

4 Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. /под ред. В.В. Глупова. - М.: Круглый год, 2001. - 736 с.  
УДК 577.152.321

Ш.С. Ташмухамедова, Д.М. Сотвалдиева\*  
Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека, г. Ташкент, Узбекистан  
\*e-mail: milaya-lvica@mail.ru

### **Стабилизация амилолитических ферментов в системах с твёрдыми фазами**

В данной статье изучена стабилизация амилолитических ферментов в системах с твёрдыми фазами, в частности с силикогелем. Показана эффективность адсорбционной иммобилизации при использовании ферментного препарата.

**Ключевые слова:** амилаза, стабилизация, иммобилизация, силикогель, амилоризин.

Sh.S. Tashmukhamedova, D.M. Sotvaldieva

### **Stabilization of amylolytic enzymes in solid phase systems**

The stabilization of amylolytic enzymes was investigated in solid phase systems, in particular in systems containing silicogel. It was determined the efficiency of immobilization by adsorption of applied enzyme preparation.

**Keywords:** amylase, stabilization, immobilization, silica gel, amyloresin.

Одним из эффективных методов является способ проведения ферментативных реакций в системе с твердыми фазами [1]. Этот способ прост в его технологическом плане и не требует для своего осуществления специальных приборов, реакторов, дополнительного оборудования. Вместе с тем, сложность такого подхода заключается в том, что в настоящее время подбор таких адсорбентов осуществляется эмпирически для каждой конкретной пары: фермент-субстрат и эффект стабилизации достигается лишь в узком интервале концентраций компонентов, интервале pH и ионной силы [2,3]. В основе этого метода лежит явление активации и стабилизации, наблюдающееся для некоторых ферментов, когда реакция осуществляется на поверхности твёрдых адсорбентов. Речь идёт о том, что многие реакции, катализируемые ферментами, протекают в гетерогенных условиях с большей эффективностью, чем в случае гомогенных ферментативных процессов. Высокая эффективность гетерогенных ферментативных реакций, в том числе и реакций, протекающих на поверхности биологических мембран, объясняется высокой избирательностью ферментов в отношении растворимых или адсорбированных субстратов [4,5].

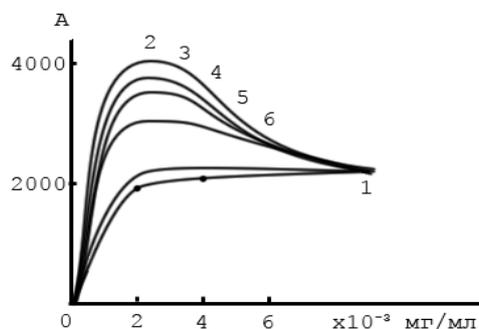
В вышеприведенных примерах, во всех случаях ускорение реакции было связано с локальным концентрированием субстрата и фермента в межфазном пространстве. Труднее объяснить наблюдаемый эффект стабилизации по отношению к различным видам денатурирующих воздействий. Во всяком случае, это явление нельзя объяснить лишь защитным эффектом субстрата или стабилизацией фермента за счёт адсорбции на поверхности твёрдой фазы. Экспериментально показано, что хотя стабилизация и связана с природой групп локализованных на поверхности твёрдой фазы - это не единственный фактор, обеспечивающий повышенную стабильность ферментов. В связи с этим требуются дальнейшие исследования поведения ферментов в системах с твёрдыми фазами, т.к. это имеет важное теоретическое и практическое значение. С теоретической точки зрения они дадут ценную информацию о протекании гетерогенных ферментативных реакций на границе раздела фаз, которая может быть использована для развития теории мембранного катализа. С практической точки зрения такие системы можно использовать для совершенствования ряда биотехнологических процессов, в том числе и для придания ферментам антипротеолитических свойств. В связи с этим в данной работе были проведены ряд исследований, где в качестве твердого носителя использовали силикагель в различных количествах.

### **Материалы и методы**

В работе был использован амилолитический фермент амилоризин П10Х. В качестве носителя для адсорбции фермента использовали силикагель. Для адсорбции фермента, амилоризин П10Х растворяли в боратном буфере pH 8,2, затем добавляли силикагель и смесь выдерживали в течение 30 мин при температуре 37°C. Для изучения стабилизации фермента с твердыми фазами время инкубации фермента, pH среды и количество носителя были выбраны экспериментально. Гидролитическую активность амилоризина определяли по методу [6]. Количество ферментного белка определяли по методу Лоури [7].

