

В. С. ОМЕЛЬЧЕНКО, викл.-стаж., НТУ «ХП», Харків;
Л. В. КРИЧКОВСЬКА, д-р техн. наук, проф., НТУ «ХП», Харків;
С. В. ЖИРНОВА, стар.викл., НТУ «ХП», Харків;
А. В. ЗІНЧЕНКО, студент, НТУ «ХП», Харків

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ІММОБІЛІЗАЦІЇ АМІЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ НА МАГНІТНИХ ЧАСТКАХ Fe₃O₄

Розглянуто ряд недоліків методів іммобілізації ферментів для харчової промисловості. Досліджено процес іммобілізації амілолітичних ферментів адсорбційним способом на магнітні частки без застосування додаткової функціональної оболонки. Л.2.Бібліогр.:4.

Ключові слова: іммобілізація амілолітичних ферментів, магнітні частки, адсорбція, ацетатний буфер.

Вступ.

Враховуючи до уваги точкову дію каталітичної роботи ферментів та відсутність побічних продуктів реакції, ці білкові каталізатори широко застосовуються у харчовій промисловості. Але неможливість відокремлювати такі з розчинів, а також дороговизна деяких з них змушують шукати способи їх іммобілізації (закріплення ферментів на поверхні носія). На сьогоднішній день у світі існує зацікавленість у створенні іммобілізованих ферментних каталітичних систем з властивостями керування ззовні. Такі властивості проявляють мікрочастинки окису заліза – представника неорганічних носіїв, вони мають більші переваги перед органічними синтетичними, так як мають більш високий ступінь міцності та температурної толерантності.

Як відомо, залізо є нетоксичним матеріалом у порівнянні із носіями синтетичної органічної природи, наприклад, пластмасами, що достатньо широко використовуються у виготовленні таких препаратів. Двовалентне залізо є біологічно активним катіоном і, у разі потрапляння такого до організму, метаболізується ним без негативних токсичних наслідків [1].

На сьогодні не існує реалізованого у кінцевому вигляді жодного технологічного процесу декрохмалізації сировини із застосуванням іммобілізованих ферментних препаратів. Робляться спроби провести такі процеси, але усі вони знаходяться на стадії пілотних реакторів. Були проведені спроби іммобілізації інших класів та типів ферментів (пектиназ, протеаз) на наночастки окису заліза [2]. У відношенні до іммобілізації амілолітичних ферментів були проведені дослідження закріплення їх на наночастки з оболонкою із спеціальними функціональними групами або із застосуванням зшивного агенту, глютарового альдегіду [3]. Але результатом вищезначених досліджень є присутність ряду недоліків, таких як – технологічна складність відтворення процесу іммобілізації у виробничих умовах, дороговизна отриманого препарату, потенційна токсичність реагентів, які застосовуються при виготовленні.

© В. С. ОМЕЛЬЧЕНКО, Л. В. КРИЧКОВСЬКА, С. В. ЖИРНОВА, А. В. ЗІНЧЕНКО, 2012

Мета досліджень, постановка проблеми.

Метою даної роботи є дослідження процесу іммобілізації амілолітичних ферментів адсорбційним способом на магнітні частки без застосування додаткової функціональної оболонки.

Магнітні частки є достатньо новим класом носіїв, який почали застосовувати для іммобілізації ферментів. На даний час немає досліджень, присвячених іммобілізації амілолітичних ферментів на магнітні частки без функціоналізації часток, що б значно здешевлювало та полегшувало технологію іммобілізації.

Матеріали та результати досліджень.

Системи магнітних носіїв приваблюють саме властивостями керування ззовні на відміну від інших. В даному дослідженні отримання носія для ферменту відбувається способом Массарта.

Іммобілізація комерційного ферментного препарату, що являє собою суміш амілолітичних ферментів – ендо- та екзоамілаз грибу *Aspergillus niger*, відбувалася стандартним методом фізичного нанесення шляхом адсорбції. Для цього використовувався рідкий ферментний препарат, стабілізований гліцерином. У середовище ацетатного буферу з рН = 3,8 (дорівнює середньому рН яблучного соку, де і має відбуватися ферментативна реакція декрохмалізації) об'ємом 150 мл додавали мікрочастки Fe₃O₄, та після урівноваження змішували із ферментним препаратом. Перемішування проводили за допомогою магнітного перемішувача протягом 3 годин за температури 20°C.

Експерименти з дослідження залежності ступені іммобілізації ферментного препарату на носій від співвідношення мікрочасток Fe₃O₄ та ферментного препарату проведено відповідно до плану експерименту [4].

Результати досліджень наведено на рис. 1.

Рівняння регресії має вигляд:

$$Y(x_1, x_2) = -22,9799 + 15,5691 \cdot x + 16,7414 \cdot y - 1,1852 \cdot x^2 + 0,2266 \cdot x \cdot y - 1,2278 \cdot y^2$$

В результаті досліджень визначено діапазон співвідношень мікрочасток Fe₃O₄ та ферментного препарату, при якому її залишкова активність максимальна і складає 42 %, при цьому максимально знижується вміст мікрочасток Fe₃O₄ – 5 г на 100 мл ацетатного буферу. Таким чином, обґрунтовано співвідношення мікрочасток Fe₃O₄ та ферментного препарату для іммобілізації, який становить 5 г і 5 мл відповідно мікрочасток Fe₃O₄ та ферментного препарату в 100 мл ацетатного буферу. Експерименти з дослідження залежності ступені іммобілізації ферментного препарату на носій від часу перемішування та температури іммобілізації проведено відповідно до плану експерименту [4].

Результати досліджень наведено на рис. 2.

