадку залежить не від концентрації субстрату, а від площі поверхні поділу фаз [5]. Ферментативні процеси з використанням вільної ліпази проводять в емульсійних реакторах з додаванням емульгаторів, які забруднюють продукти реакції. Іммобілізація ліпази на мембрані дозволяє забезпечити велику питому площу поверхні, розділення продуктів реакції, можливість повторного використання ферменту і неперервність процесу [4, 6].

Авторами цього повідомлення розроблено новий метод іммобілізації ліпази на целюлозних мембранах, модифікованих поліетиленіміном (ПЕІ) та прищепленими тіольними групами, а також досліджено властивості створених біокаталітичних мембран та їх здатність до регенерації.

Висока, в порівнянні з більш популярними синтетичними полімерними матеріалами, реакційна здатність регенованої целюлози дозволяє легко проводити хімічне модифікування мембран з цього матеріалу та робить їх придатною основою для створення біокаталітичних мембран.

ПЕІ є зручним полікатіоном для іммобілізації біомолекул на різноманітних заряджених поверхнях методом Layer by Layer, наприклад гепарину на мембранах для гемодіалізу для покращення їх біосумісності [7], а також ферментів на різних мембранах [8]. ПЕІ використовують для ковалентної іммобілізації ферментів завдяки наявності в його структурі аміногрупи [9]. Застосування тіольних груп для іммобілізації ферментів на різноманітних носіях відомо давно [10]. Такий метод ковалентної іммобілізації є привабливим, оскільки він є зворотним, тобто дозволяє проводити регенерацію мембран, а отже, ефективніше використовувати мембранні матеріали.

Як носій для іммобілізації ферменту брали целюлозні ультрафільтраційні мембрани марки С005F виробництва Microdyn-Nadir (Німеччина), модифікування яких відбувалося за такою схемою:



Целюлозні мембрани попередньо замочували в дистильованій воді впродовж 1 год. Мембрани окиснювали до діальдегідцелюлози 0,1 моль/л розчином перйодату натрію протягом 1 год при температурі 55 °С. Окиснені мембрани витримували в 1% водному розчині ПЕІ при кімнатній температурі 24 год. Модифіковані мембрани промивали дистильованою водою впродовж 1 доби, після чого витримували в розчині 2,2'-дипіридилдисульфиду (2-ПДС) у 0,1 моль/л  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Прищеплення тіольних груп проводили ацилюванням аміногруп 2% розчином тіогліколевої кислоти (ТГК) з додаванням 0,05 г 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)-карбодіміду (ЕДАК). Тіольні групи мембрани утворюють дисульфідні містки з піридиновими залишками молекул 2-ПДС. Для прищеплення ферменту отримані мембрани витримували у водному розчині ліпази з *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich, активність — 819 од./мг) 24 год при кімнатній температурі з подальшою промивкою в дистильованій воді протягом 1 год. Концентрацію розчину ліпази змінювали від 0,1 до 1,0 мг/мл.

Для деіммобілізації ферменту мембрани з іммобілізованою ліпазою занурювали в розчин (2S,3S)-1,4-димеркаптобутан-2,3-діолу (ДТТ) сильного відновника та витримували при кімнатній температурі 24 год.

Для визначення транспортних характеристик модифікованих мембран використовували стандартну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8200 виробництва Millipore (США). Робочий тиск — 0,2 МПа.

Концентрацію прищеплених тіольних груп до модифікованої ПЕІ мембрани визначали йодометричним титруванням. Подрібнену мембрану занурювали в 10 мл дистильованої води при рН 3 та витримували 1 добу. Індикатором слугував свіжоприготовлений 1% розчин крохмалю, за титрант брали 1 ммоль/л розчин йоду.

Активність і концентрацію розчину ліпази оцінювали за швидкістю гідролізу *n*-нітрофенілпальмітату (*p*-NPP). Для цього до 30 мг *p*-NPP додавали при перемішуванні 10 мл ізопропанолу та 0,1 мл поверхнево-активної речовини Triton X-100 та отримували розчин № 1. У 100 мл фосфатного буфера (рН 7,4) розчиняли 200 мг дезоксихолату натрію та отримували розчин № 2. Розчин субстрату було отримано при змішуванні розчинів № 1 й № 2 в отриманих кількостях. До 1,8 мл розчину субстрату додавали 2 мл фосфатного

буфера (рН 7,4) та нагрівали в термостаті до 37 °С. Далі додавали досліджуваний розчин ліпази (0,1 мл) або досліджувану мембрану з різною площею (3,45 або 0,43 см<sup>2</sup>). Отриману суміш інкубували при 37 °С протягом 15 хв, після чого негайно додавали 4 мл етанолу для зупинення реакції. Оптичну густину визначали на СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda = 410$  нм та товщині кювети  $l = 1$  см проти контрольного розчину субстрату. Концентрацію ферменту оцінювали за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від концентрації розчину ферменту, кількість іммобілізованої на мембрані ліпази — за різницею концентрацій розчину ліпази до і після модифікування.

