

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

**Приворотская Елизавета Александровна**

**Получение стабилизированных форм  
гидролитических ферментов технического и  
фармацевтического назначения**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата

химических наук

Научный руководитель –

доктор химических наук

А.А.Красноштанова

**Москва – 2017**

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Практическое значение гидролитических ферментов .....	10
1.2. Характеристика свойств гидролитических ферментов.....	18
1.3. Пути повышения стабильности ферментов .....	23
1.4. Иммобилизация ферментов .....	25
1.4.1. Методы иммобилизации ферментов .....	26
1.4.2 Носители для иммобилизации ферментов .....	33
1.5. Природные полисахариды .....	38
1.5.1 Целлюлоза.....	38
1.5.2 Хитозан: физико-химические свойства, характеристика как носителя для иммобилизации и области применения .....	41
1.5.3 Альгинат натрия: физико-химические свойства, характеристика как носителя для иммобилизации и области применения .....	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	54
2.1. Объекты исследования.....	54
2.2. Реагенты.....	54
2.3. Методы анализа .....	55
2.3.1. Определение влажности образца .....	55
2.3.3. Определение протеолитической активности по гидролизу азоколла ...	56
2.3.4. Определение протеолитической активности препаратов модифицированным методом Ансона.....	57
2.3.5. Определение амилолитической активности с применением 3,5- динитросалициловой кислоты .....	58

2.3.6. Определение липазной активности титриметрическим методом .....	58
2.3.7. Методика ИК-спектроскопии.....	59
2.3.8. Определение количества альдегидных групп йодометрическим методом .....	59
2.4. Методы эксперимента.....	60
2.4.1. Методика получения диальдегидцеллюлозы (ДАЦ).....	60
2.4.2. Методика иммобилизации гидролаз на текстильный носитель .....	60
2.4.3. Методика иммобилизации гидролаз микрокапсулированием .....	61
2.4.4. Методика инактивации гидролаз .....	62
2.4.5. Методика проведения гидролиза отходов мясоперерабатывающей промышленности.....	62
2.4.6. Методика проведения гидролиза ячменного солода.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	65
3.1. Исследование физико-химических характеристик нативных гидролаз...	65
3.2. Получение иммобилизованных форм гидролаз .....	77
3.3. Установление механизмов иммобилизации ферментов на полисахаридные носители.....	91
3.4. Влияние иммобилизации на операционную стабильность гидролаз .....	99
3.5. Влияние иммобилизации на функциональную стабильность гидролаз.	103
3.6. Влияние иммобилизации на стабильность гидролаз при хранении гидролаз.....	109
3.7. Влияние иммобилизации на конформационную стабильность гидролаз .....	112
3.8. Влияние иммобилизации на твердые носители на стабильность и устойчивость гидролаз .....	116
3.9. Практическое применение препаратов иммобилизованных гидролаз...	118

3.9.1. Применение протеолитических ферментов для приготовления современных перевязочных материалов .....	118
3.9.2. Гидролиз ячменного солода нативной и иммобилизованной грибной амилазой .....	130
3.9.3. Гидролиз отходов мясоперерабатывающей промышленности нативной и иммобилизованной липазой .....	133
ВЫВОДЫ .....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	140
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	165

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

БАВ – биологически активное вещество;

ДАЦ – диальдегидцеллюлоза;

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия;

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза;

КРС – крупный рогатый скот;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПАВ – поверхностно-активное вещество;

ПК – протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба;

ФА – ферментативная активность;

ФП – ферментный препарат.

## **ВВЕДЕНИЕ**

В соответствии с программой развития биотехнологий РФ в период до 2020 года одним из приоритетных направлений является создание препаратов на основе ферментов, биосовместимых полимеров, экологически чистых материалов с высокой степенью сохранения активности и стабильности.

Уникальная специфичность ферментов делает биокаталитические процессы более технологичными по сравнению с химическими. Наиболее широкое применение нашли гидролитические ферменты. В настоящее время ферментные препараты (ФП) на основе гидролитических ферментов все шире применяются в фармацевтических производствах, медицине, пищевой и химической промышленности. Практическое применение протеолитических ферментов разнообразно, наиболее значимо их использование в хирургии для лечения раневых поверхностей различной этиологии, что обусловлено локальностью действия: быстрым отторжением нежизнеспособных тканей, без воздействия при этом на здоровые участки [Белов А.А., 2009; Юданова Т.Н., 2004]. В современной медицинской практике успешно применяются полиферментные препараты, в состав которых, помимо протеаз, входят амилолитические и липолитические ферменты. Такие препараты обладают противовоспалительным, анальгезирующим действием, фибринолитическим и антиагрегантным эффектом, а также иммуномодулирующей способностью [Ефименко Н.А., 2011; Толстых М.П., 2004; Eriksson E. и др., 2000]. Также амилазы и липазы применяются в пищевой, химической и др. отраслях промышленности, для создания новых био- и энергоресурсов (производство биотоплива) [Шнайдер К.Л., 2009; Гарабаджиу А.В., 2010].

Промышленно выпускаемые препараты гидролаз медицинского назначения такие, как Мультиферм, ПАМ-ТЛ, Протеокс-ТМ и др. достаточно широко известны и востребованы в качестве эффективных раневых покрытий [Романовская И.И., 2009]. Однако срок их действия не превышает 48 часов, в них отсутствуют иммуностимулирующие и смягчающие агенты.

Поэтому остается актуальным вопрос о повышении эффективности ферментных препаратов, увеличении сроков их хранения, многократном использовании и повышении их стабильности.

Одним из путей повышения эффективности ферментных препаратов является их иммобилизация на природные и синтетические носители.

Природные полимеры в качестве носителей для иммобилизации имеют ряд преимуществ в сравнении с синтетическими (органическими и неорганическими). В отличие от синтетических природные полимеры экологически безопасны и не токсичны. Такие полимеры, как хитозан, альгинат натрия обладают функциональной физиологической активностью, необходимой в медицинской практике [Жоголев К.Н., 2000].

В связи с этим актуально изучение физико-химических и термодинамических свойств нативных и иммобилизованных гидролаз, оценка эффективности различных методов иммобилизации, подбор условий и носителей, выбор способов повышения стабильности ферментных препаратов, используемых в промышленности.

**Цели и задачи исследований.** Целью работы является разработка стабилизированных форм гидролитических ферментов, способных найти применение в технических и фармацевтических целях, а также оценка их эффективности на основе анализа их кинетических и термодинамических параметров.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- провести оценку кинетических и термодинамических параметров нативных гидролитических ферментов (трипсина крупного рогатого скота (КРС), протеолитического комплекса (ПК) из гепатопанкреаса краба, панкреатической липазы и амилазы гриба *Aspergillus oryzae*);
- научно обосновать выбор носителей, оптимальных условий и метода иммобилизации гидролаз;

- исследовать влияние типа носителя на функциональную, операционную, конформационную стабильность и стабильность при хранении гидролитических ферментов путем сравнения их кинетических и термодинамических параметров и обосновать выбор наиболее эффективных форм препаратов гидролаз;
- оценить эффективность практического применения подобранных иммобилизованных препаратов гидролаз.

**Научная новизна.** Разработаны гетерогенные биокатализаторы на основе гидролитических ферментов (трипсина КРС, протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, липазы КРС и амилазы гриба *Aspergillus oryzae*), иммобилизованных на целлюлозе, диальдегидцеллюлозе, альгинате натрия, хитозане, а также микрокапсулированные в гель на основе хитозана и альгината натрия.

Получены основные термодинамические и кинетические параметры иммобилизованных и нативных форм гидролаз. Установлено, что иммобилизация на природные носители (целлюлозу, хитозан, альгинат натрия) приводит к снижению ферментативной активности исследованных гидролаз не более, чем на 5-15% в сравнении с нативными, тогда как иммобилизация на синтетические носители вызывает снижение ферментативной активности на 30-50%. Найдены общие для всех исследованных гидролаз закономерности по влиянию иммобилизации на стабильность ферментов. Показано, что иммобилизация способствует повышению операционной, функциональной, конформационной стабильности и стабильности при хранении гидролитических ферментов.

Установлено, что наиболее высокой каталитической активностью обладают: иммобилизованные на хитозансодержащей целлюлозе трипсин и ПК; иммобилизованная на хитозансодержащей целлюлозе амилаза; микрокапсулированная в альгинатный гель липаза.

На основе анализа кинетических характеристик установлено повышение стабильности при хранении протеолитических ферментов (ПК и



трипсина), иммобилизованных на целлюлозные носители в присутствии 5% глицерина и 0,2% витаминов (аскорутин и С) в 2 раза, что позволяет создавать эффективные перевязочные материалы пролонгированного действия (до 72 ч), обладающие атравматичностью. Исследована динамика высвобождения фермента в раневую среду, что позволяет прогнозировать величину его пролонгированного действия.

**Теоретическая и практическая значимость.** На примере трипсина, ПК, амилазы и липазы научно обоснован выбор наиболее эффективных метода, носителя, условий иммобилизации гидролитических ферментов. Получены кинетические и термодинамические параметры иммобилизованных форм гидролаз, проведено их сравнение с соответствующими параметрами нативных гидролаз. На основе анализа полученных экспериментальных и расчётных данных доказано преимущество полисахаридных носителей для иммобилизации в сравнении с синтетическими.

Разработан новый вариант комплексного атравматичного раневого покрытия пролонгированного действия, включающего протеолитический фермент (комплекс ПК или трипсин), 5% глицерина и 0,2% витамина С или аскорутин (в расчете на витамин С).

Даны рекомендации по условиям гидролиза субстратов, используемых в промышленности (ячменного солода и жиросодержащих отходов) наиболее эффективными препаратами, соответственно, грибной амилазы, иммобилизованной на хитозансодержащей целлюлозе, и панкреатической липазы, иммобилизованной в хитозан-альгинатные микрочастицы. Показано, что применение иммобилизованных ферментных препаратов позволяет повысить выход продуктов гидролиза в 1,3-1,5 раз по сравнению с нативными формами.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Инженерная энзимология – это научно-техническое направление, занимающееся разработкой новых путей практического использования ферментных препаратов [1].

Ферменты являются уникальными биокатализаторами различных биохимических процессов, которые обладают ценными свойствами, обуславливающими их практическое использование. К таким свойствам относят, прежде всего, высокую селективность, каталитическую активность и стабильность. Ферменты способны сохранять свои свойства вне клеток, что делает возможным использовать их в разных областях промышленности. По объему производства ферментные препараты занимают среди биологически активных веществ ключевые позиции после антибиотиков и аминокислот. Из огромного перечня ферментных препаратов наиболее широко применяются в промышленности гидролитические ферменты [2-4].

### 1.1. Практическое значение гидролитических ферментов

В настоящее время среди широкого спектра гидролитических ферментов (гидролаз) наибольшее практическое значение имеют протеазы и пептидазы, липазы и амилазы.

Ферментативный гидролиз белков (протеолиз) лежит в основе регуляции важных физиологических процессов (переваривание белковых компонентов пищи, синтез ферментов и гормонов, формирование иммунного ответа, секреция) на разных уровнях организации живых систем. Протекание данного процесса обеспечивается большим количеством протеолитических ферментов (протеаз), функционирующих как внутри, так и вне клеток [5].

Области использования протеолитических ферментов разнообразны. В сочетании с амилолитическими ферментами микробные протеазы применяют в хлебопекарной промышленности для улучшения аромата и качества хлеба, ускорения созревания теста и т.д. [6].

В мясной промышленности использование пептидаз значительно улучшает качество мясных продуктов. Протеолитические ферменты также

применяют для повышения скорости созревания мяса и увеличения выхода мяса первого сорта до 40% [7].

В молочной промышленности благодаря протеолитическим ферментам в два раза возрастает скорость созревания сыров и снижается себестоимость продукции на 10% [8].

В легкой промышленности, а именно в меховом и кожевенном производстве, применяют препараты протеаз (трипсина, пепсина, коллагеназы) для ускорения процесса снятия со шкур волоса и размягчения кож. При этом улучшаются условия работы в данной отрасли, время, затрачиваемое на осуществление вышеперечисленных процессов, сокращается во много раз, а также повышается качество кожи и шерсти [9].

В текстильной промышленности препараты грибных протеаз ускоряют процесс расшлихтовки тканей до 10 раз. Данные препараты используются также при производстве шелка в процессе удаления серицина при размотке коконов тутового шелкопряда [10].

В бытовой химии протеолитические ферменты растительного происхождения служат компонентами моющих средств и стиральных порошков. Некоторые протеазы в сочетании с каталазой и глюкозооксидазой входят в состав зубных паст, обеспечивая антимикробный эффект и предотвращая появление кариеса [11].

Одной из важных областей применения протеолитических ферментов является медицина.

Несмотря на значительные успехи современной медицины, в силу ряда причин ускорение заживления ран по-прежнему остается актуальной общебиологической, социальной и хирургической проблемой. Гнойные заболевания и осложнения встречаются у 30-35% всех хирургических больных [12].

С давних времен известно об использовании веществ, содержащих протеолитические ферменты, для ускорения процессов очищения и заживления ран. В VIII веке для этой цели использовали желудочный сок.

Было замечено, что при его применении происходит более эффективное заживление гнойных ран, зараженных личинками мясных мух. Как оказалось, этот эффект определялся активностью трипсиноподобных ферментов. Открытие в XIX веке трипсина и пепсина позволило использовать эти ферменты для лечения туберкулеза суставов, костей и лимфатических узлов, для заживления раневых поверхностей, мягких тканей и спаек брюшной полости. Во второй половине XIX века исследователь патологической анатомии И.В. Давыдовский доказал, что управление процессами регенерации тканей возможно только с помощью ферментов, после чего протеолитические ферменты стали широко применять для лечения гнойных и воспалительных процессов [13-15]. Для этого разрабатываются перевязочные материалы, содержащие протеолитические ферменты.

Искусство наложения разнообразных перевязочных средств давно является составной частью медицины [16-18]. Повязки, содержащие протеолитические ферменты, остаются простым и удобным методом лечения ран. В настоящее время перевязочные средства (одноразовые материалы со сроком действия не более 72 часов) для местного лечения гнойных ран должны обеспечивать пролонгированное, комплексное и многопрофильное действие: иметь достаточную сорбционную способность, обеспечивать отделение раневого содержимого; препятствовать всасыванию раневого содержимого в ткани, быстро подавлять и удалять с раневой поверхности микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности; оказывать выраженное противоотечное и противовоспалительное действие [13,14,18]. Поэтому наиболее перспективными являются перевязочные средства, каждая часть которых направлена на контроль того или иного действия, обеспечивающего эффективное заживление раны.

Применение протеолитических ферментов в качестве лечебных агентов перевязочных средств обусловлено рядом особенностей этих ферментов. [13,14,17-19]. Протеолитические ферменты, являясь своеобразным

«биологическим скальпелем», способствуют отторжению некротических тканей, не действуя на здоровые участки, в которых содержатся ингибиторы протеаз. При локальном применении протеазы проявляют значительную литическую способность по отношению к нежизнеспособным тканям и сгусткам крови. Характерной чертой протеаз является избирательное расщепление денатурированных некротических тканей при отсутствии воздействия на живые участки, т.е. при помощи ферментативного лизиса из организма в основном удаляются белки омертвевших тканей. Протеолитические ферменты обеспечивают противовоспалительное действие путем активации фибринолиза переводом плазминогена (неактивная фаза) в активный плазмин, который «расплавляет» интракапиллярные тромбы, тем самым восстанавливая микроциркуляцию в тканях вокруг раны, улучшая обменные процессы, которые способствуют уменьшению очага воспаления.

Протеазы снижают аутоиммунные и аутоксические реакции больного организма, разрушая белки, входящие в состав нуклеопротеидов, до аминокислот, нормализуют воспалительные изменения в крови, повышают чувствительность гноеродной микрофлоры к антибиотикам за счет разрушения фибриновой оболочки вокруг микробной клетки, а также путём инактивации пенициллиназы бактерий оказывают прямое антитоксическое действие, которое способно снижать обсемененность раневой поверхности микроорганизмами, подавлять рост колоний плазмокоагулирующих кокков, стимулировать фагоцитоз.

Среди широкого спектра групп протеолитических ферментов для лечения ран наиболее изучены протеазы поджелудочной железы – трипсин и химотрипсин [14].

Внедрению ферментных препаратов в лечебную практику способствовало производство их в промышленном масштабе, изучение их фармакологических и лечебных свойств, как при местном, так и при парентеральном введении в организм.

В последние годы было установлено, что для заживления ран необходимы не только протеазы, но и ферменты других классов. Такой способ лечения получил название системной энзимотерапии.

Системная энзимотерапия - это метод целенаправленного лечебного воздействия специально составленной совокупности гидролитических ферментов растительного и животного происхождения, которые способны оказывать комбинированное действие на главные физиологические процессы [21].

На сегодняшний день успех энзимотерапии продиктован использованием полиферментных препаратов, включающих в свой состав ферменты разных классов, структуры и свойств [13-15,19,21,22]. Данные препараты содержат комбинации ферментов различного происхождения с высокой активностью и обладают эффективностью в разнонаправленных клинических ситуациях. На фармацевтическом рынке наиболее известны такие полиферментные препараты, как Вобэнзим, Мезим-форте, Креон, Фестал, Сомилаза, Панкреатин и др [14,21]. В полиферментных препаратах присутствуют амилаза, трипсин, химотрипсин, липаза, а также папаин и бромелаин. Благодаря биохимическим свойствам составных компонентов все препараты обладают различными свойствами, направленными на лечение воспалительных процессов. Препараты, содержащие несколько ферментов в своем составе, обладают противовоспалительным, вторично-анальгезирующим действием, фибринолитическим и антиагрегантным эффектом, а также иммуномодулирующей способностью, благодаря чему широко применяются в терапевтической и хирургической практике [13,21-23].

Ферментные препараты способствуют нормализации физиологии воспалительного процесса, препятствуя его патологическому развитию. Благодаря этому предупреждается появление хронических воспалительных рецидивирующих процессов, которые часто вызывают различные аутоиммунные заболевания [13-15,18-23].

Правильная базисная терапия и рациональное применение ферментов в послеоперационный период помогают сократить сроки очищения раны, предотвратить хронизацию инфекционного процесса, избежать повторных хирургических операций и, следовательно, облегчают страдания больного [24,13-15,20,22-25].

Еще одним классом широко применяемых в настоящее время гидролитических ферментов являются амилазы.

Применение амилолитических ферментных препаратов постоянно расширяется. Это связано с нехваткой энерго- и биоресурсов, а также экологическими проблемами. В связи с этим можно выделить следующие области применения амилолитических ферментных препаратов [26-30].

В пищевой промышленности амилазы применяются для производства глюкозных сиропов и патоки (при комплексной переработке возобновляемого сырья), сахарозаменителей, сушеных овощей, пюре, экстрактов, супов, варенья, изделий из крупы путем обогащения их сахарами и декстринами, для гидролиза крахмала и при получении пищевых концентратов, ускорения процессов брожения при выпечке хлеба. С помощью амилаз, выделенных из микромицетов, перерабатывают маисовую и кукурузную муку в глюкозную и мальтозную патоки.

В медицине амилазы используют для регуляции и устранения гипоферментозов желудочно-кишечного тракта, лечения слизистой оболочки кишечника, желудка, поджелудочной железы, аналитической диагностики крови и мочи для выявления небольших количеств мочевины, глюкозы, мочевой кислоты, нуклеотидов, аминокислот, спиртов и других соединений. Полиферментные препараты, в составе которых присутствуют амилазы, используются для рассасывания тромбов в кровеносных сосудах, удаления переизбытка накопленного гликогена в тканях организма [28].

В последние годы амилазы стали широко использоваться для производства синтетических моющих средств (сильнощелочная среда) и препаратов, устойчивых к воздействию кислой среды [29-30].

Широко применяются амилазы и глюкоамилазы как составная часть комбикормов, например, полиферментный препарат «ГлюкоЛюкс - F», содержащий в своем составе глюкоамилазы, улучшает усвояемость и переваривание кормов организмом животных. Незаменимы амилазы и в переработке отходов сельского хозяйства (соломы, древесины и др.) в глюкозу и другие сахара [29].

Помимо протеаз и амилаз в настоящее время возрастает практическое значение липаз. В последние несколько десятилетий липазы привлекают внимание учёных благодаря возможности получения с их помощью различных продуктов, представляющих интерес в промышленности: ди- и моноглицеридов, жирных кислот, глицерина (продуктов масложирового гидролиза) и др. [31].

В промышленной практике липазы используют для гидролиза сложных эфиров и липидов, для стереоселективной этерификации спиртов в безводных средах, равновесие в которых сдвинуто в сторону образования сложноэфирной связи [32].

Лекарственные препараты с липолитической активностью применяются в клинической практике при лечении недостаточности желудочно-кишечного тракта различной этиологии [33-35].