### Результаты и их обсуждение

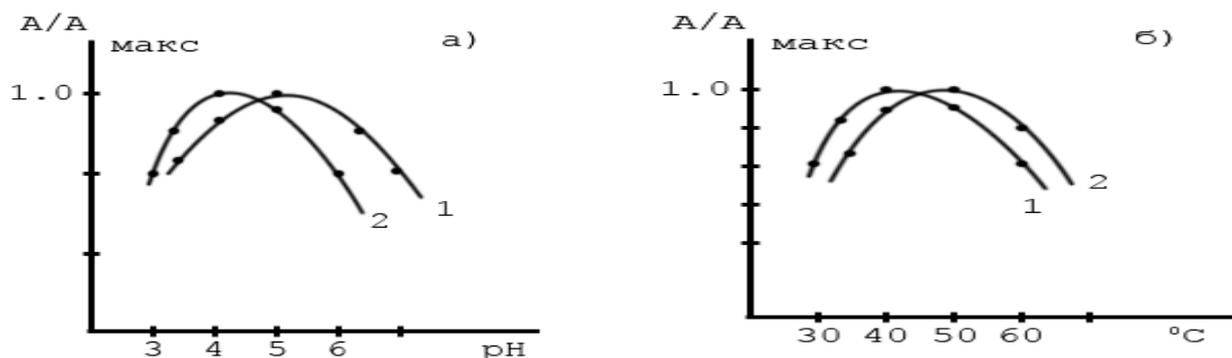
Проведенные опыты показали, что при добавлении в реакционную смесь силикагеля в количестве от 10 до 200 мг, для гидролиза крахмала амилоризином, скорость гидролиза повышается. При этом нужно отметить, что увеличение зависит от количества добавленного силикагеля и достигает максимального значения при добавлении 10 мг силикагеля (рисунок 1).



**Рисунок 1** – Зависимость скорости гидролиза крахмала от концентрации амилоризина. 1- без добавок, 2-6 с добавками силикагеля в дозе 10, 25, 50, 100 и 200 мг соответственно; А – удельная активность ферментного препарата в ед/г

Активация амилаз силикагелем также в значительной степени зависит от концентрации вносимого фермента. Повышение концентрации фермента в инкубационной среде выше  $1,8 \times 10^{-3}$  мг/мл приводило к резкому уменьшению активирующего эффекта силикагеля. Добавление силикагеля к ферментному раствору с концентрацией  $1,6 \times 10^{-3}$  мг/мл сопровождалось не только изменением активности фермента, но и изменением рН-оптимума, температурного оптимума и термостабильности амилоризина.

На рисунке 2 приведены данные, характеризующие влияние добавления силикагеля (25 мг) на зависимость удельной активности амилоризина от рН среды. Видно, что рН-оптимум в присутствии силикагеля в реакционной среде сдвигается в кислую область на 1,2 единицы. При добавлении силикагеля к раствору амилазы повышается также и температурный оптимум (рисунок 2(б), кривая 2).



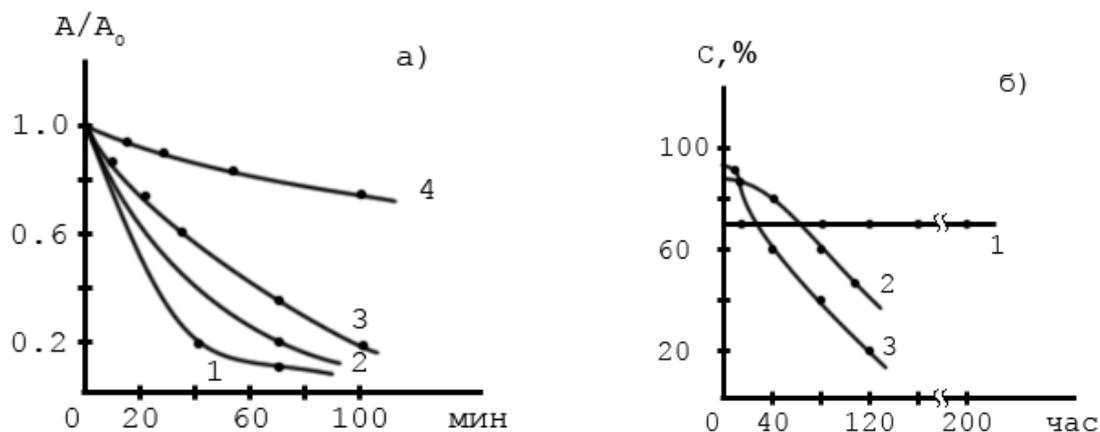
1 – в отсутствии силикагеля, 2 – в присутствии силикагеля