Щоб оцінити збереження активності ліпази після іммобілізації, мембрани розрізали та визначали активність кожної частини за методикою, зазначеною вище. Частина мембрани, яку занурювали в розчин субстрату, відповідає 0,1 мл розчину ліпази.

Для встановлення оптимальних умов іммобілізації ферменту, мембрани модифікували ПЕІ з різною молекулярною масою — 25 та 750 кДа. Результати досліджень свідчать, що прищеплення ПЕІ до поверхні мембран призводить до значного зниження водопроникності мембрани (табл. 1). У мембран марки С005F, модифікованих високомолекулярним ПЕІ, відзначалася менша водопроникність і дещо більша концентрація тіольних груп, ніж у мембран, модифікованих низькомолекулярним ПЕІ (див. табл. 1). Отже, можна простежити обернено пропорційну залежність між водопроникністю мембран, модифікованих ПЕІ з різною молекулярною масою і концентрацією тіольних груп після реакції з ТГК. Тобто концентрація тіольних груп безпосередньо залежить від розміру молекул ПЕІ, іммобілізованого на мембранах. ТГК є низькомолекулярною речовиною і тому не чинить жодного впливу на водопроникність модифікованих мембран.

Кількість іммобілізованого ферменту залежить від концентрації його модифікуючого розчину, оскільки для повного покриття поверхні мембрани ліпазою в розчині повинна міститися достатня кількість молекул білка. Як видно з рис. 1, при збільшенні концентрації розчину ферменту від 0,1 до 0,8 мг/мл, кількість іммобілізованого на мембрані ферменту збільшується від 0,06 до 0,3 мг/см<sup>2</sup>.

При подальшому зростанні концентрації модифікуючого розчину спостерігаються незначні зміни кількості закріпленого на мембрані ферменту від 0,31 до 0,314 мг/см<sup>2</sup>. Це означає, що при збільшенні концентрації понад 1 мг/мл на мембрані іммобілізується однакова кількість ферменту. Отже, за оптимальну концентрацію розчину ліпази брали 1 мг/мл.

Ізоелектрична точка ліпази з *Candida rugosa* дорівнює 4,6 [11]. Максимальна кількість ферменту іммобілізується на мембрані при рН модифікуючого розчину 5,5, тобто у точці, найближчій з досліджуваних до ізоелектричної точки ферменту. Отримані результати можна пояснити тим, що при ізоелектричному значенні рН молекули ферменту приймають конформацію статистичного клубка, тоді як при інших значеннях рН конформація більш розгорнута. Отже, при ізоелектричному рН молекула займає найменшу площу на поверхні мембрани, тобто на поверхні може розміститися більше молекул.

Таблиця 1. Залежність водопроникності модифікованих мембран С005F і кількості іммобілізованих тіольних груп від молекулярної маси ПЕІ

Мембрана	$J_v$ , л/(м <sup>2</sup> · год)	C SH-груп, мкмоль/см <sup>2</sup>
Немодифікована	28,51	Не вияв.
Модифікована ПЕІ 25000	5,84	0,201
Модифікована ПЕІ 750000	2,38	0,233

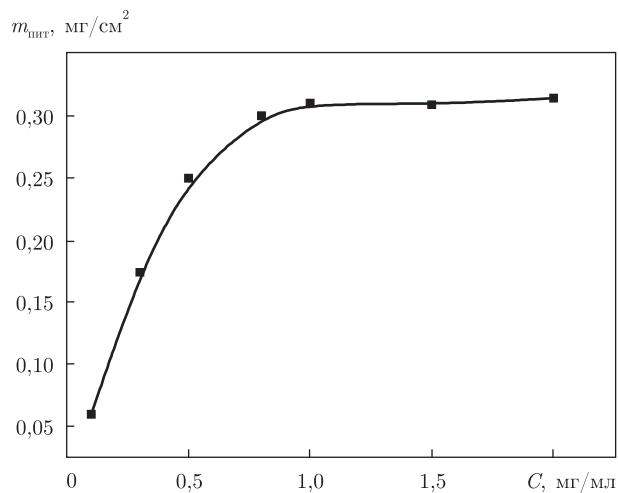


Рис. 1. Залежність кількості іммобілізованої на мембрані ліпази від концентрації модифікуючого розчину