Контроль липазной активности играет важную роль в диагностике и лечении нарушений жирового обмена и в контроле за состоянием сердечно-сосудистой системы. Определение активности сывороточной липазы используется в диагностике различных заболеваний. Гиперлипемия возникает из-за недостатка липопротеидлипазы, а сбой в процессах депонирования жиров зависит от действия холестеролэстеразы и сфингомиелиназы [36-38].

При производстве продуктов питания и консервов в крупнотоннажных производствах часто используются растительные масла, имеющие низкое качество из-за воздействия на них высокими температурами (в процессе жарки продуктов) [39].



Утилизация отработанных масел и предотвращение попадания в пищевые продукты их окисленных компонентов, вредных для здоровья потребителя, являются нерешенными задачами. Во многих работах [33,34,40,41-45] отмечается, что эти проблемы могут быть решены с помощью свободной или иммобилизованной липазы.

Рыбоперерабатывающая промышленность производит большое количество различной жиросодержащей продукции, которая находит применение в разных отраслях. Жиры рыб широко известны под торговыми названиями: медицинские, технические, пищевые и ветеринарные. Технические жиры, например, изготавливают из любых органов гидробионтов, а также видов жиросодержащих тканей, они могут быть произведены при утилизации различных отходов в процессе очистки сточных вод, при производстве пищевых, ветеринарных и медицинских жиров [46-49].

К основной проблеме рыбоперерабатывающей промышленности относится отсутствие эффективной технологии переработки жиросодержащих отходов. Переработка гидробионтов включает только ту ее часть, которая может иметь пищевую ценность. А внутренние органы и некондиционные части гидробионтов с высоким содержанием жира направляют на производство кормовой продукции. В реальных производствах не исключено неполное использование отходов, приводящее к утрате высокоценных веществ, содержащихся в них, что снижает экологическую безопасность производства и представляет значительную угрозу для окружающей среды [47,50]. Следовательно, рыбная промышленность ставит перед собой задачу не только изготовления ценных пищевых рыбных продуктов из сырья высокого качества, но и переработки образовавшихся отходов в побочную продукцию.

В настоящее время липазы микробного происхождения широко используются в химической промышленности: в составе моющих средств, шампуней, кремов и зубных паст. Это говорит не только об их высокой эффективности, но и способствует решению вопроса, связанного с охраной

окружающей среды. Избыток фосфатов, как компонентов синтетических моющих средств, приводит к загрязнению сточных вод. Присутствие ферментов в составе моющих средств позволяет проводить стирку при более низких температурах и, следовательно, снижать затраты энергии [51,52].

В производстве биотоплива применяются, как правило, очищенные растительные масла, содержащие, в основном, триглицериды с низкой долей свободных жирных кислот. Такие очищенные масла (соевое, рапсовое и др.) имеют значительную себестоимость - до 80 % от общей себестоимости биодизельного топлива [47,53-55].

В настоящее время все более актуальным направлением является получение биотоплива на основе использования отходов переработки биологического сырья, а также отработанных масел пищевых производств [55,56]. Изучением структуры липидов и воздействия на них различных факторов технологических процессов в производстве жировой и кормовой продукции, а также направлениях ее использования занималось большее количество исследователей [47,51,55-57].

Универсальность катализируемых липазой реакций сделала этот фермент уникальным гетерогенным катализатором в реакции переэтерификации. Исследования [31,41,57-59] показали, что биодизель может производиться ферментативным путем с помощью липазы, катализирующей реакцию переэтерификации, которая позволяет легко восстанавливать глицерин, что делает процесс очистки биодизеля более легким. Для экономической эффективности и большей стабильности липазы в производстве биодизеля предпочтительнее использовать липазу, модифицированную путем иммобилизации. Это способствует более легкому отделению катализатора от продукта реакции, упрощает контроль процесса, позволяет повторно использовать ферментный препарат и организовать непрерывную работу производства в целом [45,60].

## **1.2. Характеристика свойств гидролитических ферментов**

Протеолитические ферменты относятся к классу гидролаз. Их специфичность определяется размером молекулы субстрата, поэтому эти ферменты подразделяются на протеазы и пептидазы [24]. Протеазы обладают необычайным разнообразием строения, механизмов действия и функций [24,61,62]. При исследовании свойств наиболее важных протеолитических ферментов (таких как трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, эластаза и др.) были использованы сотни природных, синтетических субстратов и родственных соединений [13].

Подкласс сериновых протеаз включает около 55 семейств, которые принимают участие в протеолитическом регулировании обменных процессов в организме [63]. Наиболее известными сериновыми протеазами являются трипсин, химотрипсин, эластаза, энтеропептидаза, урокиназа, калликреины крови и плазмы, а также факторы свертывания крови. Трипсин и химотрипсин входят в состав секрета поджелудочной железы человека и принимают участие в расщеплении белковых компонентов пищи в тонком кишечнике [64].

Сериновые протеазы содержат центр связывания с субстратом и каталитический активный центр, который обеспечивает гидролиз пептидных связей субстрата. В активный центр всех сериновых протеаз (рис. 1.1) входит серин, поэтому он представляет собой «сериновый сайт», в котором His57 водородной связью связан с карбоксильной группой Asp102, а имидазольное кольцо повышает реакционную способность Ser195 [65].

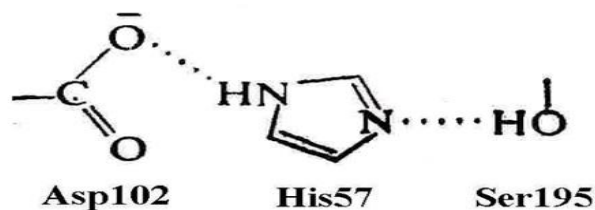


Рисунок 1.1 - Активный центр сериновых протеаз (числа обозначают последовательность расположения аминокислот в полипептидной цепи белка)

Значительный интерес в исследованиях сериновых протеаз получил полиферментный препарат из гепатопанкреаса камчатского краба (ПК), в состав которого входят различные сериновые протеазы, обладающие не только протеолитической, но и коллагенолитической активностью [12,66-68].

Физико-химические и биологические свойства ПК исследованы достаточно широко [12,66,68]. Из литературы следует, что ПК состоит, как минимум, из 9 сериновых протеаз. Молекулярные массы коллагенолитических ферментов ракообразных колеблются в пределах 23÷30 кДа. Для этих ферментов характерна низкая изоэлектрическая точка, значения которой обычно ниже 3,5. Это связано с повышенным содержанием отрицательно заряженных аминокислот.

Амилолитические ферменты принадлежат к классу гидролаз, подклассу гликозидаз, которые способны гидролизовать  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи в амилопектине, гликогене, амилозе и других мальтоолигосахаридах [69,70].

Амилазы распространены в клетках животных, растений, микроорганизмов, занимают ключевые позиции в обмене веществ, обеспечивая регуляцию метаболических путей в ответ на изменения pH, температуры или воздействия других клеток и тем самым поддерживая гомеостаз клетки [26].

Амилазы подразделяются на несколько типов: эндо- и экзоамилазы. К первому типу относится  $\alpha$ -амилаза, катализирующая внутримолекулярные  $\alpha$ -1,4-связи в полимерном субстрате. К экзоамилазам относятся  $\beta$ -амилаза и глюкоамилаза, способные взаимодействовать с субстратом с невосстанавливающего конца. Однако  $\beta$ -амилаза не гидролизует  $\alpha$ -1,6-гликозидные связи, а глюкоамилаза почти полностью превращает крахмал в глюкозу [71].

Продуцентами амилолитических ферментов являются бактерии и микроскопические грибы родов *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Endomycopsis*, *Saccharomycopsis*, *Candida*, *Torula*, *Saccharomyces* [26,72]. Амилазы, продуцируемые этими микроорганизмами, сходны по своим физико-

химическим свойствам, но различны по устойчивости к внешним воздействиям, таким как pH среды, температура и др. [73,74].

Свойства амилаз достаточно полно описаны во многих работах [26,74-77]. Так, амилаза из *Bacillus amyloliquefaciens*, стабильна в диапазоне pH от 5,5 до 8,0 с оптимумом амилолитической активности pH 5,9. Как и другие  $\alpha$ -амилазы, она является металлозависимым ферментом. В присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в реакционной среде этот фермент расширяет температурный диапазон своего действия до температуры 90°C. Аналогичным свойством обладает  $\alpha$ -амилаза, выделенная из *Bacillus licheniformis*, которая термостабильна при температуре 105-110°C.

Грибная  $\alpha$ -амилаза, выделенная из *Aspergillus oryzae*, имеет высокую каталитическую активность и расщепляет крахмал до олигосахаридов более низкой молекулярной массы, чем ее бактериальные аналоги. С помощью этого фермента из крахмала получают не менее 50 % мальтозы, из-за чего его используют в промышленности для получения сиропов с высокой долей дисахаридов. В отличие от бактериальных ферментов грибная амилаза из *Aspergillus oryzae* является гликопротеином, который имеет меньшую термостабильность и более узкий pH оптимум [78].

Глюкоамилаза (амилоглюкозидаза) катализирует расщепление  $\alpha$ -1,4-связи до  $\beta$ -D-глюкозы, взаимодействуя с невосстанавливающими концами цепей амилозы и амилопектина. Глюкоамилаза распространена в организме человека, животных, а также у низших и высших растений. Основными продуцентами этого фермента являются микроскопические грибы *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* и бактерии рода *Clostridium*. Глюкоамилазы делятся на кислые (pH 3,5-5,5) и нейтральные (pH 6,0-7,5) [26,79,80].

В ряде литературных обзоров [26,27,75,81,82] представлены данные о механизме действия амилолитических ферментов. На основе представленных данных можно сделать некоторые выводы. В основном активные центры амилолитических ферментов образованы карбоксильными группами глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, имидазолом гистидина, а также

тирозином. Карбоксильные группы глутаминовой и аспарагиновой аминокислот осуществляют кислотно-основной катализ, выступают в качестве субстрат-связывающих участков, вызывают электронные смещения, влияют на полярность рядом расположенных групп фермент-субстратного комплекса.

Фенольная группа тирозина участвует в действии микробных глюкоамилаз на полисахариды, так как ее модификации способствует дезактивации фермента.

Липазы (ЕС 3.1.1.3.) относятся к сериновым гидролазам, которые катализируют гидролиз триглицеридов и обратные реакции этерификации, трансэтерификации, алкоголиза и ацидолиза [33].

Первичная структура белковых молекул была определена как для панкреатических липаз [24], так и для микробных [61,62]. Количество аминокислотных остатков в них варьируется в диапазоне от 250 до 700. Активный центр липаз формируется тремя аминокислотами Ser, Gly и His. Характерным отличием всех липолитических ферментов является такая аминокислотная последовательность: His-X-Y-Gly-Z-Ser-W-Gly или Y-Gly-His-Ser-W-Gly (где W, X, Y, Z - неспецифичные аминокислотные остатки) [16]. Присутствие в составе активного центра липазы остатка гистидина было доказано с помощью фотоокисления фермента [17] и при проведении реакции с диэтилпирокарбонатом [18] и этоксиформиатом [19]. Наличие остатка серина исследовали в процессе инактивации липазы в присутствии п-нитрофенилфосфата [20], при использовании таких ингибиторов, как ионы меди [21], и по реакциям с органофосфатами [18].

Молекулярная масса липаз варьирует от 27кДа для микробных липаз (из *Penicillium cyclospium*) [72] до 500кДа для липазы человека [74].

В основном, панкреатические липазы проявляют свою наибольшую активность в щелочной среде при pH 8-9, но в зависимости от типа субстрата или присутствия каких-либо добавок (солей, эмульгаторов) pH-оптимум может смещаться в кислую область. В случае микробных липаз оптимум pH

варьируется от 5,6 до 8,5 [33,34]. Липазы, как правило, хорошо растворимы в воде.

Температурный оптимум липаз составляет примерно 30-40°C, однако, термостабильность ферментов зависит от источника выделения. Микробные липазы более термостабильны, чем липазы животного или растительного происхождения. Так, температурный оптимум липазы из *Pseudomonas fluoresceins* составляет 50-55°C. Некоторые липазы бактериального происхождения могут сохранять до 80% своей активности при термоинактивации при 80°C в течение длительного времени [34,83,84].

Такие важные свойства, как уникальная специфичность липаз, высокая скорость их действия, возможность осуществления ферментативной реакции в достаточно "мягких" условиях, предотвращение побочных процессов, способствуют применению липаз в синтезе новых соединений, соответствующих требованиям различных областей промышленности [32,34,40].

Однако на пути внедрения биокатализаторов в промышленную практику возникают серьезные проблемы, связанные с недостаточной стабильностью нативных ферментов, чувствительностью к изменениям pH и температуры среды, а также быстрым выведением из организма, если речь идет о применении фермента в клинической практике в качестве терапевтического агента [85]. Вследствие этих причин инженерная энзимология использует ряд приемов, которые позволяют искусственно стабилизировать фермент.

### **1.3. Пути повышения стабильности ферментов**

Выделяют несколько видов стабильности ферментов:

- операционная стабильность (способность сохранять активность фермента в расширенном диапазоне рабочих значений - температуре, pH и др.);
- функциональная стабильность (способность сохранять ферментативную активность в условиях денатурации белка);

- стабильность при хранении (способность сохранять ферментативную активность длительное время).

Согласно литературным данным для повышения стабильности ферментов можно использовать несколько подходов.

Первый подход к решению проблемы повышения стабильности ферментов заключается в упрочении белковой молекулы вследствие изменения ее первичной структуры – замены аминокислотных остатков генно-инженерными методами [86,87]. С помощью направленного мутагенеза можно не только изменять каталитическую активность ферментов, но и повышать их стабильность. Ковалентная модификация и наложение поперечных сшивок во внутренних участках белковой глобулы способствуют повышению стабильности фермента по отношению к инактивирующим агентам. В работе [86] проводился скрининг коллекций термофильных и гипертермофильных микроорганизмов с целью обнаружения ферментов с необходимой специфичностью и устойчивостью. В процессе работы анализ гипертермофилов вызывает значительные проблемы из-за трудности их изоляции и культивирования. Генно-инженерные подходы требуют детального исследования структуры фермента, этот метод технически сложен в выполнении.

Второй способ повышения стабильности ферментов представляет собой создание оптимальной макросреды фермента. Он основывается на изменении состава растворителя при добавлении различных растворимых веществ, например, солей, органических растворителей и др. В результате чего меняется гидратная оболочка фермента и, как следствие, возможно изменение его структуры и стабильности [86,88]. Данный метод прост и универсален, не требует точного знания структуры ферментов. Однако в литературе приведены противоречивые данные, которые не позволяют с точностью утверждать о влиянии низкомолекулярных агентов на стабильность ферментов и об эффективности этого метода в целом.



Третий подход лишен недостатков первых двух методов повышения стабильности ферментов. Он основан на защите третичной структуры фермента от влияния неблагоприятных факторов среды. Данный метод реализуется путем иммобилизации фермента (ковалентной или нековалентной модификации белка) [12,86,89].

#### **1.4. Иммобилизация ферментов**

Прием иммобилизации – традиционный метод стабилизации, успешно применяемый в химии белка и биотехнологии. Исследование процессов иммобилизации ферментов ведется уже более четырех десятилетий и представляет одно из главных направлений современной прикладной биотехнологии [90-92]. В настоящее время данный метод широко применяется в производстве лекарственных и косметических средств, в пищевой промышленности, в химическом анализе и других областях. Иммобилизация ферментов достигается путем связывания фермента с нерастворимой матрицей (подложкой) или включения его в структуру носителя, что способствует ограничению подвижности белковой молекулы фермента [92,93].

Цели иммобилизации различны: стабилизация биокатализатора, перевод его в гетерогенное состояние, придание ему новых структурных и функциональных свойств для повышения эффективности его использования в процессе катализа. С помощью иммобилизации возможно пространственно отделить фермент от реагентов, что дает возможность получать чистый продукт без примесей, остановить реакцию в необходимый момент времени, регенерировать фермент в конце реакции и неоднократно использовать его в новом биотехнологическом процессе [94,95].

Еще одним важным аспектом является придание белкам посредством образования надмолекулярных структур необходимых физико-химических свойств (гидродинамических, изменение пространственной ориентации биомолекул, агрегатного состояния). Вышеперечисленные свойства очень важны для расширения области практического применения ферментов.

Основным фактором, способствующим непрерывному и длительному функционированию иммобилизованных систем, является способность сохранения активности при длительном хранении препаратов и в ходе протекания катализа (операционная стабильность). В процессе иммобилизации ферменты могут приобретать свойства, не характерные для них в свободном состоянии [92,95].

Из ряда литературных источников [33,34,52,96] известно, что ферменты в иммобилизованном состоянии обладают такими важными свойствами как пролонгированность действия, устойчивость к денатурирующим агентам, возможность отделения фермента от продуктов реакции для повторного использования, а также повышенная стабильность.

Одним из результатов иммобилизации является изменение конформации фермента при его взаимодействии с матрицей-носителем. Этот факт может объяснять сохранение операционной стабильности и устойчивость фермента при термо- и рН-инактивациях [75,95,97]. Следовательно, чем более прочно закреплен фермент на носителе, тем сложнее повлиять на его активный центр различным денатурирующим факторам. При использовании различных физических методов было доказано, что молекулярная структура фермента после его иммобилизации на носителе становится более жесткой и, поэтому, конформационные изменения в белках затруднены.

Таким образом, значительное количество литературных данных свидетельствует о стабилизации фермента при осуществлении его связывания с матрицей [13,22,25,76,28,33,34,91,92].

#### ***1.4.1. Методы иммобилизации ферментов***

В течение последних двух десятилетий было опубликовано множество работ и литературных обзоров об иммобилизации ферментов, в которых значительное внимание уделялось методам иммобилизации.

Существует четыре способа подготовки (активации) фермента и носителя для иммобилизации [13,98-100].

1. Активации фермента до процесса иммобилизации, которая выполняется перед связыванием его с носителем. Этот метод используется достаточно редко вследствие высокой вероятности потери активности фермента из-за химической модификации не только специфических реакционноспособных групп, но и каталитического центра.

2. Активация носителя перед иммобилизацией фермента. Это наиболее известный и широко используемый метод ковалентного связывания нативного фермента с носителем.

3. Использование реакционноспособных би- или многофункциональных связующих агентов, которые служат посредниками между ферментом и носителем.

4. Модификация фермента с помощью методов рекомбинантной ДНК с целью введения в его молекулу функциональных групп, способных адсорбироваться на определенных носителях.

Способы иммобилизации крайне разнообразны, что дает возможность подобрать наиболее оптимальный способ включения биомолекул с учетом их последующего применения.

Принято выделять два метода иммобилизации биологически активных веществ: физический и химический [94,101].

#### *Физические методы иммобилизации*

- Адсорбция. При адсорбционной иммобилизации биоактивное вещество закрепляется на поверхности носителя за счет гидрофобных, электростатических, дисперсионных и водородных связей. Эффективность этого метода определяется площадью удельной поверхности и пористостью носителя. К недостаткам адсорбционной иммобилизации относят невысокую прочность связывания белка с носителем, что ограничивает возможности использования иммобилизованного препарата, полученного таким методом, из-за его десорбции с носителя [91,102-105].

Примеры исследования адсорбционной иммобилизации описаны в значительном количестве научных работ. Так ChenZun, ZhouHui, LiWei и др.

[106] провели иммобилизацию глюкоамилазы на крахмальном геле. Результаты исследований показали, что иммобилизованный фермент имел в 8 раз большую удельную активность, в 10 раз повышенный температурный оптимум действия и был более стабилен, чем свободный фермент.

В работе [107] проведена иммобилизация ванадий-зависимой бромпероксидазы из *Corallina officinalis* на подложке из ацетата целлюлозы, последняя сохраняла 50% активности свободного фермента. Иммобилизованный фермент обладал высокой термостабильностью, которая позволяла использовать его многократно. Устойчивость иммобилизованного препарата к метанолу была такая же, как и у свободного фермента, а устойчивость к ацетону и этанолу значительно выше.

В работах Schafhauser D.Y., Storey K.V. [108] была изучена возможность иммобилизации глюкоизомеразы на гранулах из кости цыпленка путем адсорбции. Активность связанного фермента составляла  $32 \pm 1\%$  от активности того же количества фермента в нативном состоянии; удельная активность при иммобилизации снижалась от  $11,1 \pm 0,7$  до  $3,9 \pm 0,5$  Е/мг белка. По сравнению с ферментом в свободном состоянии иммобилизованный препарат характеризовался трехкратным увеличением константы Михаэлиса  $K_m$  для реакции с фруктозой и пятикратным снижением максимальной скорости  $V_{max}$ . Была показана возможность проведения реакции при высоких (выше  $55^\circ\text{C}$ ) температурах, однако при непрерывном использовании и длительном хранении активность иммобилизованного материала постепенно снижалась.