1 – без силикагеля, 2 – в присутствии силикагеля

**Рисунок 2** - (а)- Зависимость скорости гидролиза крахмала амилоризином от рН среды; (б)- Влияние силикагеля на значение температурного оптимума действия амилоризина

Увеличение температурного оптимума сопровождается одновременно изменением термостабильности амилоризина (Рисунок 3). Результаты опытов по выявлению влияния силикагеля на термостабильность амилоризина в растворе при 50°C показали, что фермент в его присутствии обладает большей термостабильностью как при рН 8,2, так и при рН 4,7. При рН 4,7 время

полуинактивации составило 25 мин, а в присутствии- 100 мин. Одной из причин, приводящих к таким изменениям в присутствии твердого носителя, может быть адсорбционная иммобилизация фермента.



1 – среда, pH 4,7 без добавок; 2 – та же среда в присутствии 25 мг силикагеля;  
3 – та же среда что и 1, но при pH 8,2; 4 – pH 8,2 в присутствии силикагеля; A – удельная активность фермента;  
по оси ординат степень гидролиза крахмала в %

**Рисунок 3** –Термостабильность амилоризина при 50°C (а), Гидролиз крахмала с адсорбированным амилоризином (б) при температуре: 18°C(1), 37°C(2), 45°C(3)

Если предположение об адсорбционной иммобилизации амилоризина верно, то можно было ожидать, что гидролиз крахмала будет протекать и при его пропускании через колонку, в которой находится фермент, адсорбированный на силикагеле. На рисунке 3 (кривые 1-3) приведены результаты опытов по полученным нами непрерывному гидролизу крахмала адсорбированным амилоризином. При температуре 18°C в указанных условиях достигали 65%-ного расщепления субстрата. При этой температуре не наблюдали эффективности работы колонки, по меньшей мере, в течение 10 суток. Повышение температуры до 37°C несколько увеличило степень гидролиза субстрата. Однако, наряду с увеличением каталитической активности происходила адсорбция фермента на носителе и его инактивация. При дальнейшем повышении температуры (45°C) скорость тепловой денатурации и скорость десорбции увеличивалась.

Таким образом, результаты проведенной работы позволяют сделать вывод, что добавление силикагеля в реакционную среду, может существенно снизить нормы расхода амилоризина во время проведения реакции и повысить эффективность использования ферментного препарата.

#### Литература

1. Мирзарахметова Д.Т., Дехканов Д.Б., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р., Свойства инвертазы, ковалентно иммобилизованной на активированном угле // Прикладная биохимия и микробиология.- Москва, 2009.-Т.45.-№3.- С.287-291.
2. Altinok H., Aksoy S., Nasirci N. Covalent immobilization of invertase on chemically activated poly(styrene-in 2-hydroxyethyl metacrylate) microbeads// Russian chemical bulletin. 2007.-V.55.-№10.-P.1860-1864
3. Рахимов М.М., Мадьяров Ш.Р. Состояние фосфолипазы в растворе и ее каталитическая активность // Биохимия. – 1997. - Т. 42. - №3. - С.622–634.
4. 5. Можеев В.В. Иммобилизация ферментов как новый подход к решению фундаментальных проблем энзимологии // Успехи биологической химии. - Москва: -Наука. -1993. -Т.24. -С. 99-134.
5. 6. Препараты ферментные. Метод определения амилолитической активности. -М.-1975.-ГОСТ 20264. С. 4-74.
6. Lowry O., Rosenbryl N., Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1954.-V.193.-P.265-275.