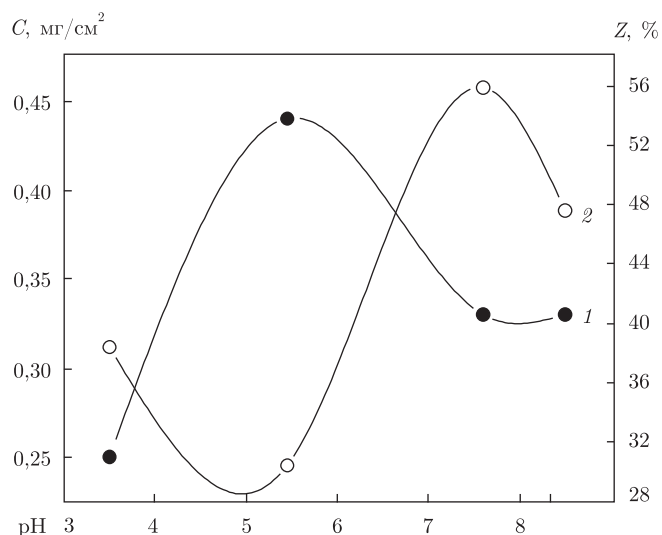


Рис. 2. Залежність кількості іммобілізованого ферменту (1) і збереження ним активності  $Z$  (2) від рН модифікуючого розчину

Максимальна активність вільної ліпази спостерігається при рН 7,7 [11]. При іммобілізації ферменту при рН 7,6 зберігається максимально активна конформація молекул, і фермент зберігає найвищу активність — 57% (рис. 2). При рН 5,5 фермент зберігає мінімум активності, що також може бути пояснено зміною конформації молекул ферменту. На підставі проведених досліджень можна зробити висновок, що при згорнутій конформації активність молекул ферменту мінімальна і становить 31% від активності вільного ферменту. При подальшому зменшенні рН спостерігається підвищення збереженої активності, оскільки молекули ферменту знову розгортаються, і їх конформація наближається до оптимальної.

Важливою характеристикою методу іммобілізації ферменту на мембранах є можливість їх регенерації, що дозволяє значно подовжити термін використання мембран. Процес регенерації полягає в деіммобілізації ферменту з мембрани, який з часом втрачає активність, та в подальшій іммобілізації нового ферменту.

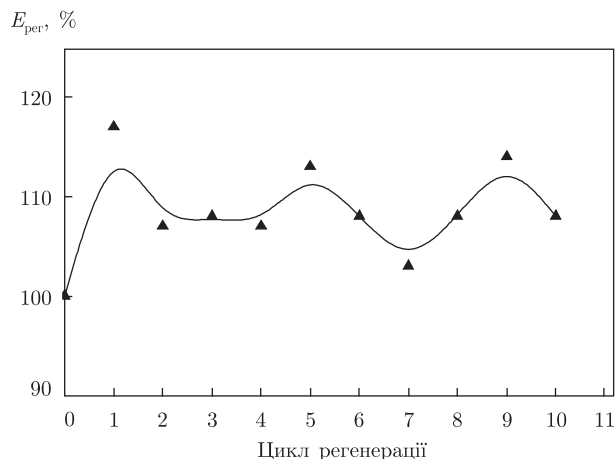
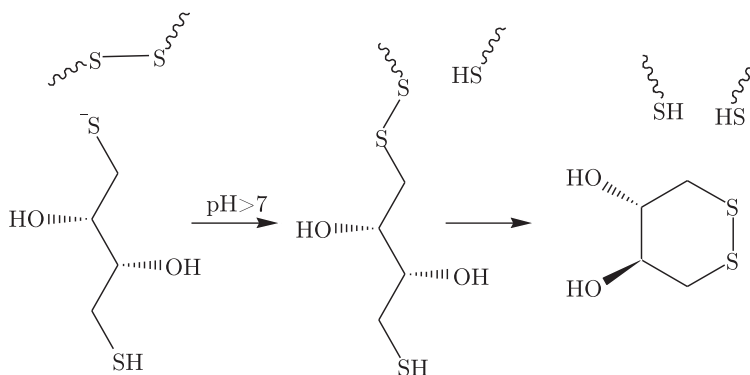


Рис. 3. Регенерація мембран з іммобілізованою ліпазою

Деіммобілізація ферменту з мембран з ліпазою, іммобілізованою через тіольні групи, заснована на механізмі відновлення тіольних груп за допомогою сильного відновника DTT [12]:



За даними експериментів, при використанні цього методу з мембрани видаляється 98,4% ферменту. Після 1-го циклу регенерації кількість повторно іммобілізованого ферменту збільшується порівняно з кількістю ферменту, іммобілізованого в перший раз, і становить 117% (рис. 3).