- Включение в структуру гелей. Благодаря своей простоте и универсальности данный метод иммобилизации ферментов широко распространен. Включение биоактивного вещества в структуру геля можно проводить несколькими путями. В одном случае белок вносят в водный раствор мономера, после чего идет полимеризация, способствующая образованию пространственной структуры геля, включающая в свои ячейки молекулы биологически активного соединения. В другом случае белок

вводят в уже готовый раствор полимера, который потом переводят в состояние геля [22,80,109,110]. Иммобилизация данного типа имеет ряд преимуществ: позволяет равномерно распределить биологически активное вещество в объеме носителя, обеспечивает многократное использование иммобилизованного препарата. Как правило, иммобилизованные препараты на основе геля обладают достаточной механической прочностью, тепловой, химической и биологической стойкостью. Недостатком этого способа иммобилизации является возможное препятствие взаимодействию биологически активного вещества с субстратом, которое создает гелеобразная полимерная матрица. Это может привести к снижению эффективности применения иммобилизованного препарата.

В работе Кулис Ю.Ю. и Песлякене М.В. [111] описана иммобилизация алкогольоксидазы из *Candida boidinii* посредством включения белка в структуру геля, который содержит глутаровый альдегид и сывороточный альбумин в буферном растворе. В процессе нанесения его на лавсановую мембрану в гелевую структуру дополнительно вносят азид натрия, который связывается в комплекс в активном центре фермента, что подтверждается изменением спектра поглощения в интервале длин волн 400-700 нм.

В работе Пучкаева А.В., Метелицы Д.И. [112] рассмотрена возможность включения уреазы в обращенные мицеллы аэрозоля в октане и описаны исследования по инактивации уреазы в мицеллярных системах, образованных разными по природе ПАВ. Исследования показали, что стабильность уреазы зависит не только от концентрации фермента и гидратации мицелл, но и в значительной степени определяется природой ПАВ и составом обращенных мицелл.

- Микрокапсулирование. Этот современный метод иммобилизации представляет собой заключение микроскопических объемов жидких, твердых или газообразных продуктов в полимерные оболочки. Сущность микрокапсулирования заключается в ограничении биологически активного вещества от окружающей среды с помощью мембраны полимера.

Микрокапсулы широко применяются в медицине для адресной доставки различных белков, пептидов, гормонов и др. К недостаткам процесса микрокапсулирования можно отнести следующие: в некоторых случаях возможна несовместимость биологически активного вещества с мембраной микрокапсулы, нестабильность мембран микрокапсул, невозможность превращения высокомолекулярных субстратов, низкая степень утилизации материала мембран микрокапсул в организме. В медицине широко используются иммобилизованные препараты ферментов, полученные методом инкапсулирования в альгинат-хитозановые микро- или наночастицы. Основная роль таких иммобилизованных препаратов – осуществлять адресную доставку лекарственного средства и обеспечение его стойкости [113-115].

Существует два принципиально различных способа инкапсулирования биомолекул в альгинат-хитозановые гранулы [95,116,117]. Первый метод – внешнее гелеобразование. В раствор хлорида кальция с помощью «микроразбрызгивателя» вносят раствор альгината натрия, содержащий инкапсулируемый белок. «Микроразбрызгиватель» позволяет получать однородные капли нужного размера. При взаимодействии альгината с ионами кальция образуются полимерные белок-содержащие частицы сферической формы. Гелеобразование происходит от поверхности к центру частиц.

Другой метод - внутреннее гелеобразование проводят с помощью добавления к раствору альгината измельченный твердый карбонат кальция. Полученную смесь эмульгируют в растительном масле, которое содержит ПАВ. Гелеобразование инициируют посредством снижения рН системы (добавлением 0,2% уксусной кислоты). Далее частицы геля промывают от масла. Затем проводят адсорбцию фермента на полученных сферических частицах, после чего покрывают пленкой хитозана по механизму электростатического комплексообразования.

Методу микрокапсулирования посвящено множество работ [111,115,119-121], в которых проведена иммобилизация таких ферментов, как липаза, трипсин, субтилизин, трипсин и алкогольдегидрогеназа. Полученные препараты могут быть использованы для катализа реакций, как в воде, так и в органических растворителях.

В работе Wright Wayne W., Baez Juan Carlos, Vanderkooi JaneM. [122] предложен совершенно новый подход к иммобилизации фермента путем включения его в оптически чистые стекла, полученные из смеси трегалозы и сахарозы. В такие стекла были включены белки алкогольдегидрогеназы из печени лошади и парвальбумин трески. Наличие триптофановой флуоресценции свидетельствовало об иммобилизации белковой структуры.

В исследовании Huzjak D. и сотрудников проведена иммобилизация галактозидазы на Эупергите С (акриловые бусинки, активированные эпоксидом) в течение 24 часов при рН 7,5. Иммобилизованный фермент был стабилен в том же диапазоне рН, что и свободный, однако обладал большей устойчивостью к воздействию тепла и денатурации мочевиной [123].

В исследованиях Mehrmoush Amid, Yazid Manap [124] изучен метод инкапсулирования амилазы в частицы хитозана с использованием сублимационной сушки. Было показано повышение стабильности и сохранение активности фермента в иммобилизованном состоянии (эффективность инкапсулирования составила 96,2%) в сравнении с нативной амилазой.

- Включение в липосомы.

Липосомы представляют собой замкнутые сферические двухслойные структуры, в состав которых входят биослои липидов диаметром до 400 нм. Некоторые исследования посвящены способу получения ферментсодержащих липосом путем включения ферментов в полимерные липосомы. Для получения липосом таким методом используются липиды с кратной связью в составе. Далее после включения фермента в липосомы проводят полимеризацию молекул липидов (например, с помощью УФ -

облучения). Таким образом, получают ковалентносшитые замкнутые бислойные липидные мембраны. Полимерные липосомы обладают более высокой стабильностью по сравнению с обычными. Липосомы широко используются в качестве модельной системы при изучении свойств биомембран. Они позволяют создавать элементы биоструктур непосредственно из материала биологических мембран [113,125-127].

#### *Химические методы иммобилизации*

Химические методы иммобилизации ферментов являются основным способом получения гетерогенных биокатализаторов [22,25,43,75,99-102,128].

При химической иммобилизации происходит образование ковалентных связей между ферментом и носителем. Основным преимуществом ковалентной иммобилизации по сравнению с другими методами является отсутствие барьера между ферментом и реакционной средой, и, следовательно, отсутствие диффузионного ограничения. Следующее преимущество – это возможность создания препарата на основе прочных связей между ферментом и носителем. Такая связь биоактивного соединения с носителем обеспечивает высокую прочность образуемого соединения. Это особенно важно для обеспечения воспроизводимых результатов в аналитических целях, а также для проведения процессов в пищевой промышленности и медицине [12,102,105].

Посредством ковалентной связи фермент надежно прикрепляется к носителю. При разных условиях протекания реакции – рН среды и температуре, фермент не загрязняет целевой продукт и не может оторваться от подложки. В фармацевтических производствах, при переработке пищевого сырья и проведении аналитических исследований загрязнение ферментом недопустимо. Еще одним преимуществом является то, что при образовании новых химических связей можно направленно влиять на свойства фермента, например, увеличить каталитическую активность, стабильность, субстратную специфичность и т.д. [102,127,129].



При химической ковалентной иммобилизации важным условием является то, что образовавшиеся химические связи не должны затрагивать активный центр фермента. Чем дальше от поверхности носителя находится фермент, тем более просто к нему приблизиться молекуле субстрата. В связи с этим существуют разные способы химической иммобилизации, в зависимости от того, каким способом происходит связывание белка с носителем:

- ковалентное связывание белка с полимерным носителем. Однако химическая модификация БАВ может приводить к значительным изменениям в их свойствах, что значительно влияет на качество конечного продукта и не всегда желательно [100,128].
- сшивка молекул фермента с использованием бифункционального соединения, которое содержит две или более функциональных групп, которые способны связаться как с белком, так и с носителем. Благодаря подобной «вставке» связующего соединения удастся избежать снижения ферментативной активности иммобилизованного препарата [22,34,102,130].

#### ***1.4.2 Носители для иммобилизации ферментов***

Успехи использования иммобилизованных ферментных препаратов в различных отраслях промышленности и медицины в значительной мере определяются выбором носителя для иммобилизации фермента.

При его выборе необходимо учитывать ряд требований к несущей матрице [13,19,20,26,91,106,129,131-133], важнейшими из которых являются следующие.

- Гидрофильность, которая влияет на тип и прочность нековалентных взаимодействий белок-матрицы, а также на адсорбцию, распределение и доступность субстрата и продукта.
- Механическая прочность/жесткость. Эти свойства зависят от типа реактора, используемого для проведения ферментативного процесса. При использовании реактора с мешалкой прочность должна быть

достаточной, чтобы минимизировать износ. Образование частиц размером менее 50 мкм может привести к закупорке сетчатых тарелок и фильтров.

- Проницаемость и площадь поверхности. В большинстве случаев достаточная площадь поверхности (больше  $100 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ ) и высокая пористость являются желательными свойствами для быстрого взаимодействия фермента с субстратом.

- Низкая растворимость в воде. Это свойство важно не только для предотвращения потерь ферментного препарата в целом, но и для минимизации загрязнения продукта реакции ферментом.

- Возможность получения удобных форм (гранул, частиц, мембран и т.д.).

- Регенерируемость. Это свойство представляет интерес в случае дорогостоящего материала носителя.

- Низкий уровень неспецифических взаимодействий с примесями, биологическая и биохимическая стойкость. При долгосрочном использовании иммобилизованного препарата носитель должен быть устойчив к микробной деградации и воздействию примесей.

- Доступность и низкая стоимость. В природе отсутствуют универсальные носители, которые обладают всеми вышеперечисленными свойствами, поэтому выбор используемого для иммобилизации материала определяется конкретными условиями ферментативного процесса.

По происхождению материалы носителей могут быть разделены на органические и неорганические [26,131,134].

Неорганические носители (например, стекло, силикагель, оксид алюминия, бентонит, гидроксипатит, оксид никеля и титана, оксид циркония) часто показывают хорошие механические свойства, термостойкость и устойчивость к воздействию микроорганизмов и органических растворителей. С другой стороны, эти материалы имеют непористую структуру и небольшую поверхность связывания. Часто

используются силикагели, известные под такими торговыми марками, как Promaxon (Promat), Spherosil (Rhone-Poulenc) или Aerosil (Degussa) [135,136].

На основе силикагеля, глины, циркония, металлов и их оксидов (железа и титана) создаются разные типы неорганических носителей для иммобилизации ферментов. Широкому внедрению неорганических носителей в процессы производства способствуют возможность их регенерации, придания им любой конфигурации.

Кремнеземы могут быть получены с определенными размерами пор, но их производство отличается высокими затратами. Кроме того, кремнеземы обладают ограниченной стабильностью в щелочной среде. Микропористые кремнеземы как носители имеют ряд преимуществ: механическую прочность, химическую инертность к растворителям, наличие жесткого каркаса с определенным размером пор, а также стойкость к микроорганизмам. Но кремнеземы используются в ограниченном диапазоне рН, для них характерна неспецифическая сорбция, которую можно устранить посредством различных модифицирующих воздействий. Такая модификация повышает стоимость кремнеземных носителей, из-за чего их внедрение в промышленность часто нецелесообразно [135-137].

Биоалюмосиликаты, глины, а также пористая керамика, включающая в свой состав алюмосиликаты, оксиды циркония и титана, являются наиболее эффективными для промышленного использования. Носители на основе металлов и их оксидов весьма перспективны и обладают повышенной механической прочностью, довольно невысокой стоимостью, стабильностью и отличными гидродинамическими свойствами. Одними из распространенных носителей являются уголь и графитированная сажа [138].

Органические носители делятся на природные и синтетические [26,139,140]. Результатом развития полимерной химии стало то, что высокомолекулярные соединения начали эффективно использоваться в медицине как конструкционные материалы. В фармацевтической

промышленности полимеры используются в качестве вспомогательных веществ.

К природным носителям относятся липидные, белковые (структурные белки - коллаген и кератин; глобулярные белки - альбумины) и полисахаридные. Важным преимуществом носителей на основе природных биополимеров является то, что матрица не только не вызывает токсических эффектов, но и обладает функциональной физиологической активностью.

Полисахариды представляют особый интерес, так как это экологически безопасные, доступные исходные материалы, которые могут создать необходимое микроокружение для многих ферментов в процессе иммобилизации [26,139,141,142]. Наиболее важными полисахаридами, которые активно используются в иммобилизации ферментов, являются целлюлоза, альгинат, каррагинан, декстран, агароза, хитин или хитозан (получаемый из хитина путем деацетилирования). Широкое использование этих полисахаридов обусловлено гидрофильностью и наличием реакционноспособных функциональных групп, которые участвуют в различных химических реакциях, образуя ковалентные связи. Но данные носители несовершенны, так как они неустойчивы к действию микроорганизмов и имеют значительную стоимость [26,141,142].

Альгинаты при комнатной температуре без внесения реагентов способны к гелеобразованию, легко биodeградируют в условиях микроокружения в клетке. В клинической практике эти соединения применяются для получения иммобилизованных препаратов, гормонов, пробиотиков [143,144].

Кроме полисахаридных носителей используются также и носители белковой природы. Важными свойствами белков как носителей являются достаточная сорбционная емкость, проницаемость, способность к лизису в организме человека, возможность производства гранул и формирования тонких пленок (благодаря фибриллярной природе), высокая химическая прочность, значительная площадь поверхности [26,145,146]. Иммобилизацию

на носителях белкового происхождения можно производить, используя сшивающие агенты. Одним из недостатков препаратов на основе белковых носителей, используемых в медицине, является высокая иммуногенность. В качестве носителей часто применяются структурные белки: кератин, фиброин, коллаген, миозин (сократительный белок), белки, участвующие в транспорте различных веществ (сывороточный альбумин).

Синтетические полимеры подразделяются на полиэфирные, полиамидные, полиметиленовые носители. Основными синтетическими органическими носителями являются поливиниловый спирт, полистирол, полиамид, полиакрил, полипропилен и сополимеры на основе стирола или малеинового ангидрида и этилена.

В качестве носителей для иммобилизации ферментов в производстве гелей и микрокапсул широко используют полиамидные носители, полимеры на основе стирола, производные акриловой кислоты. Высокомолекулярные вещества подобного типа являются основой для получения микропористых и макропористых ионитов, используемых при сорбционной иммобилизации и для получения ионообменных материалов [103,104,135,137,147].

Полистирол был первым синтетическим полимером, который использовался в качестве носителя для иммобилизации ферментов. Процесс иммобилизации происходил в основном благодаря адсорбционному связыванию с ферментом. Однако гидрофобность носителя приводила часто к денатурации фермента во время связывания и, следовательно, потери активности [43,148,149].

Также широко используется включение ферментов и клеток микроорганизмов в полиакриламидный гель (ПААГ). Некоторые фирмы производят носители разнородного типа, выпускаемые на основе ПААГ и агарозы. Полиамидные носители имеют ряд преимуществ: они могут иметь различную физическую форму (волокна, порошки, гранул, трубки, мембраны), а также коммерчески доступны и обладают биоинертностью и

стабильностью к воздействию биологических факторов, что способствует их применению для медицинских целей [61,150-152].

Поскольку в данной работе в качестве носителей для иммобилизации использовали полисахариды, дадим им более подробную характеристику.

## **1.5. Природные полисахариды**

### **1.5.1 Целлюлоза**

Целлюлоза является полисахаридом, содержащим до 10 000 глюкозных остатков, соединенных между собой  $\beta$ -гликозидными связями, не имеющим боковых ответвлений. Молекулы данного полимера соединены водородными связями, которые придают ему механическую прочность [153-155].

Целлюлоза подобно крахмалу ступенчато гидролизуется в кислой среде, практически не обладает восстанавливающими свойствами и не участвует в других реакциях карбонильной группой, свойственных моносахаридам [156].

При действии на целлюлозу окислителей (перекись водорода, озон, соли хлорноватистой кислоты, перманганат калия, разбавленная азотная кислота) получают сложные продукты окисления, которые называются гидроксицеллюлозами. Химические свойства целлюлозы определяются присутствием гидроксильных групп. Главными реакциями целлюлозы как многоатомного спирта являются образование алкоголятов и эфиров целлюлозы. Целлюлоза при обработке концентрированными растворами едких щелочей образует прочные соединения, которые большинство исследователей относит к алкоголятам [156-158].

Как было отмечено [13,159], хлопковая целлюлоза (в виде, например, медицинской или хирургической марли) содержит в своем составе как карбонильные, так и карбоксильные группы, которые, возможно, имеются и в нативной целлюлозе, но в большей степени образуются при обработке целлюлозы.

Хлопковая целлюлоза состоит на 65-75% из кристаллической и на 25-35% из аморфной части [159]. Доказано, что процесс окисления целлюлозы

йодной кислотой идет на поверхности и затрагивает структуру кристаллической части целлюлозы [13,160,161]. С увеличением степени окисления целлюлозы раствором периодата натрия степень ее кристалличности снижается [160]. Целлюлоза, как гидрофильное полярное соединение, способна набухать в воде и полярных растворителях. Это происходит из-за того, что молекулы растворителя, проникая в аморфные фракции целлюлозы, разрывают межмолекулярные водородные связи и образуют гидратные и сольватные оболочки вокруг гидроксильных групп полимера. Степень набухания целлюлозы зависит от природы волокна, температуры, рН среды и состава растворителя. Микропоры волокна могут увеличиваться в несколько раз. Средний размер пор хлопкового волокна в сухом состоянии  $-3,5\text{Å}$ , а в набухом –  $30-50\text{ Å}$ , поперечное сечение увеличивается при набухании примерно на 50% [162].

Известно, что в настоящее время целлюлоза и ее производные широко используются как носители для иммобилизации биологически активных веществ. Целлюлозные носители эффективны в тех случаях, когда возникает необходимость в материалах, обладающих хорошими дренирующими свойствами, то есть способностью быстро очищать раневую поверхность [13,17,19,20,163]. Природную целлюлозу с давних времен используют в медицине для изготовления перевязочных средств. Изделия на ее основе обладают необходимыми санитарно-гигиеническими свойствами, химически не взаимодействуют с биологическими жидкостями и тканями. Таким образом, медицинские перевязочные средства на основе целлюлозы обладают рядом преимущественных свойств [13,17,20,164,165]:

- пассивно участвуют в процессе очищения раны;
- сорбируют продукты распада тканей;
- защищают рану от аэрогенного загрязнения;
- обеспечивают пролонгированный эффект лекарственного препарата;
- сохраняют температурный режим раневой среды.

Наряду с целлюлозой в качестве носителя для иммобилизации ферментов широко используется производное - диальдегидцеллюлоза (ДАЦ). Диальдегидцеллюлозу получают в результате окисления целлюлозы периодатом натрия. Данный метод был разработан в 1928 году и основывался на одновременном окислении обеих гидроксильных групп целлюлозы, так же как и других полисахаридов (крахмал, альгиновая кислота) и моносахаридов до альдегидных групп [159,166]. По мнению некоторых авторов [13,164,167], данный процесс не является полностью селективным, около 10% общего количества полученных путем окисления альдегидных групп находятся у C<sub>6</sub> элементарного звена макромолекулы целлюлозы, при окислении образуется незначительное количество как карбоксильных, так и кетонных групп. В работе [167] приведены всевозможные схемы окисления периодатом натрия хлопковой целлюлозы.

С увеличением количества альдегидных групп в образцах ДАЦ повышается нестабильность по отношению к щелочам, причем окисление альдегидных групп в образцах ДАЦ до карбоксильных ведет к получению препаратов, практически не подверженных действию щелочей независимо от первоначальной степени окисления [168].

З.А. Роговиным с сотрудниками [159] подробно исследованы свойства ДАЦ. Ими было установлено, что замена гидроксильных групп на альдегидные, повышает гигроскопичность препаратов. Особенно это проявляется для степени окисленности выше 15%. В этой же работе приведены данные по растворимости ДАЦ в 2% растворе щелочи. Образование ацеталей в образцах ДАЦ в кислой среде описано в работах [160,161].

В некоторых работах [159,169] были оценены санитарно-гигиенические свойства ДАЦ различной степени окисленности (до 15%), содержащей и не содержащей иммобилизованный трипсин. Авторами было установлено, что после окисления целлюлозы с помощью раствора йодной кислоты и иммобилизации на ней белков такие параметры как



водопоглощение, воздухопроницаемость, жесткость материала и др. по сравнению с исходной целлюлозой (медицинской марлей) в пределах погрешности эксперимента не изменяются. С увеличением степени окисления носителя прочностные характеристики материала сильно снижаются.

В работах [170,171] подробно изучали как процесс окисления, так и свойства полученной диальдегидцеллюлозы. Авторами подробно исследованы процессы окисления различных видов целлюлозы (хлопковая, микрокристаллическая и др.), приведены данные о растворении ДАЦ в процессе окисления и отмывки носителя от продуктов реакции. Показано, что увеличение температуры окисления ведет к значительному переходу в раствор окисленной части целлюлозы, поэтому не удастся получить со 100% выходом нерастворимые образцы ДАЦ со степенью окисленности более 25%.