Рівняння регресії має вигляд:

$$Y(x_1, x_2) = -79,0521 + 29,1292 \cdot x + 5,1625 \cdot y - 1,6875 \cdot x^2 - 0,1175 \cdot x \cdot y - 0,0837 \cdot y^2$$

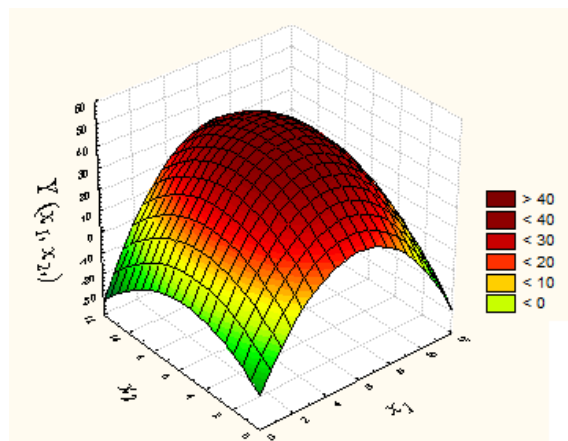


Рис. 1. Діаграма залежності ступені іммобілізації ферментного препарату на носій від співвідношення мікрочасток Fe_3O_4 та ферментного препарату: x_1 – мікрочастки Fe_3O_4 , г; x_2 – ферментний препарат, мл; $Y(x_1, x_2)$ – залишкова активність, %

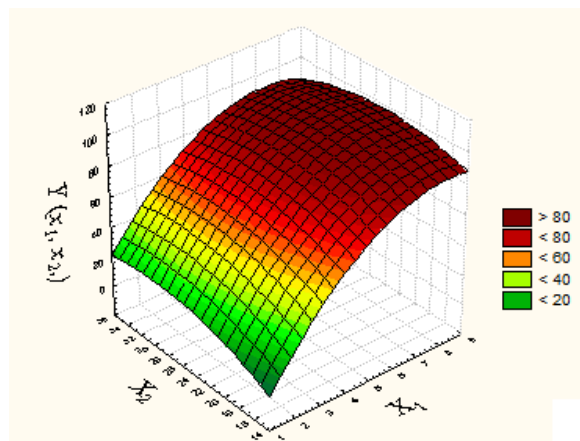


Рис. 2. Діаграма залежності ступені іммобілізації ферментного препарату на носій від часу перемішування та температури іммобілізації: x_1 – мікрочастки час перемішування, год.; x_2 – температура іммобілізації, $^{\circ}\text{C}$; $Y(x_1, x_2)$ – залишкова активність, %

В результаті досліджень визначено мінімальні величини часу перемішування та температури іммобілізації ферментного препарату, при яких її залишкова активність максимальна і складає 96. Таким чином, обґрунтовано величини часу перемішування та температури іммобілізації ферментного препарату, які становлять 6 годин і 25°C відповідно.

Висновки

В результаті досліджень визначено діапазон співвідношень мікрочасток Fe_3O_4 та ферментного препарату, а також мінімальні величини часу перемішування та температури іммобілізації ферментного препарату, при яких залишкова активність препарату максимальна.

Список літератури: 1. Володькин Д. В. Иммобилизация белков в микрочастицы, сформированные методом последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов. [Текст] : автореф. дисс. ... канд. хим. наук : 03.00.23/ Володькин Дмитрий Владимирович. – Краснодар, 2004. – 21 с. 2. Arshady R., Microspheres, microcapsules and liposomes. Vol. II: Medical and biotechnology applications. Chapter 14, Targeted delivery of microparticulate carriers. London: Citus books, 1999, 683 p. 3. Кабанов В. А., Каргина О. В., Ульянова М. В., Литвинов И. А. Исследование надмолекулярной структуры иммобилизованных ферментных комплексов на основе изотактической полиакриловой кислоты. ВМС Б, 1982, т. 24, с. 17-19. 4. Обработка экспериментальных данных [Электронный ресурс] / Б. Д. Агапьев, В. Н. Белов, Ф. П. Кесаманлы и др. – Санкт-Петербург : Изд-во СПбГТУ, 2001. – Режим доступа : <http://users.kpi.kharkov.ua/fmp/biblio/BOOK1/ref.html>. – Последний доступ : 2010.

УДК 577.15

Исследование процесса иммобилизации амилолитических ферментов на магнитные частицы Fe_3O_4 // Омельченко В. С., Кричковская Л. В., Жирнова С. В.,

Зинченко А. В.//Вестник НТУ«ХПИ». Серия: Новые решения в современных технологиях.-Харьков НТУ «ХПИ».-№ 50(956). 2012. С. 99-102

Рассмотрен ряд недостатков методов иммобилизации ферментов для пищевой промышленности. Исследован процесс иммобилизации амилолитических ферментов адсорбционным способом на магнитные частицы без применения дополнительной функциональной оболочки. Изд.:2. Библиогр.: 4 назв.

Ключевые слова:иммобилизация амилолитических ферментов, магнитные частицы, адсорбция, ацетатный буфер.

UDC577.15

Study of immobilization proces for amyloitic enzymes on the magnetic particles Fe_3O_4 // **Omelchenko V. S., Krichkovska L. V., Zhirnova S. V., Zinchenko A. B.**//Bulletin of NTU"KhPI".Subject issue: New decisions of modern technologies.-Kharkov NTU"KhPI".-2012..№ 50(956). P. 99-102

A number of shortcomings methods of immobilization of enzymes for the food industry. The process of immobilization of amylase enzyme adsorption method for magnetic particles without the use of additional functional shell. Im.: 2. Bibliogr. 4

Key words:Immobilization of amylolytic enzymes, magnetic, adsorption, acetate buffer.

Надійшла до редакції 28.09.2012