Вірогідно, збільшення кількості іммобілізованого ферменту відбувається внаслідок того, що при регенерації вивільняються тіольні групи, які раніше були зв'язані з іншими тіольними групами на мембрані. Отже, збільшується ферментна ємність мембрани. На 10-му циклі кількість такого ферменту стабілізується на рівні 105% відносно кількості ферменту, іммобілізованого в перший раз (див. рис. 3).

Таким чином, нами розроблено метод іммобілізації ліпази на целюлозних мембранах через прищеплені тіольні групи та вивчено транспортні властивості мембран на різних стадіях процесу модифікування. Встановлено, що максимальний вплив на водопроникність мембран справляє іммобілізація ПЕІ, яка спричиняє зниження водопроникності приблизно в 10 разів. Досліджено вплив молекулярної маси ПЕІ на кількість іммобілізованих тіольних груп. Визначено, що найбільше тіольних груп ( $0,233 \text{ мкмоль/см}^2$ ) іммобілізується на ПЕІ з молекулярною масою 750 кДа.

Досліджено залежність кількості іммобілізованої на мембрані ліпази від концентрації та рН модифікуючого розчину. Оптимальною концентрацією модифікуючого розчину ферменту є 1 мг/мл, при якій кількість іммобілізованого ферменту дорівнює 0,307 мг/см<sup>2</sup>. Оптимальне значення рН – 7,5, при якому фермент зберігає максимальну активність – 57% активності вільного ферменту.

Регенерація отриманих біокаталітичних мембран проходить дуже ефективно та приводить до покращення властивостей мембрани: після 10-ти циклів регенерації на мембрані іммобілізується 105% ферменту від початкової кількості.

1. *Giorno L., Drioli E.* Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives // Trends in biotechnology. – 2000. – **18**. – P. 339–349.
2. *Houde A., Kademi A., Leblanc D.* Lipases and their industrial applications. An overview // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2004. – **118**. – P. 155–170.
3. *Hasan F., Shah A. A., Hameed A.* Industrial applications of microbial lipases // Enzyme and Microbial Technology. – 2006. – **39**. – P. 235–251.
4. *Knežević Z. D., Šiler-Marinković S. S., Mojović L. V.* Immobilized lipases as practical catalysts // APTEFF. – 2004. – **35**. – P. 151–164.
5. *Tietz N. W., Shuey D. F.* Lipase in serum – the elusive enzyme: an overview // Clinical Chem. – 1993. – **39**, No 5. – P. 746–756.
6. *Pugazhenthil G., Kumar A.* Enzyme membrane reactor for hydrolysis of olive oil using lipase immobilized on modified PMMA composite membrane // J. Membrane Sci. – 2004. – **228**. – P. 187–197.
7. *Marcq J., Nguyen Q. T., Glinel K. et al.* Diastasis membranes with immobilized heparin and their anti blood clotting properties. – Wrocław: Oficyna Politech. Wrocławskiej, 2006. – 153 p.
8. *Nguyen Q. T., Ping Z., Nguyen T. et al.* Simple method for immobilization of bio-macromolecules onto membranes of different types // J. Membrane Sci. – 2003. – **213**. – P. 85–95.
9. *Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D., Sanchez J.* Progress in enzymatic membrane reactors – a review // Ibid. – 2004. – **242**. – P. 189–196.
10. *Антонов В. К., Варфоломеев С. Д. и др.* Иммобилизованные ферменты. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – Т. 1. – 296 с.
11. *Ye P., Jiang J., Xu Z.-K.* Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile – co-maleic acid) membrane surface // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2007. – **60**. – P. 62–67.
12. *Khaleque Md. A., Okumura Yu., Yabushita S. et al.* Detachable immobilization of liposomes on polymer gel particles // Ibid. – 2004. – **37**. – P. 35–42.

Національний університет  
“Києво-Могилянська академія”

Надійшло до редакції 17.12.2009

**K. Y. Guzykevych, V. V. Konovalova, G. A. Pobigay, A. F. Burban**

### **Development of a new method of lipase immobilization on cellulose membranes**

*A method of lipase immobilization on cellulose ultrafiltration membranes is developed. Optimal conditions of immobilization are determined: pH and enzyme solution concentration are 7.5 and 1 mg/ml, respectively. The obtained biocatalytic membranes are characterized by a large amount of immobilized enzyme (0.307 mg/cm<sup>2</sup>), high rate of activity yield (57%), and good regeneration ability.*