### ***1.5.2 Хитозан: физико-химические свойства, характеристика как носителя для иммобилизации и области применения***

Хитозан - простейшее производное хитина, аминополисахарид 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозан (рисунок 1.2).

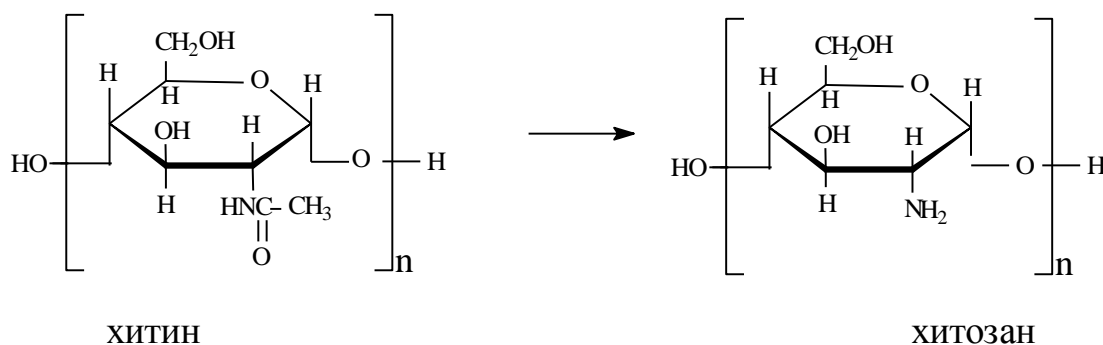


Рисунок 1.2 - Структурная формула звена хитозана

Хитозан получают с помощью реакции отщепления от молекулы хитина (N-ацетил-D-глюкозамина) ацетильной группы (реакция деацетилирования) под действием концентрированной щелочи (более 30%) при температуре 120°C в течение нескольких часов [172,173].

С помощью ИК-спектроскопии было выявлено, что при образовании хитозана уменьшается интенсивность полос поглощения карбонила ( $1625\text{ см}^{-1}$ ) амидной группы ( $3260$  и  $3110\text{ см}^{-1}$ ) и возрастает интенсивность полос  $\text{NH}_2$ -группы ( $3365$ - $3445\text{ см}^{-1}$ ) [172,174].

Рентгеновские исследования хитозана показали, что он имеет такую же аморфно-кристаллическую структуру, что и хитин, но меньшую упорядоченность макромолекул. Основными параметрами, характеризующими растворимость, механические и другие свойства хитозана, являются степень кристалличности, степень деацетилирования и молекулярная структура.

Степень деацетилирования, являющаяся одной из ключевых характеристик хитозана, определяет количество свободных аминогрупп в его составе. Как правило, коммерческий хитозан имеет степень деацетилирования порядка 75-95% [172,174,175].

Хитозан не является монодисперсным полимером, поэтому еще одним важным параметром, который характеризует разброс по молекулярной массе в образцах хитозана, является индекс полидисперсности.

Возможность получения образцов хитозана с разными молекулярными массами и степенью деацетилирования придает этому природному носителю уникальность и расширяет область его применения.

В отличие от хитина хитозан способен растворяться в разбавленных органических кислотах (уксусной кислоте) [173,176]. Растворимость хитозана сильно зависит от концентрации раствора, которая влияет на вязкость хитозана (при увеличении концентрации раствора хитозана до 4% вязкость повышается до 30 раз). Присутствие свободных аминогрупп в структуре хитозана значительно улучшает его растворимость в воде по сравнению с хитином. Увеличение количества свободных аминогрупп в каждом звене молекулы хитозана придает ему свойство полиэлектролитного набухания. Такой эффект может наблюдаться из-за асимметрии макромолекул в растворе хитозана и увеличения эффективного объема в

результате отталкивания одноименно заряженных протонированных аминогрупп [172,176].

Из-за своей химической структуры хитозан способен к взаимодействиям с образованием четырех типов связей: водородных, гидрофобных, ионных связей, а также связей по типу комплексообразования [172,177]. Наличие аминогруппы в структуре хитозана дает возможность образования ионной связи с отрицательно заряженными группами многих соединений (кислот, альдегидов, эпоксидных смол, ангидридов и др.). Также хитозан способен к комплексообразованию благодаря наличию неподеленных электронных пар у атомов азота и кислорода. Вследствие этого возможно образование связей хелатного типа с металлами [172,178]. Хитозан образует подобные связи со многими металлами, кроме щелочных и щелочноземельных. Хитозан может также образовывать водородные и гидрофобные связи при взаимодействии со многими органическими веществами [179].

Способность хитозана к межмолекулярным взаимодействиям дает возможность образования комплексов с другими биополимерами (белками, полисахаридами, нуклеиновыми кислотами). Полученные полимерные комплексы зачастую обладают абсолютно другими физико-химическими свойствами и биологической активностью, что значительно расширяет спектр областей применения исходных биополимеров.

#### *Взаимодействие хитозана с белками*

Как известно, белки отличаются друг от друга физико-химическими свойствами и строением, следовательно, типы их взаимодействия с хитозаном также различны. В зависимости от условий реакции между белком и хитозаном могут протекать благодаря взаимодействию карбонильных групп хитозана и аминогрупп белковой молекулы (реакция Майяра) [180] с образованием ковалентных связей. Если белок и хитозан находятся в растворе и имеют противоположные заряды, то такое взаимодействие приводит к образованию полиэлектролитных комплексов.

Исследования хитозан-белковых комплексов многих авторов подтверждают тот факт, что белок после разрушения такого полимерного комплекса под действием каких-либо факторов возвращается в свое первоначальное состояние, претерпев конформационные изменения [181,182]. Благодаря изменению конформации белков возможно придание им новых уникальных свойств, которые могут быть востребованы в различных отраслях промышленности.

#### *Взаимодействие хитозана с полисахаридами*

Полисахариды представляют собой высокомолекулярные углеводы, состоящие из моносахаридов, которые связаны между собой гликозидными связями [182]. К полисахаридам относятся: целлюлоза, альгинат, крахмал, декстрин, гликоген, и др., а также непосредственно сам хитозан.

Уникальный комплекс свойств полисахаридов привлекает внимание большого количества исследователей и позволяет их применять в различных научных и практических целях для создания биоматериалов различного спектра действия [118,119,183].

Альгинаты – соли альгиновой кислоты, в отличие от хитозана, способны частично растворяться при щелочных значениях рН. Карбоксильная группа альгиновой кислоты способна взаимодействовать с аминогруппой хитозана, образуя при этом полиэлектролитный комплекс [182,184,185]. На данном этапе комплексы хитозан-альгинат достаточно широко применяются в медицине для доставки БАВ. Получение микрочастиц может производиться благодаря одностадийному процессу дозированного внесения раствора одного полисахарида в раствор другого, либо, с помощью двухстадийного процесса, когда сформированные Са-альгинатные частицы помещаются в раствор хитозана, и образование комплекса происходит на поверхности частиц.

В зависимости от количества взятых полисахаридов возможно получение частиц разного размера (от 100 нм до 3 мкм). Для того чтобы получить стабильные по размеру частицы, процесс комплексообразования

необходимо проводить при мольном соотношении хитозан:альгинат 3:1. В таких условиях образуются частицы размером 450-750 нм. Если же использовать избыток альгината, то частицы имеют размеры 1,5-3 мкм [184,185]. Следовательно, варьируя соотношение полисахаридов, участвующих в образовании комплекса друг с другом, можно получать частицы заданного размера.

Интересным аспектом взаимодействия хитозана с альгинатом является образование композиционных пленок на основе комплексов хитозан-альгинат [186]. В данной работе проводили исследование процесса получения композиционных плёнок путем смешения 0,1% раствора хитозана в 2% растворе уксусной кислоты и альгината в течение 30 минут. При смешении полисахаридов сразу же образовывался осадок различной плотности. При соотношении компонентов 1:1 образовывался мутный однородный гель, который имел высокую оптическую плотность. Исследование влияния pH среды на процесс комплексообразования показало, что максимум образования комплекса между полимерами наблюдается при pH 5,45. Полученный комплекс не растворяется в воде при слабокислых и нейтральных значениях pH.

Изучение механических характеристик пленок показало, что они имеют более низкую прочность в сравнении с пленками чистых полимеров. Однако сополимерные пленки более эластичны, чем альгинатные, но менее эластичны, чем хитозановые [187].

Авторы работ [188,189] исследовали влияние степени деацетилирования и молекулярной массы хитозана на свойства хитозан-альгинатовых комплексов. Было показано, что их прочность прямо пропорциональна плотности заряда на молекулах хитозана и обратно пропорциональна его молекулярной массе. Было установлено, что высокомолекулярный хитозан образовывал крупные гелеобразные частицы с альгинатом, а хитозан меньшей молекулярной массы образовывал частицы меньшего размера. Из последних частиц получали более гомогенные пленки,

характеризующиеся наибольшей водонепроницаемостью при нейтральном рН.

#### *Взаимодействие хитозана с целлюлозой*

Интересным аспектом изучения свойств хитозана является взаимодействие его с целлюлозой. На основе именно этих полисахаридов создано огромное количество иммобилизованных ферментных препаратов, используемых в медицине, фармакологии и других областях [13,19,163,170,190].

Взаимодействие этих полисахаридов изучали в большом количестве работ и, как правило, с применением различных методов. Так, с помощью приема потенциометрического титрования было установлено, что наиболее эффективное взаимодействие происходило в случае стехиометрического соотношения компонентов 1:1. В работе [191] было установлено образование полиэлектролитных комплексов хитозана и карбоксиметилцеллюлозы. В этом исследовании был доказан электростатический характер взаимодействия хитозана и производного целлюлозы. Методом ИК-спектроскопии было выявлено появление полосы колебаний в области  $1589 \text{ см}^{-1}$  у полученного полиэлектролитного комплекса, что объясняется образованием связи между карбоксильными группами КМЦ и аминогруппами хитозана. Однако колебания в области  $1755 \text{ см}^{-1}$  доказывают то, что данный комплекс может диссоциировать. Этот факт подтверждает возможность смещения равновесия в сторону образования интерполимерного комплекса, которое осуществляется за счет образования водородных связей между молекулами карбоксиметилцеллюлозы и хитозана.

При исследовании термостабильности межмолекулярного комплекса хитозана и КМЦ было показано, что данный комплекс имеет меньшую температуру разложения, чем у КМЦ, но большую, чем у хитозана, что характеризуется одной температурой разложения, в отличие от механической смеси биополимеров. Это также подтверждает образование комплекса между хитозаном и КМЦ.

В исследовательской работе [192] были также изучены взаимодействия целлюлозы с хитозаном, но уже на молекулярном уровне. В данном исследовании изучали ИК-спектры обработанной давлением смеси хитозана и целлюлозы, в которых была обнаружена отличительная система водородных связей, что свидетельствует о межмолекулярном взаимодействии полисахаридов. В работе [193] исследовали комплекс хитозана с целлюлозой, который был синтезирован бактериями р. *Acetobacter*. Сделано заключение о способности интеграции одного полимера в другой. При инкубации микроорганизма на среде, содержащей D-глюкозамин, хитин и хитозан, происходило включение этих соединений в состав синтезируемой целлюлозы. Пленки, полученные на основе такого сополимера, обладали достаточной механической прочностью, имели поры размером менее 100 нм, были нетоксичны, а также способствовали развитию и росту фибробластов и кератиноцитов.

В литературе приведено много данных по исследованию свойств и областей применения хитозана [12,172-178,185,187,190-193]. Неоднократно отмечались такие свойства хитозана, как его нетоксичность, биосовместимость, биodeградируемость, антибактериальное и противовирусное действие, биodeградируемость, легкость химической модификации. Для человека LD<sub>50</sub> хитозана составляет примерно 16 г на 1 кг массы.

#### *Области применения хитозана*

Исходя из вышеизложенного, наиболее широкая область применения хитозана - это медицина [13,17,19,194,195]. Хитозан используется в лечении ожоговых, гнойно-некротических ран в виде раневых покрытий, растворов, порошков, мазей, гелей, губок, присыпок, повязок, искусственной кожи. Он обеспечивает активацию фазы биоочистки раны [12,196], ее механическую защиту, ускоряет процессы заживления и регенерации поврежденной ткани. С помощью специально сконструированных полимерных систем, основой которых служит хитозан, возможно получение лекарственных препаратов с

регулируемой фармакологической кинетикой - пролонгированным выделением лекарственного средства (фермента, гормона, антибиотика) в место поражения [197].

Установлено, что хитозан проявляет свойства радиопротектора. Для него характерна повышенная противолучевая активность, как в течение профилактики, так и при лечении [182,198].

Использование хитозана для получения полимерных раневых покрытий обусловлено тем, что в фазе заживления раны наиболее целесообразно использовать полимеры, которые способны к биоразложению и стимулированию процессов ранозаживления. Известно также, что хитозан способен вызывать иммунный ответ благодаря стимулированию макрофагов [199].

Также хитозан используется как основа для создания и пролонгации действия лекарственных препаратов адресной доставки различными методами (перорально, назально, парентерально) [118,119,163]. Хитозан и его производные часто применяют для фиксации переломов и восстановления костных тканей, лечения ожогов; ликвидации дефектов слизистой оболочки полости рта и др. Сульфат хитозана используют в создании лекарственных средств - аналогов гепарина, обладающих антикоагулянтной активностью (замедление свертывания крови, препятствие возникновению тромбов и др.).

В пищевой промышленности возможность использования хитозана определяется почти полным соответствием тем требованиям, которые предъявляются к пищевым добавкам и его свойствами. Хитозан часто используется в качестве консерванта для защиты от условно-патогенной и патогенной микрофлоры, как структурообразователь, эмульгатор и загуститель паст, соусов, приправ, паштетов.

Также хитозан применяется как стабилизатор гетерогенных и гомогенных систем в производстве муссов, желе, пудингов; как антиоксидант для стабилизации жиросодержащих продуктов [200].



Данный полисахарид используется в качестве биопленки для пищевого покрытия овощей и фруктов для сохранения их свежести и увеличения срока хранения [201].

Хитозан используют в качестве БАД для понижения в организме содержания жиров и избыточного холестерина. Хитозан входит в качестве одного из компонентов в состав препаратов для осветления жидкости в процессе получения пива, соков, вина, молочной сыворотки и промывочных вод пищевого производства.

Другой перспективной областью применения хитозана является сельское хозяйство [182,198]. Хитозан используется в производстве гранулированных удобрений, в качестве средства, стимулирующего рост сельскохозяйственных растений.

Хитозан может выступать в роли пестицида, вызывающего продолжительную и эффективную устойчивость к болезням у растений против бактериальных, грибных, вирусных и других заболеваний, при обработке семян до посева и растений в процессе ветвления.

Еще одна сфера применения хитозана - парфюмерно-косметическая промышленность [182,202-204]. Хитозан входит в состав многих средств по уходу за кожей в качестве увлажнителя (косметические кремы, лосьоны) и волосами (шампуни, бальзамы) для придания им блеска и предупреждения образования перхоти. В качестве гелеобразователя хитозан нашел применение в производстве лаков для ногтей, зубных паст, жидкого мыла и др.

В парфюмерии хитозан выступает в роли стабилизатора ароматов туалетной воды и духов.

### ***1.5.3 Альгинат натрия: физико-химические свойства, характеристика как носителя для иммобилизации и области применения***

Альгинаты (соли альгиновых кислот) - полисахариды, получаемые из бурых морских водорослей (*Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Eklonia*, *Pelvetia* и др.)

и представляющие полимерную цепь, которая состоит из остатков полиуроновых кислот (D-маннуронозой и L-гулууронозой), связанных 1.4-β - связями. Альгинаты в воде образуют коллоидные растворы в отличие от нерастворимой альгиновой кислоты. Эти гели имеют высокую степень гидратации, достаточную прочность и относительную эластичность консистенции, которая близка к природным тканям. Структура и состав молекул альгинатов зависит от источника и вида синтезирующей водоросли, что также оказывает влияние на способность к гелеобразованию. Свойства гелеобразования зависят также от концентрации и молекулярной массы полимера [205,206].

Значимость альгинатов в технологии иммобилизации биологически активных веществ очень велика. Изучению взаимодействия альгинатов с белками посвящено большое количество исследовательских работ [95,110,118,205-208], особое внимание из которых следует уделить исследованию Yan Zhou, Shin'ichiro Kajiyama и др. [207]. В нем были получены иммобилизованные в микрочастицах альгината кальция белковые молекулы (размером менее 20 мкм). Альгинатные частицы были однородны и одинакового размера, что является необходимым условием для дальнейшего перорального введения. Для того, чтобы подтвердить иммобилизацию белка в альгинатных частицах использовали реакцию антиген-антитело с флуоресцеином. Иммобилизованные гранулы отчетливо наблюдались во флуоресцентный микроскоп, а небелковые альгинатные гранулы, в свою очередь, имели очень низкую интенсивность флуоресценции.

Необходимость в применении альгинатов привела к тому, что их производство из морских бурых водорослей стало основным направлением их переработки. Уникальные свойства альгинатов обеспечивают широкий спектр их применения в различных областях жизнедеятельности человека.

Альгинаты широко используются в медицине [183,186,1207-210], поскольку они не токсичны для человека. Токсикологические исследования

XX века выявили безопасность использования альгинатов. В 90-х годах Всемирная организация здравоохранения сняла ограничения по ежедневному потреблению альгинатов человеком. Долгие клинические исследования препаратов на основе альгинатов свидетельствуют об их безвредности и нетоксичности, а также отсутствии побочного действия и возможности использования для детей.

Альгинаты широко используются при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Были проведены клинические исследования препаратов альгината, которые доказали их антацидные свойства при внутреннем применении [211]. Основу механизма данных процессов составляет реакция нейтрализации альгинатом соляной кислоты желудочного сока. Альгиновая кислота, образуемая при этом в виде геля, обволакивает и защищает слизистую оболочку желудка. Альгинаты при приеме внутрь взаимодействуют в желудке с соляной кислотой, что ведет к образованию невсасывающегося гелевого барьера, покрывающего слизистую оболочку желудка и защищающего ее от действия пепсина и кислоты. Еще соли альгиновой кислоты ускоряют заживления язвы и эрозии желудка, двенадцатиперстной кишки, способствуют ослабеванию кровоточивости при подобных болезнях желудка и кишечника.

Альгинаты используются для профилактики изжоги и для ее лечения [212].

Во многих клинических исследованиях показана высокая сорбционная активность альгинатов, например, при приеме альгинатсодержащих препаратов сорбция радионуклидов равняется примерно 90%. Также препараты, содержащие альгинаты, проявляют противорадиационные свойства, что доказано при лечении болезней, вызванных действием радиации.

Соли альгиновой кислоты обладают ионообменными свойствами. Ионообменный механизм основывается на выведение с помощью альгинатов из организма тяжелых металлов [213].

Из всех видов альгинатов наиболее эффективным энтеросорбентом является альгинат кальция, он способен устранять радионуклиды как из крови пострадавшего, так и из кишечника, желудка и костной ткани. Было показано, что альгинат кальция эффективно сорбирует ионы таких металлов, как медь, свинец и кадмий.

Все альгинаты являются хорошими пребиотиками для здоровой микрофлоры человека: они способны восстанавливать микробиоценоз в кишечнике, обеспечивают развитие здоровой микрофлоры желудочно-кишечного тракта, подавляют активность патогенных стафилококков, грибов рода *Candida* и др.

Альгинаты используются как конструктивный материал при производстве раневых покрытий. Подобно хитозану, альгинат стимулирует ранозаживление и обеспечивает пролонгированный процесс выделения лекарственного средства в рану [214].

Альгинат является уникальным материалом для биоинкапсулирования [95,110,118,143,208,209]. Под биоинкапсулированием понимается получение различных полимерных систем в форме нано- и микро- гелевых частиц, или полимерных пленок с иммобилизованным БАВ. Биоактивный материал может быть представлен различными веществами (ферментами, пептидами, ДНК, низкомолекулярными гормонами, антибиотиками). Альгинатсодержащие частицы, полученные методом биоинкапсулирования, обеспечивают быструю и адресную доставку лекарственного вещества в очаг поражения.

В пищевой промышленности [212,213,215] альгинаты часто применяют в при производстве жидких, кремообразных и желеобразных продуктов: мармелада, начинок для конфет, фруктовых джемов, майонеза, мясных и рыбных студней, кетчупа в качестве загустителя.

Альгинат натрия служит добавкой в соки и безалкогольные напитки для предания осветляющего эффекта. Такой загуститель, как Е40, встречается в хлебобулочных изделиях.

В работе GargiDey, BhupinderSingh [216] была проведена иммобилизация бактериальной амилазы методом инкапсулирования в частицы альгината кальция. Иммобилизация фермента обеспечила 2-х кратное увеличение его активности и сохранение активности (до 85%) после седьмого цикла использования. Полученный иммобилизованный препарат применяется в пищевой промышленности для увеличения сроков хранения хлебобулочных изделий.

Использование альгинатов в косметологии [216-219] началось еще в прошлом веке и не потеряло своей актуальности до настоящего времени. С помощью альгинатов можно добиться необходимой однородной, структуры лосьонов, кремов, эмульсий.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что гидролитические ферменты находят широкое применение в различных отраслях науки и промышленности. Однако они являются нестабильными, что ограничивает их применение и требует увеличения расходных норм, что приводит к росту себестоимости получаемых с их участием продуктов. Для повышения стабильности ферментов широко применяют иммобилизацию как на синтетических, так и природных носителях, причем правильный выбор носителя играет ключевую роль в создании стабилизированных форм ферментов. Поэтому разработка стабилизированных форм гидролитических ферментов и оценка эффективности их применения является актуальной задачей.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили препараты гидролитических ферментов: трипсин поджелудочной железы крупного рогатого скота («Спофа», Чехия и «Самсон Мед», Россия) с активностью  $3,22 \pm 0,02$  Ед/мг по казеину; протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (НПО «Биопрогресс», Россия) с активностью  $0,016 \pm 0,004$  Ед/мг по азоколлу; амилаза гриба *Aspergillus oryzae* (AB Enzymes GmbH, Германия) с активностью  $25,05 \pm 1,15$  Ед/мг по крахмалу; липаза поджелудочной железы крупного рогатого скота («Sigma-Aldrich», США) с активностью  $7,76 \pm 0,11$  Ед/мг по оливковому маслу.

В качестве субстратов в работе использовали: казеин по Гаммерстену («Биолар», Латвия); азоколл - измельченный нерастворимый коллаген из шкур свиньи, ковалентно модифицированный диазокрасителем (НПФ "Диагностикум", Россия); картофельный крахмал («Лабтех», Россия); оливковое масло («Extra Virgin», Испания); ячменный солод («Souffiet», Россия); жиросодержащий отход мясоперерабатывающей промышленности («Кампо Мос», Россия).

Полисахариды: хитозан со степенью деацелирования 75%, молекулярной массой 480 Да, с содержанием основного вещества не менее 87% («Sigma-Aldrich», США), альгинат натрия с молекулярной массой 10 кДа, с содержанием основного вещества не менее 85% («Sigma-Aldrich», США).

### 2.2. Реагенты

В работе использовали следующие реагенты со степенью чистоты «ХЧ» отечественного производства: хлорид кальция, гидроксид натрия, трихлоруксусная кислота, 3,5-динитросалициловая кислота, перйодат натрия, 0,067 М фосфатный буфер (рН 4,0-9,0).

Растворы всех реагентов готовили на дистиллированной воде.

## 2.3. Методы анализа

### 2.3.1. Определение влажности образца

Содержание влаги определяли гравиметрическим методом, основанном на высушивании образца в бюксе до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105 °С. Содержание сухих веществ (СВ, мас. %) рассчитывали по формуле (2.1):

$$СВ = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100, \quad (2.1)$$

где  $m_0$  – масса пустого бюкса, г;  $m_1$  – масса бюкса с образцом, г;  $m_2$  – масса бюкса с навеской образца после высушивания, г.

### 2.3.2. Определение содержания белковых веществ

Содержание белковых веществ определяли методом Лоури [220], используя казеинат натрия для построения калибровочной кривой. Расчёт содержания белковых веществ Р (мг/л), проводили по формуле (2.2):

$$Р = С \cdot N, \quad (2.2)$$

где С – концентрация белковых веществ, найденная по калибровочному графику, мг/дм<sup>3</sup>, N – разведение анализируемого раствора.

Содержание низкомолекулярных белковых веществ определяли модифицированным методом Лоури предварительным осаждением белков и высокомолекулярных пептидов 50%-ной трихлоруксусной кислотой.

Расчет содержания низкомолекулярных белковых веществ, не осаждаемых 50%-ной ТХУ, РР (мг/дм<sup>3</sup>), проводили по формуле (2.3):

$$РР = 2 \cdot С \cdot N, \quad (2.3)$$

где: С – концентрация белковых веществ, найденная по калибровочному графику, мг/л, N – разведение анализируемого раствора; 2 – разведение за счёт добавления ТХУ.

Для определения белка, иммобилизованного на текстильном носителе, использовали модифицированный метод Лоури (метод Лоури –Гартри). Модификация метода состоит в усилении окраски при восстановлении реактива Фолина, когда белковый раствор инкубируется с более концентрированным медно-тарtratным раствором (реактив Фелинга) при

50°C. Это приводит к линейному соотношению между концентрацией белка и оптической плотностью развивающейся окраски.

Массу иммобилизованного белка (мг) на 1 грамм носителя вычисляли по формуле (2.4):

$$g = \frac{C_0 \cdot \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot m_{p-pa}}{g_w \cdot 0,95} + \frac{C_0 \cdot \frac{A}{A_0}}{g_w \cdot 0,95}, \text{ мг} \quad (2.4)$$

где  $g$  – масса иммобилизованного фермента (мг) на 1г носителя;  $C_0$  – начальная концентрация фермента до иммобилизации, мг/мл;  $A$  – активность ферментного препарата после иммобилизации, Ед/г;  $A_0$  – активность фермента до иммобилизации, Ед/г;  $g_w$  – масса носителя после иммобилизации, мг; 0,95 – коэффициент, отражающий влажность носителя.

### ***2.3.3. Определение протеолитической активности по гидролизу азоколлы***

Принцип определения протеолитической активности по азоколлу состоит в том, что протеиназы расщепляют малорастворимый азоколл до растворимых пептидов, количество которых пропорционально активности фермента и определяется фотометрически при длине волны 440 нм [13].

Ферментативную активность для нативных ферментных препаратов рассчитывали по формуле (2.5):

$$\Phi A = \frac{(D_{оп.} - D_{к.}) \cdot \Sigma V \cdot V_{к.}}{t \cdot g \cdot V_{ф.}}, \text{ Ед/мг} \quad (2.5)$$

где:  $t$  - время инкубации (час);  $g$  – навеска фермента, мг;  $V_{к.}$  - объем колбы (мл), в которой растворяли навеску фермента;  $D_{оп.}$  - оптическая плотность опытной пробы;  $D_{к.}$  - оптическая плотность контрольной пробы;  $\Sigma V = (V_{ф.} + V_{фб.})$  - сумма объемов (мл) растворов фермента и фосфатного буфера.

За единицу ферментативной активности (Ед) принимали прирост оптической плотности раствора азокрасителя, отщепляющегося от азоколлы



за 1 час при температуре 37 °С при длине волны 440 нм, в пересчете на 1 мг препарата.

Для иммобилизованных препаратов ферментативную активность (ФА) рассчитывали по формуле (2.6):

$$\text{ФА} = \frac{(D_{\text{оп.}} - D_{\text{к.}}) \cdot \Sigma V}{t \cdot g}, \text{ Ед/мг} \quad (2.6)$$

где  $t$  - время инкубации (ч);  $V$  – реакционный объем пробы, мл;  $g$  – навеска образца (с учетом влажности), г;  $D_{\text{оп.}}$  - оптическая плотность опытной пробы;  $D_{\text{к.}}$  - оптическая плотность контрольной пробы.

#### ***2.3.4. Определение протеолитической активности препаратов модифицированным методом Ансона***

Метод основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза белка (казеината натрия) по количеству образовавшегося тирозина, которое определяли с помощью колориметрической реакции с реактивом Фолина. В результате реакции образуется комплексное соединение, окрашивающее раствор в голубой цвет. Интенсивность окраски измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны 656 нм [221].

Протеолитическую активность рассчитывали по формуле (2.7):

$$\text{ПА}_{\text{к}} = \frac{A \cdot 4 \cdot 1000}{TЭ \cdot 10a}, \quad (2.7)$$

где  $A$  – оптическая плотность опытного раствора в сравнении с контрольным; 4 – отношение объема реакционной смеси после добавления трихлоруксусной кислоты к объему ферментного раствора;  $TЭ$  – тирозиновый эквивалент; 10 – длительность инкубации реакционной смеси, мин; 1000 – коэффициент перевода мг в г;  $a$  – количество ферментного раствора в опытной пробе, мг.

За единицу протеолитической активности в данном методе принимали количество фермента, которое за 1 минуту при 30°С превращает в не осаждаемые трихлоруксусной кислотой продукты гидролиза казеината натрия, соответствующем 1 мкмоль тирозина.

### **2.3.5. Определение амилолитической активности с применением 3,5-динитросалициловой кислоты**

Метод основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза крахмала по количеству образовавшихся редуцирующих углеводов, которые определяли с помощью колориметрической реакции сахаров с 3,5-динитросалициловой кислотой. Динитросалициловая кислота восстанавливается сахарами в 3-амино-5-нитросалициловую кислоту, которая окрашивает раствор в оранжевый цвет. По интенсивности окраски исследуемого раствора с помощью спектрофотометра определяли количество образовавшейся глюкозы [222].

Амилолитическую (осахаривающую) активность определяли по формуле (2.8):

$$OC = \frac{(0,4174A - 0,0668) \cdot 10^3}{a}, \quad (2.8)$$

где А – оптическая плотность раствора; а – количество ферментного препарата, мг.

Для грибных препаратов 1 усл.ед.= 92,59 мкмоль/мин.

### **2.3.6. Определение липазной активности титриметрическим методом**

Метод основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза 40% – ной эмульсии оливкового масла по количеству образовавшихся жирных органических кислот. Их содержание в растворе определяли титриметрическим методом с применением 0,05 н раствора гидроксида натрия [223].

Активность липазы определяли по формуле (2.9):

$$ЛА = \frac{(V_o - V_k) \cdot 0,014123 \cdot \tau}{a}, \text{ Ед/г} \quad (2.9)$$

где  $V_o$  – объем щелочи, затраченный на титрование опытной пробы, мл;  $V_k$  – объем щелочи, затраченный на титрование контрольной пробы, мл; 0,014123 – титр 0,05 н NaOH по олеиновой кислоте;  $\tau$  – время гидролиза, ч; а – количество исследуемого фермента в среде, г.

За единицу активности липазы принимали такое количество фермента, которое при рН 7,0 и при 37°С в течение 1 часа катализирует гидролиз 40% оливкового масла с образованием 1 мкмоль олеиновой кислоты.

### **2.3.7. Методика ИК-спектроскопии**

Для подготовки образцов для ИК-спектроскопии применяли прессование с бромидом калия, специально предназначенным для спектральных работ. Монокристаллический бромид калия подвергали измельчению, потом помещали в сушильный шкаф при температуре 200°С на 48 часов и высушивали до абсолютно сухого веса. Контроль на чистоту и отсутствие влаги осуществляли спектрографически. Подготовленный бромид калия хранили в бюксе в эксикаторе. Образцы исследуемых образцов, содержащих 1,5 мг исследуемого препарата и 150 мг подготовленного бромида калия, тщательно перемешивали, далее 100 мг смеси помещали в пресс-форму, равномерно распределяя по всему каналу, и ставили под пресс (давление 150 кг/см<sup>2</sup>) на несколько минут. Измерение величин светопропускания образцов белков осуществляли при помощи универсального ИК-спектрофотометра: ИК-Фурье спектрометр с приставкой НПВО и дополнительным оборудованием Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) [224].

### **2.3.8. Определение количества альдегидных групп йодометрическим методом**

Метод основан на определении количества альдегидных групп, образовавшихся на модифицированной целлюлозной матрице, с помощью окисления носителя йодом в слабощелочных условиях [226].

Количество альдегидных групп рассчитывали по формуле (2.10):

$$\mathcal{E}_k = \frac{\Delta V \cdot N_{\text{ТС}}}{g}, \text{ мг/}\mathcal{E}_{\text{КВ}} \quad (2.10)$$

где:  $\Delta V$  - разница объемов тиосульфата между контрольной и опытной пробой, мл;  $N_{\text{ТС}}$  - нормальность тиосульфата;  $g$  - навеска носителя с учетом влажности, г.

В качестве контроля использовали образцы неокисленной целлюлозы той же массы, что и опытные.

## **2.4. Методы эксперимента**

### ***2.4.1. Методика получения диальдегидцеллюлозы (ДАЦ)***

Для получения ДАЦ со степенью окисления 2% (т.е. на 100 звеньев целлюлозы окислено 2 звена с образованием двух альдегидных групп) 100 г целлюлозного материала помещали в 1000 г раствора периодата натрия заданной концентрации. Реакцию проводили в темноте, так как под действием света наблюдается образование озона из водных растворов периодата. Через 25-30 минут материал пропускали через резиновые вальцы и оставляли при комнатной температуре на 18-20 часов, в темном и защищенном от попадания воздуха месте. Затем материал отмывали от продуктов реакции дистиллированной водой и высушивали на воздухе [162,167,225].

### ***2.4.2. Методика иммобилизации гидролаз на текстильный носитель***

Иммобилизацию гидролитических ферментов проводили на подготовленные целлюлозные носители (целлюлоза или ДАЦ). Навеску носителя определенной массы (0,05-0,1 г) помещали в раствор нативного фермента заданной концентрации (2 мг/мл), имеющего заданное значение рН. Соотношение массы пропиточного раствора и массы носителя составляло 10:1. По истечении времени иммобилизации (2 часа) носитель отжимали от избытка пропиточного раствора путем пропускания через резиновые вальцы. При этом отношение массы реакционного раствора к массе носителя составляло 2:1, затем материал помещали в темное место при температуре  $+5 \div +10^{\circ}\text{C}$ . Через 18-20 часов полученный препарат высушивали на воздухе. Далее в данных образцах определяли содержание белка по методу Лоури и остаточную ферментативную активность. Необходимо отметить, что остаточную активность определяли в мокрых образцах после удаления избыточной влаги и сразу после высушивания.

Получение хитозансодержащей (или альгинатсодержащей) целлюлозы

проводили путем выдерживания целлюлозной матрицы в 0,5%-ом геле хитозана (рН 3,0) или 0,5%-ом геле альгината натрия (рН 7,0) в течение 1 часа. Полученный носитель отжимали от избыточного содержания геля и высушивали на воздухе. Далее проводили иммобилизацию ферментов на полученную модифицированную полисахаридами целлюлозу аналогично вышеописанному способу.

Высушенные иммобилизованные препараты с остаточной влажностью не более 6% хранили в полиэтиленовых пакетах в защищенном от света месте [162,227].

#### ***2.4.3. Методика иммобилизации гидролаз микрокапсулированием***

В данной работе в качестве полимеров для создания микрочастиц использовали альгинат натрия и хитозан. «Пустые» микрочастицы без фермента формировали в 0,063% водном растворе альгината натрия. Для получения микрочастиц в раствор альгината натрия при непрерывном перемешивании (800 об/мин) с помощью перистальтического насоса с постоянной скоростью (0,12 мл/мин) добавляли 18мМ раствор хлорида кальция. Затем в полученный раствор со скоростью 0,2 мл/мин добавляли 0,075% раствор хитозана. После добавления всех компонентов раствор перемешивали на магнитной мешалке (800 об/мин) в течение 30 минут и далее центрифугировали в течение 15 минут при скорости 10 тыс. оборотов в минуту [228,229].

Процесс образования микрочастиц с ферментом аналогичен вышеописанной процедуре за исключением приготовления раствора альгината натрия, в который предварительно добавляют гидролитический фермент, в количестве необходимом для получения в конечном растворе концентрации 2 мг/мл. После центрифугирования надосадочную жидкость анализировали на наличие в ней остаточного количества фермента методом Лоури.

Размер полученных микрочастиц определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL 1610LV с

энергодисперсионным спектрометром для электронно-зондового микроанализа SSD X-Max Inca Energy (JEOL, Япония; Oxford Instruments, Великобритания).

#### **2.4.4. Методика инактивации гидролаз**

При проведении эксперимента готовили серию пробирок с притертыми пробками с 1 мл раствора фермента (1 мг/мл) или навеской иммобилизованного текстильного образца массой 0,05-0,15 г. В эксперименте с иммобилизованными микрочастицами в пробирки помещали по 1 мл раствора препарата.

Для изучения *термоинактивации* в случае текстильных образцов в пробирки добавляли раствор фосфатного буфера (2,5 мл для протеаз и 1 мл для амилазы и липазы) оптимального значения pH (pH 8,0 для препаратов протеаз и липазы и pH 5,0 для препаратов амилазы). Далее подготовленные пробирки помещали в прогретый до необходимой температуры водный термостат (37-65°C с точностью термостатирования  $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Для изучения *pH-инактивации* в случае текстильных образцов в пробирки добавляли раствор фосфатного буфера (2,5 мл для протеаз и 1 мл для амилазы и липазы) необходимого значения pH (от 4,0 до 9,0 в зависимости от эксперимента). Далее подготовленные пробирки помещали в прогретый до необходимой температуры водный термостат (37°C для препаратов протеаз и липазы и 55°C для препаратов грибной амилазы, с точностью термостатирования  $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Через определенные промежутки времени пробирки охлаждали при комнатной температуре и определяли в них остаточную ферментативную активность. За 100% принимали значение ферментативной активности до проведения инактивации фермента.

#### **2.4.5. Методика проведения гидролиза отходов мясоперерабатывающей промышленности**

*Подготовка субстрата.* Твердый жиросодержащий отход измельчали механическим способом до частиц диаметром  $\sim 0,5 \text{ см}^2$  нагревали до

температуры  $100 \pm 15^\circ\text{C}$  до получения однородной эмульсии. Далее, для достижения более высокой гомогенности субстрата, полученную эмульсию подвергали ультразвуковой дезинтеграции в лабораторной ультразвуковой ванне с частотой 22 кГц при комнатной температуре в течение 15 минут [230].

*Проведение гидролиза.* Для проведения гидролиза готовили водный раствор нативной (или иммобилизованной) липазы с концентрацией 2 мг/мл. Эмульсию жиросодержащего субстрата добавляли в фосфатный буферный раствор (pH 7,0) в объемном соотношении 5:4. Температуру в термостате поддерживали на уровне  $37^\circ\text{C}$ . Ферментный препарат (в количестве 0,1-0,5% от массы субстрата) добавляли в эмульсию субстрата (концентрацию субстрата варьировали в диапазоне 10-60%) перед началом гидролиза. Ферментативный гидролиз проводили в течение 2 часов с отбором проб по 5 мл через каждые 15 минут после начала гидролиза. Затем определяли максимальную степень гидролиза для нативной и иммобилизованной липазы.

#### ***2.4.6. Методика проведения гидролиза ячменного солода***

*Подготовка субстрата.* Для получения 15%-ого раствора крахмала ячменный солод (содержание крахмала 81%) массой 18,5 г помещали в колбу объемом 100 мл, добавляли 25 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивали и помещали на водяную баню. Суспензию непрерывно перемешивали до полного растворения крахмала. Полученный раствор охлаждали и добавляли 10 мл фосфатного буфера pH 7,0. Объем в колбе доводили до метки 100 мл дистиллированной водой [231].

*Проведение гидролиза.* Для проведения гидролиза готовили раствор нативной (или иммобилизованной) амилазы 2 мг/мл в фосфатном буфере (pH 5,0). Раствор нагревали в термостате до требуемой температуры. Ферментный препарат (в количестве 1-15% от массы субстрата) добавляли в нагретый раствор субстрата (концентрацию субстрата варьировали в диапазоне 0,5-15%) перед началом гидролиза. Ферментативный гидролиз проводили в течение 8 часов с отбором проб по 1 мл через каждые 20 минут

после начала гидролиза. Затем определяли максимальную степень гидролиза для нативной и иммобилизованной амилазы.



### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось в главе «Литературный обзор», среди широкого спектра ферментных препаратов наибольшее практическое значение имеют гидролитические. В связи с этим, представляется актуальным исследовать важнейшие физико-химические свойства наиболее важных препаратов промышленных гидролаз и разработать пути повышения их эффективности. В качестве объектов исследования были выбраны: протеазы (трипсин КРС ( $3,22 \pm 0,02$  Ед/мг по казеину), протеолитический комплекс из гепатопанкреаса камчатского краба ( $0,016 \pm 0,004$  Ед/мг по азоколлу)), амилаза из гриба *Aspergillus oryzae* ( $25,05 \pm 1,15$  Ед/мг по крахмалу), панкреатическая липаза ( $7,76 \pm 0,11$  Ед/мг по оливковому маслу). В качестве модельных субстратов использовали соответственно: казеин, азоколл, крахмал, оливковое масло.

#### **3.1. Исследование физико-химических характеристик нативных гидролаз**

Вопрос о скоростях ферментативной реакции имеет первостепенное значение при исследовании характеристики любых групп ферментов. Для оценки скорости ферментативной реакции обычно определяют два параметра уравнения Михаэлиса-Ментен (максимальную скорость  $V_{\max}$  и константу Михаэлиса  $K_m$ ). Значение константы Михаэлиса используется для определения концентрации субстрата, необходимой для достижения максимальной скорости реакции, и для сравнения каталитической активности ферментов одного класса. Также константа Михаэлиса служит мерой сродства фермента к субстрату: чем больше скорость образования фермент-субстратного комплекса, тем меньше  $K_m$ .

Для определения кинетических параметров ферментативных реакций, катализируемых вышеперечисленными ферментами, были проведены эксперименты по влиянию на скорость ферментативной реакции температуры и рН среды.

Для графического нахождения значений константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции были построены зависимости в двойных

обратных координатах Лайнуивера-Берка при различных значениях температуры (рис. 3.1).

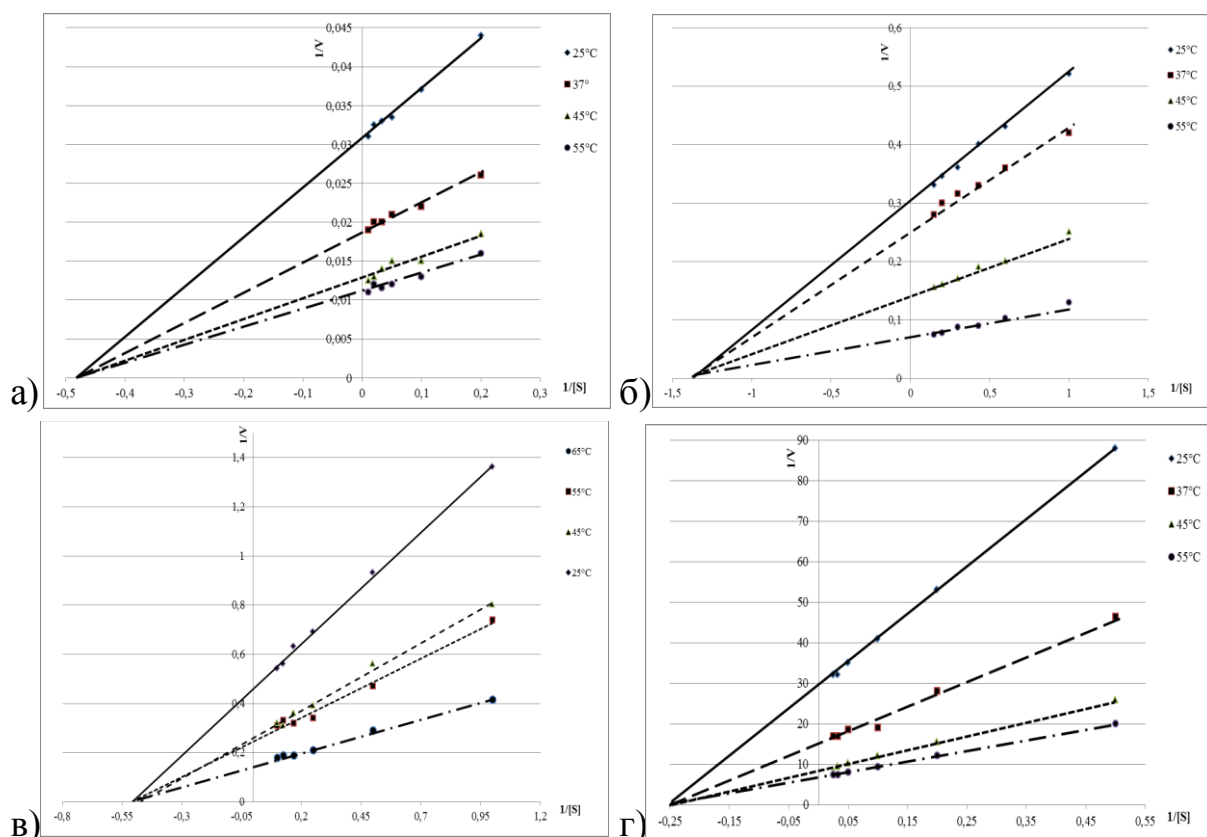


Рисунок 3.1 - Зависимости в координатах Лайнуивера-Берка для нативных гидролаз: а) трипсина; б) протеолитического комплекса; в) амилазы; г) липазы

Значения  $K_m$  и  $V_{max}$ , полученные в результате обработки экспериментальных данных, приведены в таблице 3.1.

Согласно литературным данным чаще всего низкая эффективность ферментативной реакции обусловлена небольшой удельной активностью ферментных препаратов, инактивацией под действием различных факторов, недостаточной стабильностью при неоптимальных значениях рН и температуры, а также значительным снижением ферментативной активности при хранении ферментного препарата.

Известно, что конформационные изменения молекулы фермента, приводящие к снижению или повышению его активности, в основном определяются двумя параметрами: температурой и рН среды.

Таблица 3.1 – Значения параметров уравнения Михаэлиса-Ментен нативных форм гидролаз при различных температурах

Ферментный препарат	Значения $V_{\max}$ ( $\cdot 10^3$ ) (моль/дм <sup>3</sup> ·с) при температурах, °С			
	25	37	45	55
Трипсин	0,54±0,03	0,94±0,05	1,33±0,07	1,48±0,07
	$K_m = 2,12 \pm 0,11$ г/дм <sup>3</sup>			
Протеолитический комплекс	0,06±0,01	0,07±0,01	0,12±0,01	0,24±0,01
	$K_m = 0,76 \pm 0,04$ г/дм <sup>3</sup>			
Липаза	0,03±0,01	0,07±0,01	0,11±0,01	0,13±0,01
	$K_m = 4,00 \pm 0,20$ г/дм <sup>3</sup>			
Фермент	Значения $V_{\max}$ ( $\cdot 10^3$ ) (моль/дм <sup>3</sup> ·с) при температурах, °С			
	25	45	55	65
Амилаза	34,08±1,71	57,42±2,87	65,33±3,27	77,50±3,88
	$K_m = 1,78 \pm 0,09$ г/дм <sup>3</sup>			

Для каждого фермента установлены определенные значения температуры и рН, при которых их активность максимальна. При отклонении температуры и рН ферментативного процесса от оптимального значения могут происходить значительные изменения в некоторых участках структуры белковой молекулы, которые в большинстве случаев ведут к снижению или полной потере функциональной активности, т.е. денатурации фермента [36,46,53,232]. При денатурации структура фермента обычно существенно изменяется: происходит разворачивание белковой глобулы [4,10,53]. Способность фермента сохранять активность в расширенном диапазоне значений температур и рН среды называется операционной стабильностью.

Для того чтобы оценить операционную стабильность ферментов при изменении температуры и рН среды необходимо прежде всего определить их температурный и рН оптимум.

Температурный оптимум для каждого фермента определяли путём определения ферментативной активности в интервале температур 25°С-75°С при оптимальном значении рН среды (рисунок 3.2). При обработке экспериментальных данных определяли относительную активность как

отношение ферментативной активности при данной температуре ( $A$ ) к активности при оптимальной ( $A_{max}$ ).

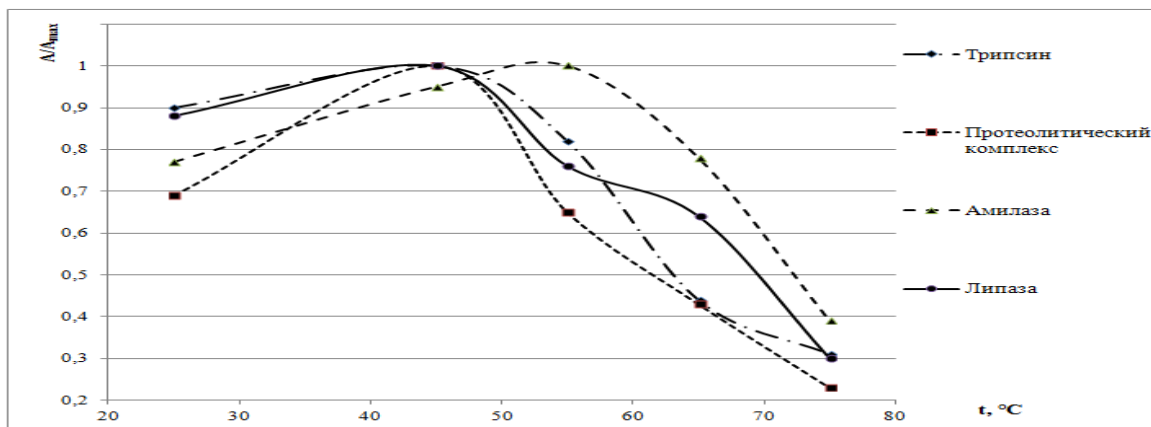


Рисунок 3.2 - Влияние температуры на относительную активность нативных гидролаз: концентрация ферментных препаратов в растворе – 1 мг/мл, рН для растворов трипсина, ПК и липазы - 8,0, амилазы – 5,0.

Из полученных данных видно, температурный оптимум для трипсина, ПК и липазы составляет 37 $^\circ C$ , для грибной амилазы – 45 $^\circ C$ . Из представленных данных можно видеть, что операционная стабильность нативных ферментов при высоких температурах (65-75 $^\circ C$ ) значительно снижается. Так, при 75 $^\circ C$  для всех нативных гидролаз наблюдается снижение остаточной активности до 20-38%.

Влияние рН среды на активность ферментов исследовали в диапазоне значений от 4,0 до 9,0. На рис. 3.3 приведены результаты исследования зависимости относительной активности нативных гидролаз от рН среды.

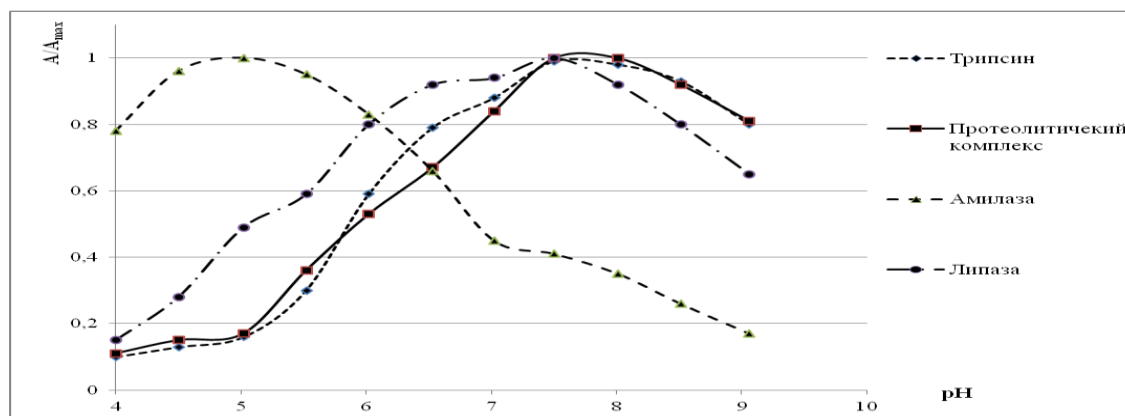


Рисунок 3.3 - Влияние рН на остаточную ферментативную активность нативных гидролаз: концентрация ферментных препаратов в растворе – 1 мг/мл, температура для растворов трипсина, ПК и липазы – 37 $^\circ C$ , для амилазы - 45 $^\circ C$

Из полученных результатов следует, что рН оптимумы исследуемых гидролаз совпадают с литературными данными и составляют: для протеаз рН 7,8, для липазы рН 8,0, для грибной амилазы рН 5,0. По рисунку 3.3 видно, что для протеаз и липазы операционная стабильность в кислой области значений рН значительно снижается (остаточная активность при рН 4-5 составляет 10-17%).

Для определения функциональной стабильности (способность сохранять активность в условиях, способствующих денатурации белка) нативных гидролаз готовили их растворы (2 мг/мл для протеаз, 1 мг/мл для амилазы и липазы) в 0,067 М фосфатном буфере при оптимальном значении рН среды и выдерживали в течение 72 часов при заданной температуре (25-65°C – расширенный диапазон рабочих температур).

Через определенные интервалы времени отбирали пробы растворов, охлаждали до комнатной температуры и определяли в них остаточную ферментативную активность (A). За 100% принимали значение ферментативной активности ( $A_0$ ) в начальный момент времени до проведения термической инактивации. Полученные данные представлены на рисунке 3.4.

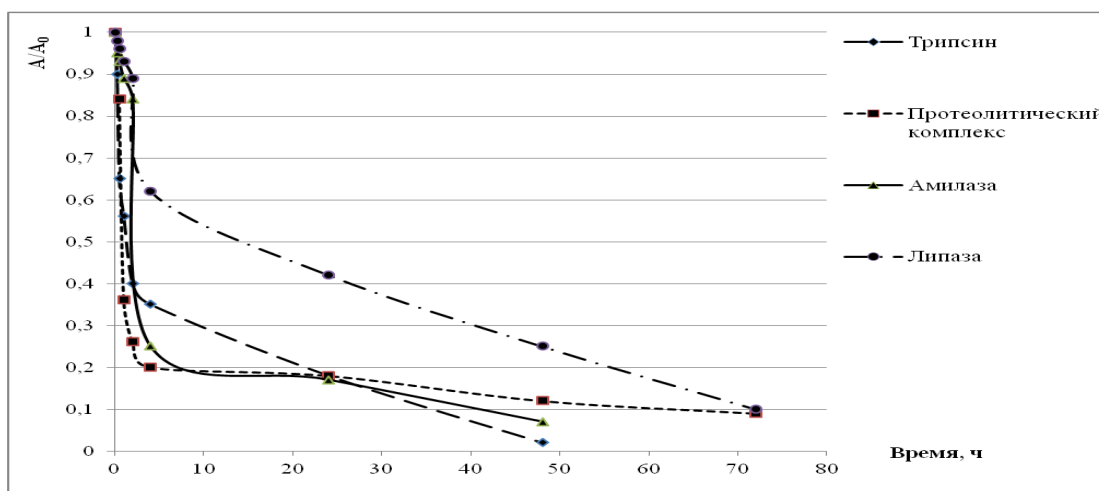


Рисунок 3.4 – Динамика изменения ферментативной активности нативных гидролаз при 37°C и оптимальном значении рН (для протеаз и липазы рН 8,0; для амилазы рН 5,0) при термоинактивации

Из представленных данных следует, что с повышением температуры происходит снижение ферментативной активности до значений 3-20% от

исходной, что объясняется денатурацией белковых молекул. Мерой, характеризующей степень денатурации, стабильности или изменения структуры молекулы фермента, является константа скорости инактивации.

Константу скорости инактивации  $k_{ин}$  определяли по тангенсу угла наклона линейной зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах ( $\ln(A_t/A_0)$ -t). Соответствующие зависимости представлены на рис. 3.5.

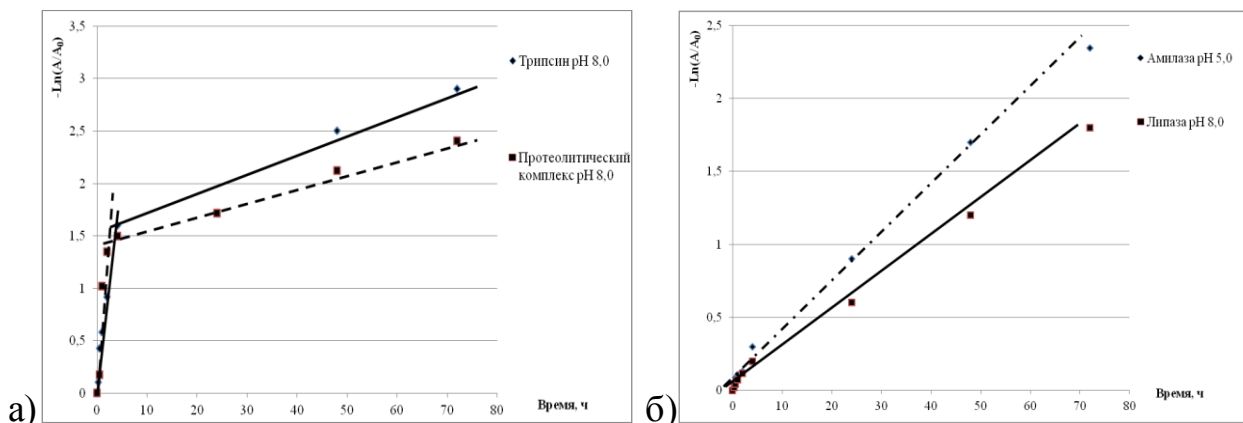


Рисунок 3.5 - Кинетика изменения ферментативной активности в процессе термоинактивации при 37°C нативных форм гидролаз: а) протеаз; б) амилазы и липазы

Как следует из рис. 3.5 (а), кинетика термоинактивации протеолитических ферментов описывается сложным экспоненциальным уравнением (1) [36,53]:

$$(A_t/A_0 = a_1 \cdot e^{-k_1 \tau} + a_2 \cdot e^{-k_2 \tau}) \quad (3.1)$$

В соответствии с уравнением (3.1) зависимость  $\ln(A_t/A_0) = f(\tau)$  в полулогарифмических координатах имеет вид ломаных линий, каждая из которых описывается уравнением первого порядка. Двухфазная кинетика может объясняться механизмом инактивации протеаз, заключающимся в существовании двух форм белка, которые различаются между собой активностью и стабильностью к воздействию денатурирующих факторов. Из рисунка 3.5 (б) видно, что зависимость константы термоинактивации грибной амилазы и липазы имеет линейный вид, что соответствует уравнению первого порядка ( $A_t/A_0 = a_1 \cdot e^{-k_1 \tau}$ ).

Полученные значения констант скоростей термоинактивации нативных форм гидролаз приведены в табл.3.2.

Таблица 3.2 – Значения эффективных констант скоростей термоинактивации нативных форм гидролаз при различных температурах

Ферментный препарат	Значения константы инактивации $k_{ин}$ ( $\cdot 10^{-3}$ )( $c^{-1}$ ) при различных температурах, °С				
	25	37	45	55	65
Протеолитический комплекс	0,03±0,01	1,30±0,07 0,24±0,02	1,56±0,08 0,26±0,01	17,28±0,86	22,80±1,14
Трипсин	0,04±0,01	0,76±0,04 0,11±0,01	0,87±0,04 0,15±0,01	1,16±0,06 0,19±0,01	8,33±0,42
Липаза	0,06±0,01	0,19±0,01	0,22±0,01	0,27±0,01	0,47±0,02
Амилаза	0,06±0,01	0,11±0,01	0,14±0,01	0,19±0,01	0,27±0,01

Аналогично исследованию влияния температуры на инактивацию гидролаз были проведены эксперименты по определению константы инактивации ферментов при различных значениях рН среды. Соответствующие эксперименты были выполнены при оптимальных значениях температуры для каждого фермента при времени гидролиза 4 часа. За  $A_0$  принимали значение активности фермента при оптимальном значении рН.

Данные по исследованию рН-инактивации нативных гидролаз представлены на рисунке 3.6.

Константу скорости инактивации фермента  $k_{ин}$  при различных значениях рН среды определяли аналогично описанному выше. Полученные зависимости представлены на рисунке 3.7, а рассчитанные значения констант скоростей инактивации нативных форм гидролаз в зависимости от рН среды приведены в таблице 3.3.

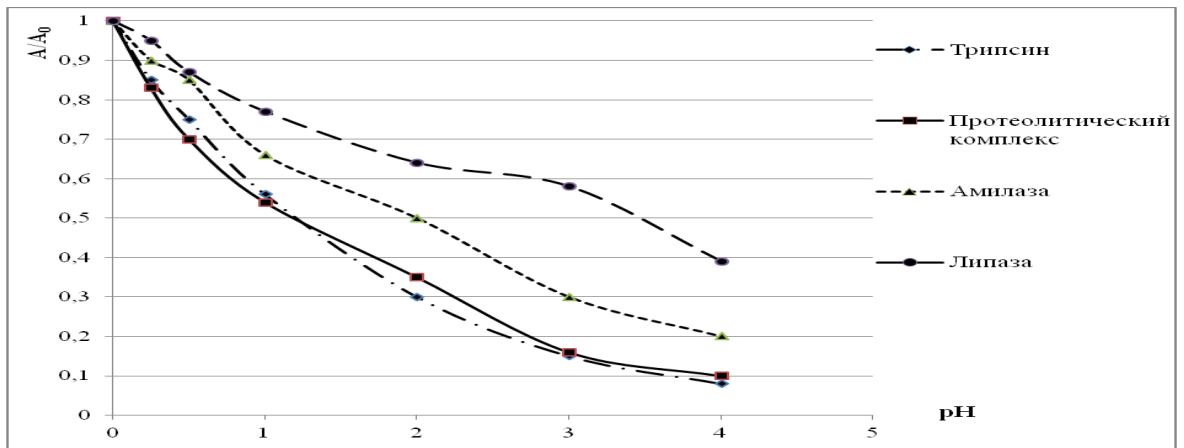


Рисунок 3.6 – Динамика изменения ферментативной активности нативных гидролаз при различных значениях рН-среды при оптимальной температуре (для протеаз и липазы - 37°C, для амилазы – 45°C)

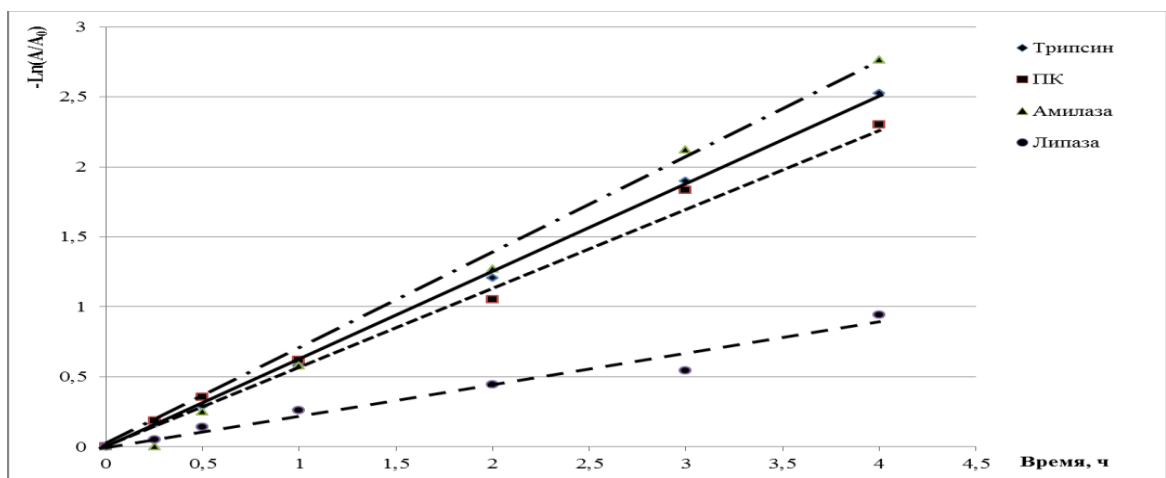


Рисунок 3.7 - Кинетика изменения ферментативной активности в процессе рН-инактивации при оптимальной температуре (для протеаз и липазы - 37°C, для амилазы – 45°C) и рН (8,0 - для протеаз и липазы, 5,0 – для амилазы) нативных форм гидролаз

Таблица 3.3 – Значения эффективных констант скорости рН-инактивации нативных форм гидролаз

Ферментный препарат	Значения константы инактивации $k_{ин}$ ( $\cdot 10^{-3}$ ) ( $c^{-1}$ ) при различных значениях рН			
	5,0	7,0	8,0	8,5
Протеолитический комплекс	2,03±0,10	2,68±0,13	1,12±0,06	2,29 ±0,11
Трипсин	3,00 ±0,15	2,53±0,13	0,78±0,04	2,22±0,11
Липаза	0,49 ±0,07	1,34±0,07	0,79±0,04	1,81 ±0,09
Амилаза	0,59 ±0,03	2,28±0,11	2,86±0,14	3,18±0,16

Функциональная стабильность фермента при различных температурах характеризуется его реакционной способностью, которую можно оценить путем сопоставления значений энергий активации, определяемых по уравнению Аррениуса.



Значения  $V_{max}$  и констант термоинактивации  $k_{ин}$  были использованы для нахождения параметров уравнений Аррениуса (3.2).

$$V_{max} = A_0 \cdot e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)}, \quad (3.2),$$

где  $A_0$  – предэкспоненциальный множитель,  $E_a$  – энергия активации,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура.

На рисунке 3.8 представлены зависимости натурального логарифма максимальной скорости реакции и константы инактивации нативных гидролаз от обратной величины абсолютной температуры.

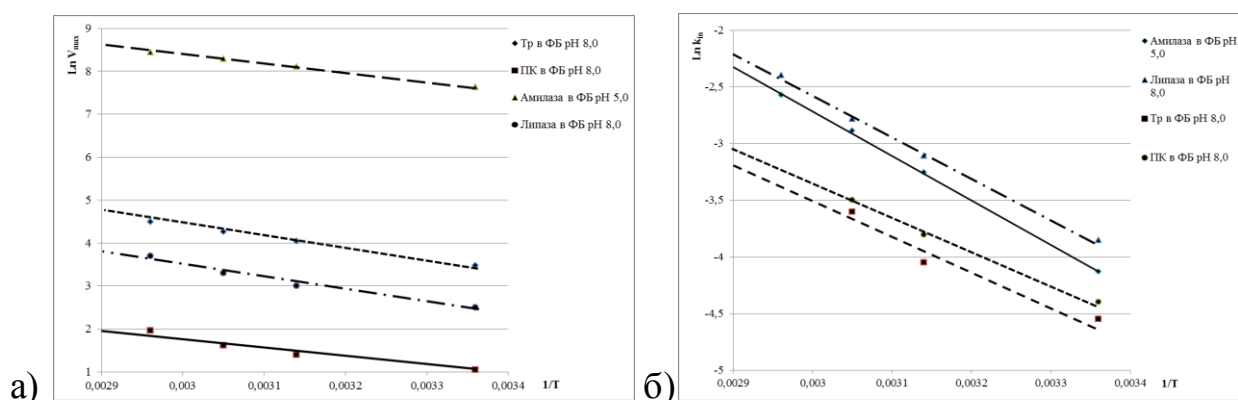


Рисунок 3.8 – Зависимость натурального логарифма максимальной скорости реакции и константы инактивации от обратной величины абсолютной температуры для нативных форм гидролаз: а)  $V_{max}$ ; б)  $k_{ин}$

Из рисунка 3.8 следует, что зависимости  $\ln k_{ин}$  и  $\ln V_{max}$  от  $1/T$  линейны в области 25-65°C. В результате обработки экспериментальных данных в координатах  $\ln(V_{max}) = f(1/T)$  были определены значения энергии активации и предэкспоненциального множителя (табл. 3.4).

Таблица 3.4 - Значения энергии активации и предэкспоненциального множителя уравнения Аррениуса для нативных гидролаз в оптимальных условиях

Ферментный препарат	$V_{max}$		$k_{ин}$	
	$E_a$ , кДж/моль	$A_0$ , ( $\cdot 10^3$ ), моль/(дм <sup>3</sup> ·с)	$E_a$ , кДж/моль	$A_0$ , ( $\cdot 10^3$ ), моль/(дм <sup>3</sup> ·с)
Трипсин	34,20±1,71	0,06±0,01	41,50±2,07	0,03±0,01
Протеолитический комплекс	26,57±1,33	0,04±0,01	38,55±1,93	0,03±0,01
Амилаза	17,16±1,38	0,04±0,01	42,82±2,14	0,09±0,01
Липаза	33,67±1,68	0,05±0,01	40,65±2,03	0,04±0,01

Для определения зависимости максимальной скорости и константы инактивации от pH среды было использовано уравнение кислотно-основного катализа (3.3):

$$V_{max} = \frac{k_0}{1 + K_a \cdot [H^+]}, \quad (3.3),$$

где  $k_0$  – константа скорости, не зависящая от рН среды,  $K_a$  – константа равновесия образования протонированного комплекса фермента с ионами водорода.

Для определения параметров уравнения (3) были построены зависимости в координатах  $1/V_{max} = f([H^+])$  и  $1/k_{ин} = f([H^+])$  (рис. 3.9). Рассчитанные значения параметров  $k_0$  и  $K_a$  приведены в таблице 3.5.

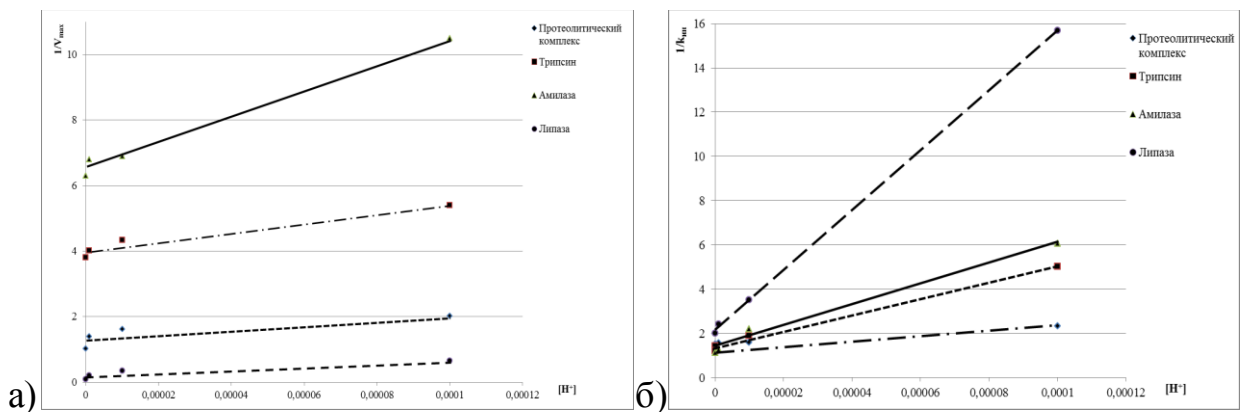


Рисунок 3.9 - Зависимость обратных величин максимальной скорости и константы инактивации от концентрации ионов водорода для нативных форм гидролаз: а)  $V_{max}$ ; б)  $k_{ин}$

Таблица 3.5 - Значения параметров  $K_a$  и  $k_0$  для нативных гидролаз уравнения кислотно-основного катализа

Фермент	$V_{max}$		$k_{ин}$	
	$K_a, (\cdot 10^{-3}),$ дм <sup>3</sup> /моль	$k_0, (\cdot 10^3),$ моль/(дм <sup>3</sup> ·с)	$K_a, (\cdot 10^{-3}),$ дм <sup>3</sup> /моль	$k_0, (\cdot 10^3),$ моль/(дм <sup>3</sup> ·с)
Трипсин	22,45±1,12	0,58±0,03	31,78±1,59	0,02±0,01
Протеолитический комплекс	32,15±1,61	0,06±0,01	26,78±1,34	0,02±0,01
Амилаза	12,15±1,18	110,51±5,50	43,65±4,12	0,03±0,01
Липаза	39,22±1,96	0,02±0,01	75,12±3,76	0,02±0,01

Для оценки конформационной стабильности ферментов (способности сохранять конформацию молекулы при воздействии внешних факторов неизменной) [233] были рассчитаны термодинамические характеристики процесса их термоинактивации: свободная энергия Гиббса  $\Delta G_i$ , энтальпия  $\Delta H_i$  и энтропия  $\Delta S_i$  (таблица 3.6).

Изменение свободной энергии (энергии Гиббса  $\Delta G_i$ ) нативного фермента определяли по уравнению (3.4):

$$\Delta G_i = -RT \ln \left( \frac{k_{in} h}{k_B T} \right) \quad (3.4),$$

где  $k_{in}$  – константа скорости инактивации фермента;  $k_B$  – константа Больцмана;  $h$  – постоянная Планка;  $T$  – абсолютная температура;  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Изменение величины  $\Delta H^*$  в процессе термоинактивации определяли по тангенсу угла наклона зависимости константы скорости инактивации от температуры в координатах  $(\ln(k_{in}/T) - 1/T)$ , представленной на рисунке 3.10.

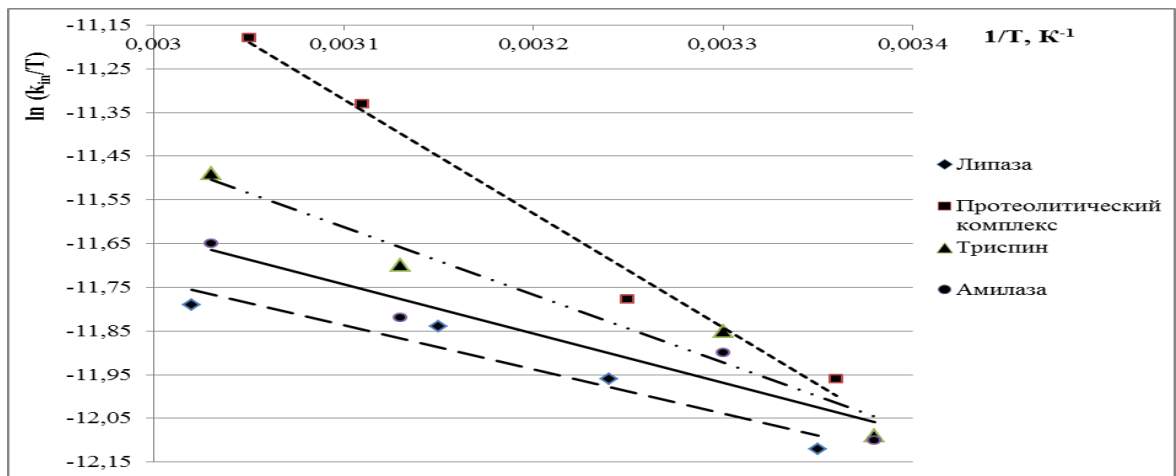


Рисунок 3.10 - Зависимость константы скорости инактивации нативных гидролаз от температуры в координатах  $(\ln(k_{in}/T) - 1/T)$

Данная зависимость имеет линейный вид и описывается уравнением теории активированного комплекса (3.5), выражение которого в линейном виде следующее [233]:

$$\ln \left( \frac{k_{in}}{T} \right) = \text{const} - \frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.5),$$

$$\text{где const} = \ln \left( \frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S_i}{R},$$

$k_B$  и  $h$  – константы Больцмана и Планка соответственно.

Значения изменения энтропии  $\Delta S_i$  были рассчитаны по уравнению (3.6):

$$\Delta G_i = \Delta H_i - T \Delta S_i \quad (3.6)$$

Таблица 3.6–Значения термодинамических характеристик нативных гидролаз

Ферментный препарат	$\Delta G_i$ , кДж/моль	$\Delta H_i$ , кДж/моль	$\Delta S_i$ , Дж/К·моль
Трипсин	116,4±5,8	15,6±0,8	-(325,3±16,3)

Протеолитический комплекс	121,3±6,1	17,2±0,9	-(335,9±16,8)
Амилаза	101,2±7,1	13,3±0,7	-(276,4±13,8)
Липаза	117,9±5,9	9,9±0,5	-(348,4±17,4)

Еще одной важной характеристикой, отражающей эффективность действия фермента, является стабильность при хранении, то есть способность сохранять ферментативную активность во времени [234]. Для её оценки было исследовано влияние времени хранения на изменение ферментативной активности растворов нативных гидролаз в фосфатном буфере с оптимальным для каждого фермента значением pH (для трипсина, ПК, липазы pH 8,0; для амилазы - 5,0) и оптимальной температуре (для трипсина, ПК, липазы - 37°C; для амилазы - 45°C). Полученные результаты приведены на рисунке 3.11. В расчётах за 100% принимали активность свежеприготовленного раствора фермента.

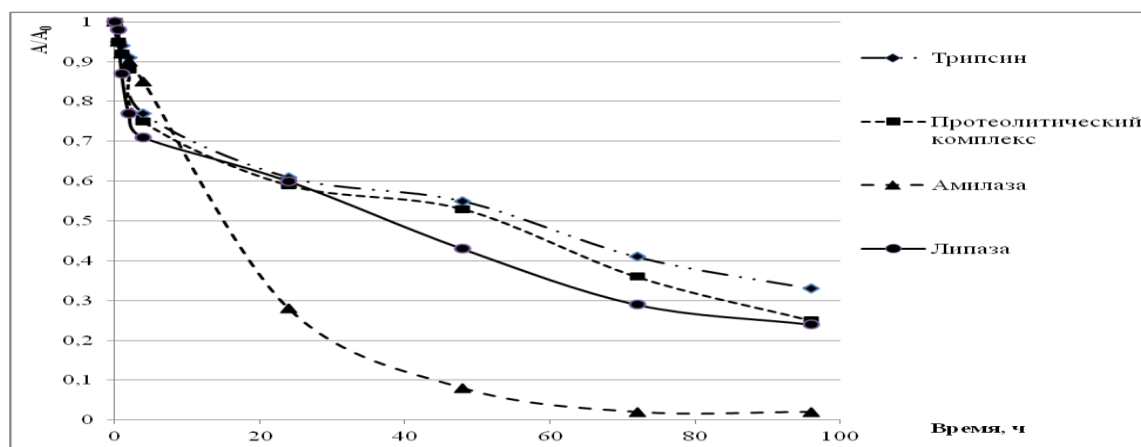


Рисунок 3.11 – Динамика изменения ферментативной активности нативных гидролаз в процессе хранения при оптимальных значениях pH (для трипсина, ПК, липазы pH 8,0; для амилазы pH 5,0) и температуры (для трипсина, ПК, липазы 37°C; для амилазы 45°C)

Из рисунка 3.11 видно, что при хранении в течение 96 часов остаточная активность для всех исследованных протеаз и липазы находится в пределах 22-33%, а для грибной амилазы эта величина составляет менее 5%. Столь значительное снижение активности исследуемых ферментов может быть обусловлено неустойчивостью конформации белка и разрывом внутримолекулярных связей.

На основе проведенных исследований можно сделать вывод о том, что ферментные препараты на основе нативных гидролаз обладают низкой стабильностью, легко инактивируются под действием экстремальных значений температуры и рН среды, а также быстро теряют активность при хранении. Все эти факторы ограничивают возможности применения ферментных препаратов в промышленности. Поэтому актуальной является задача создания модифицированных форм ферментных препаратов, лишенных вышеуказанных недостатков. Одним из наиболее простых и эффективных способов модификации ферментов является их иммобилизация на природные и синтетические носители.

### **3.2. Получение иммобилизованных форм гидролаз**

Согласно литературным данным иммобилизация обеспечивает наибольшую устойчивость фермента и повышает его стабильность. Данный процесс позволяет стабилизировать молекулу ферментов как за счет химической модификации (химическое взаимодействие с различными природными полимерами – т.е. ковалентная иммобилизация), так и физического ограничения подвижности молекулы фермента за счет его механического захвата в полимерную оболочку (физический способ иммобилизации) [113-119].

При выборе носителей для иммобилизации гидролаз оценили эффективность использования для этой цели распространенной группы природных полимеров полисахаридной природы: целлюлозы, хитозана и альгината натрия.

Вышеперечисленные полимеры отличаются гидрофильностью и являются полифункциональными соединениями, способными взаимодействовать с белками. Целлюлоза обладает механической прочностью, а хитозан и альгинат натрия образуют достаточно плотные гели. Кроме того, хитозан и альгинат натрия обладают рядом ценных биологических свойств, таких как биосовместимость, биodeградируемость, гемостатическое действие, противоопухолевая и противовоспалительная

активность, что делает возможным использование как непосредственно данных полимеров, так и иммобилизованных на них ферментов в медицине и фармацевтике.

Также в качестве носителя для иммобилизации использовали модифицированную целлюлозу – диальдегидцеллюлозу (ДАЦ), которую получали с помощью окисления целлюлозы периодатом натрия. Выбор данного носителя был обусловлен тем, что согласно литературным источникам [12,159,160] целлюлозные носители на основе ДАЦ обладают способностью сохранять санитарно-гигиенические характеристики немодифицированной целлюлозы и взаимодействовать с аминокеттогруппами ферментов в оптимальных условиях. Однако ДАЦ по сравнению с целлюлозой менее устойчива к высоким температурам, кислой среде, что может привести к деструкции препаратов на основе ДАЦ. В данной работе получали ДАЦ со степенью окисленности 2% (т.е. на 100 целлюлозных звеньев окислено 2 звена с образованием двух альдегидных групп). Известно, что с повышением степени окисленности ДАЦ механическая прочность и стойкость данного носителя снижаются, кроме того, реакционная способность ДАЦ с невысокими степенями окисленности (2-5%) выше, чем для носителя со степенью окисленности 20-25% [13,159], поэтому в настоящей работе получали ДАЦ со степенью окисленности не более 2%.

Перед проведением процесса иммобилизации актуальным явилось оценить стабильность при хранении исследуемых ферментов в присутствии выбранных в качестве композиционного материала полисахаридов: альгината натрия и хитозана. Для этого смешивали 0,5%-ные водные растворы вышеуказанных полисахаридов с водным раствором соответствующего ферментного препарата заданной активности и значением рН среды. Эксперимент проводили аналогично описанному выше для нативных гидролаз.

На рисунке 3.12 показано относительное изменение ферментативной активности гидролаз в среде полисахаридов при оптимальных значениях рН и температуры в зависимости от времени.

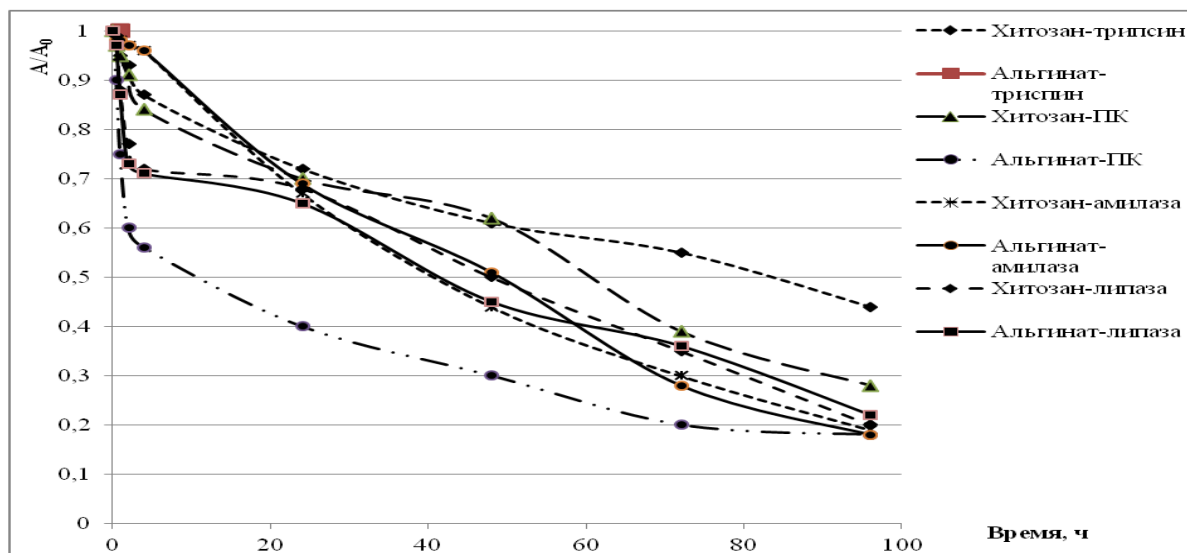


Рисунок 3.12 – Динамика изменения ферментативной активности нативных гидролаз в среде полисахаридов в процессе хранения при оптимальных значениях рН и температуры

По данным рисунка 3.12 видно, что стабильность при хранении гидролитических ферментов в среде полисахаридов возрастает по сравнению с нативными (рис. 3.11). Степень сохранения активности ферментов в среде полисахаридов (хитозана или альгината натрия) в сравнении с нативными гидролазами возрастает наиболее значительно в случае трипсина (с 33% до 42%) и амилазы (с 2% до 19%) в среде хитозана, для протеолитического комплекса и липазы в этой среде увеличение стабильности незначительно (соответственно, с 25% до 28% и с 22% до 24%). Следует отметить, что повышения стабильности при хранении ПК в среде альгината натрия не наблюдалось, что делает нецелесообразным использование альгината натрия для иммобилизации данного ферментного комплекса. Во всех остальных случаях эксперименты подтверждают целесообразность использования хитозана и альгината натрия в качестве композиционного материала при иммобилизации ферментов.

На рисунке 3.13 представлен график в полупологарифмических координатах, отражающий изменение ферментативной активности гидролаз в среде полисахаридов в процессе хранения в оптимальных для каждого фермента условиях. На основе полученных зависимостей вышеописанным способом были определены значения констант инактивации, которые представлены в табл. 3.8.

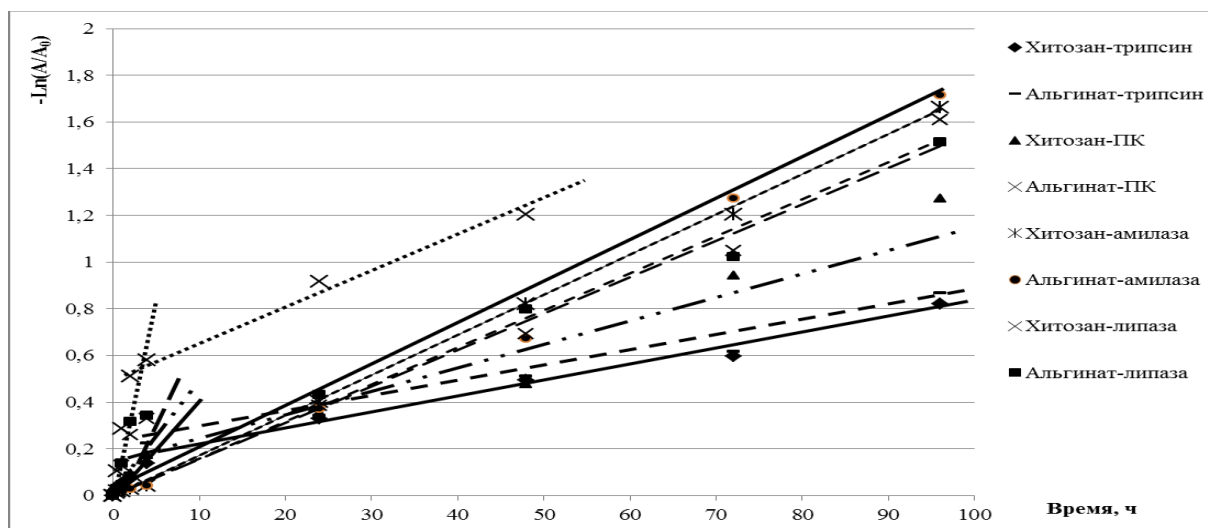


Рисунок 3.13 – Зависимость изменения относительной ферментативной активности растворов гидролаз в среде полисахаридов в течение времени хранения в полупологарифмических координатах

В промышленной практике в технологических целях чаще всего ферменты закрепляют на неподвижном носителе [12,13,25,26]. Поэтому на следующем этапе работы была проведена оценка стабильности при хранении исследуемых гидролаз, иммобилизованных на модельный неподвижный носитель, в качестве которого была выбрана полиэтиленовая матрица (плёнка). При проведении эксперимента на вышеуказанную матрицу наносили из расчета 100 мкл/см<sup>2</sup> в первом случае раствор ферментного препарата с концентрацией 1 мг/мл, а во втором - раствор ферментного препарата той же концентрации в среде 0,5% раствора полисахарида (объёмное соотношение растворов 1:1). Далее плёнку высушивали при комнатной температуре и определяли динамику изменения ферментативной активности. За  $A_0$  принимали активность ферментов до высыхания. Данные, полученные в результате эксперимента, представлены на рисунке 3.14 и в таблице 3.7.



Для полученных иммобилизованных ферментных препаратов гидролаз вышеописанным способом были определены значения констант инактивации, представленные в таблице 3.7. В той же таблице для сравнения представлены ранее (раздел 3.1) полученные значения констант инактивации нативных ферментов.

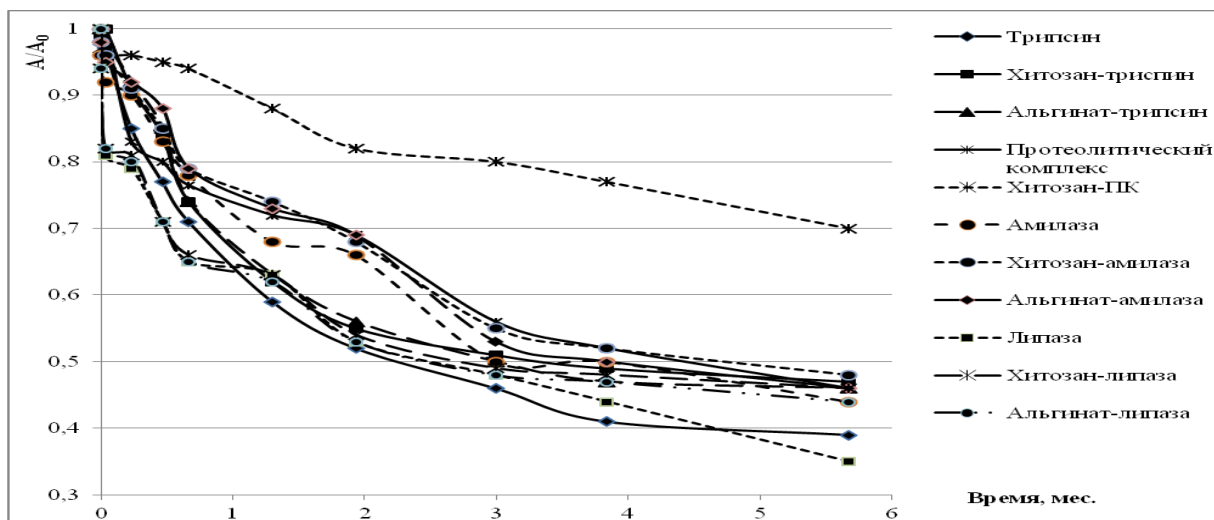


Рисунок 3.14 – Динамика изменения ферментативной активности иммобилизованных на полиэтиленовой матрице нативных ферментов и ферментов, стабилизированных полисахаридами

Таблица 3.7 – Значения эффективных констант скорости инактивации нативных гидролаз, гидролаз в среде полисахаридов и иммобилизованных на твердом носителе форм гидролаз в течение времени хранения

Ферментный препарат	Константа инактивации $k_{in}$ , ( $\cdot 10^{-3}$ ), $s^{-1}$	
	Нативная (или стабилизированная полисахаридами) форма	Препарат, иммобилизованный на твердом носителе
Трипсин	0,78±0,04	0,76±0,04
	0,11±0,01	0,11±0,01
Хитозан-трипсин	0,70±0,04	0,68±0,04
	0,10±0,01	0,09±0,01
Альгинат натрия-трипсин	0,83±0,04	0,82±0,04
	0,14±0,01	0,12±0,01
Протеолитический комплекс	1,18±0,06	1,10±0,06
	0,23±0,02	0,16±0,01
Хитозан-протеолитический комплекс	1,08±0,06	0,78±0,04
	0,15±0,01	0,14±0,01
Альгинат натрия-протеолитический комплекс	4,41±0,22	4,32±0,22
	0,31±0,01	0,28±0,01
Амилаза	0,11±0,01	0,10±0,01
Хитозан-амилаза	0,08±0,01	0,06±0,01
Альгинат натрия-амилаза	0,11±0,01	0,10±0,01
Липаза	0,19±0,01	0,18±0,01
Хитозан-липаза	0,16±0,01	0,08±0,01
Альгинат натрия-липаза	0,17±0,01	0,15±0,01

Из полученных результатов следует, что ферменты, иммобилизованные на полиэтиленовую матрицу, и в присутствии полисахаридов, более стабильны при хранении, чем нестабилизированные ферменты. Значения констант инактивации стабилизированных иммобилизованных ферментов близки соответствующим величинам, полученным для растворов гидролаз, стабилизированных полисахаридами. Это свидетельствует о том, что иммобилизация ферментов на твердый носитель незначительно снижает их активность. Было установлено, что высушенные плёнки с иммобилизованными ферментами в течение более 5 месяцев сохраняли ферментативную активность на уровне 40 - 70% от исходной.

В таблице 3.8 приведены данные по значениям времени хранения различных нативных и иммобилизованных на полиэтиленовой матрице форм гидролаз при  $A_{50\%}$ .

Таблица 3.8 – Значения времени хранения при  $A_{50\%}$  для нативных гидролаз, гидролаз в среде полисахаридов и иммобилизованных на твердом носителе препаратов

Ферментный препарат	Время хранения при $A_{50\%}$	
	Нативная форма, ч	Иммобилизованный на твердом носителе препарат, мес
Трипсин	60,5	2,3
Хитозан-трипсин	83,0	2,8
Альгинат натрия-трипсин	43,1	3,0
Протеолитический комплекс	57,0	4,4
Хитозан-протеолитический комплекс	62,2	8,6
Альгинат натрия-протеолитический комплекс	12,0	3,1
Амилаза	18,5	3,0
Хитозан-амилаза	41,1	4,6
Альгинат натрия-амилаза	47,0	3,9
Липаза	39,5	2,4
Хитозан-липаза	46,6	3,0
Альгинат натрия-липаза	41,0	2,9

Из данных, приведенных в таблице 3.8, видно, что иммобилизация на твердый носитель обеспечивает сохранение активности ферментного препарата в течение значительно большего времени – до нескольких месяцев, тогда как в случае нативных форм это время не превышает нескольких часов.

Поскольку проведенные исследования показали значительное повышение стабильности при хранении гидролаз, иммобилизованных на полиэтиленовой матрице, следующий этап работы был посвящен изучению процесса иммобилизации гидролитических ферментов на подготовленные текстильные носители, в качестве которых использовали целлюлозу и диальдегидцеллюлозу. При проведении эксперимента готовили несколько типов образцов: в первом случае иммобилизовывали фермент на неокисленной целлюлозе и ДАЦ, а во втором – иммобилизованный на целлюлозе фермент стабилизировали альгинатом и хитозаном. В первом случае навеску целлюлозной матрицы (целлюлозы или ДАЦ) помещали в раствор нативного фермента заданной концентрации и требуемого значения рН при гидромодуле 10 (масса пропиточного раствора относилась к массе носителя как 10:1). Через определенное время иммобилизации, носитель отжимали от избытка пропиточного раствора, пропуская его через резиновые

вальцы, затем материал помещали в тёмное место при температуре  $+5 \div +7^{\circ}\text{C}$  на 18-20 часов, после чего высушивали на воздухе. Далее в полученных образцах определяли содержание белка методом Лоури и остаточную ферментативную активность при хранении. Необходимо отметить, что остаточную активность определяли во влажных образцах ( $A_0$ ) после удаления избыточной влаги и сразу после высушивания.

Для получения ферментного препарата, содержащего хитозан или альгинат натрия, целлюлозную матрицу сначала обрабатывали 0,5% раствором полисахарида при гидромодуле 10 в течение двух часов. Материал далее высушивали на воздухе при комнатной температуре, после чего проводили иммобилизацию фермента в соответствии с вышеописанной методикой.

После проведения иммобилизации полученный препарат отделяли от раствора и измеряли остаточное содержание белка по методу Лоури-Гартли, а также остаточную активность в надосадочной жидкости. Полученные результаты приведены в табл. 3.9.

Таблица 3.9– Характеристики препаратов гидролаз, иммобилизованных на текстильном носителе

Ферментный препарат	Количество иммобилизованного белка, мг/г препарата	Степень иммобилизации белка, %	Ферментативная активность, ед/г	Степень иммобилизации и активного белка, %
1	2	3	4	5
Целлюлоза-трипсин	5,85	48	0,10	63
ДАЦ-трипсин	5,95	86	0,09	72
<b>Целлюлоза-хитозан-трипсин</b>	<b>6,05</b>	<b>88</b>	<b>0,11</b>	<b>74</b>
Целлюлоза-альгинат-трипсин	6,00	64	0,10	70
Целлюлоза-протеолитический комплекс	7,73	52	0,11	65,5
ДАЦ-протеолитический комплекс	7,80	89	0,12	71
<b>Целлюлоза-хитозан-ПК</b>	<b>8,30</b>	<b>91</b>	<b>0,13</b>	<b>73</b>

Продолжение таблицы 3.9

1	2	3	4	5
Целлюлоза-амилаза	8,95	49	0,08	52
ДАЦ-амилаза	9,06	74	0,08	55
<b>Целлюлоза-хитозан-амилаза</b>	<b>9,42</b>	<b>79</b>	<b>0,09</b>	<b>61</b>
Целлюлоза-альгинат-амилаза	9,34	68	0,08	57
Целлюлоза-липаза	5,75	43	0,03	47
ДАЦ-липаза	5,60	65	0,03	45
<b>Целлюлоза-хитозан-липаза</b>	<b>5,79</b>	<b>73</b>	<b>0,04</b>	<b>49</b>
Целлюлоза-альгинат-липаза	5,70	58	0,04	46

В таблице 3.10 приведено сравнение характеристик полученных в работе иммобилизованных препаратов гидролаз и промышленных образцов, содержащих иммобилизованные гидролазы [236,237,238]. Данные приведены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Сравнительная характеристика промышленных образцов иммобилизованных ферментных препаратов и полученных в работе

Ферментный препарат	Иммобилизованный фермент	Количество иммобилизованного белка, мг/г препарата	Ферментативная активность, ед/г
Целлюлоза-хитозан-трипсин	Трипсин	6,05	0,11
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	Протеолитический комплекс	8,30	0,13
Целлюлоза-хитозан-амилаза	Амилаза	9,42	0,09
Целлюлоза-хитозан-липаза	Липаза	5,79	0,04
<b>Промышленные образцы ФП</b>			
Мультиферм (носитель ДАЦ-хитозан)	Протеолитический комплекс	8,0	0,1
ПАМ-ТЛ (носитель ДАЦ)	Трипсин	2,5	0,1
Протеокс-ТМ (носитель ДАЦ)	Трипсин	3,5	0,1

Из данных таблицы 3.10 следует, что максимальная степень иммобилизации белка наблюдается при иммобилизации гидролаз на текстильный носитель, стабилизированный хитозаном. Из сравнения данных таблиц 3.9-3.10 можно сделать вывод, что максимальная ФА полученных в

данной работе иммобилизованных форм протеаз (трипсина и ПК) соответствует аналогичному параметру для торговых марок раневых покрытий (ФА для препаратов трипсина и ПК 0,11 ед/г и 0,13ед/г, соответственно). Нагруженность полученного ФП составляет 5,60-9,42 мг белка/г препарата, что соответствует диапазону значений иммобилизованного белка в промышленных ФП раневых покрытий. Таким образом, препараты протеолитических ферментов, иммобилизованных на носителе целлюлоза-хитозан, содержат необходимое количество лекарственного средства (иммобилизованного фермента) и имеют сопоставимую с промышленно выпускаемыми раневыми покрытиями ФА.

В промышленной и лабораторной практике используют в качестве носителей для иммобилизации синтетические полимерные материалы, поэтому представляло интерес оценить степень сохранения ФА для случаев иммобилизации гидролаз на полисахаридные носители (по экспериментальным данным) и синтетические (по литературным данным [239,240,241]). Результаты приведены в табл. 3.11, из которой видно, что степень сохранения активности гидролаз, иммобилизованных на полисахаридные носители, выше, чем для соответствующих ФП, иммобилизованных на синтетические.

Таблица 3.11 – Степень сохранения активности ферментных препаратов при иммобилизации на полисахаридные и синтетические носители

ФП	Носитель	Степень сохранения активности, %
Амилаза грибная	целлюлоза	81,6
	целлюлоза-хитозан	86,2
	целлюлоза-альгинат	80,5
	полиамфолит АНКБ-2	57,0
	сульфакатионообменник К-1	73,0
Трипсин КРС	целлюлоза	81,1
	целлюлоза-хитозан	86,6
	целлюлоза-альгинат	82,3
	поли-N-винилпирролидон	75,6
	силохром	73,0
Липаза КРС	целлюлоза	68,9
	целлюлоза-хитозан	87,1
	целлюлоза-альгинат	84,3
	Полистирол	86,4
	АВ-17-2П	46,7

Проведённый анализ литературных и экспериментальных данных доказывает преимущество использования природных полисахаридных носителей для иммобилизации гидролаз в сравнении с синтетическими.

Еще одним перспективным методом иммобилизации является микрокапсулирование, т. е. включение высокомолекулярных биологически активных веществ в полупроницаемые мембраны. В настоящее время этот способ является одним из самых распространенных методов иммобилизации. Данный метод относят к физическим (механическим) способам иммобилизации, при котором молекулы фермента удерживаются в полисахаридной капсуле за счёт слабых взаимодействий без образования при этом ковалентных связей [232]. Ферменты, включенные в микрочастицы полимеров, находят применение в аналитических, медицинских и промышленных целях.

В литературных данных указывается, что микрочастицы позволяют сохранять активность ферментов в течение более длительного времени, увеличивать их операционную стабильность в условиях, отличных от оптимальных, регулировать введение реагентов в реакционный процесс, использовать фермент многократно и т.д. В качестве полимеров для получения микрочастиц были использованы альгинат натрия и хитозан. Процесс иммобилизации осуществляли по методике, приведенной в разделе «Материалы и методы». Размер полученных микрочастиц определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа (раздел «Материалы и методы»). Размер микрочастиц (рисунок 3.15) составил 0,8-1,2 мкм.



Рисунок 3.15 – Определение размера микрочастиц, нагруженных панкреатической липазой (сканирующий электронный микроскоп JEOL 1610LV с энергодисперсионным спектрометром для электронно-зондового микроанализа SSD X-Max Inca Energy).

После проведения иммобилизации по методу Лоури определяли количество иммобилизованного белка в полученных микрочастицах (табл. 3.12).

Таблица 3.12 – Степень включения гидролаз в полисахаридные микрочастицы

Микрочастицы	Количество иммобилизованного белка мг на г препарата
Триспин	1,80
Амилаза	2,05
<b>Липаза</b>	<b>2,35</b>

На следующем этапе работы оценили эффективность полученных препаратов иммобилизованных гидролаз.

Аналогично нативным формам ферментных препаратов для иммобилизованных гидролаз были построены зависимости в координатах Лайнуивера-Берка. для определения их кинетических характеристик: максимальной скорости ( $V_{max}$ ) и константы Михаэлиса ( $K_m$ ). На рис. 3.16 в качестве примера приведены результаты обработки экспериментальных данных для протеолитического комплекса, иммобилизованного на носителе целлюлоза-хитозан, а результаты расчётов для всех форм ферментных препаратов приведены в таблице 3.13.

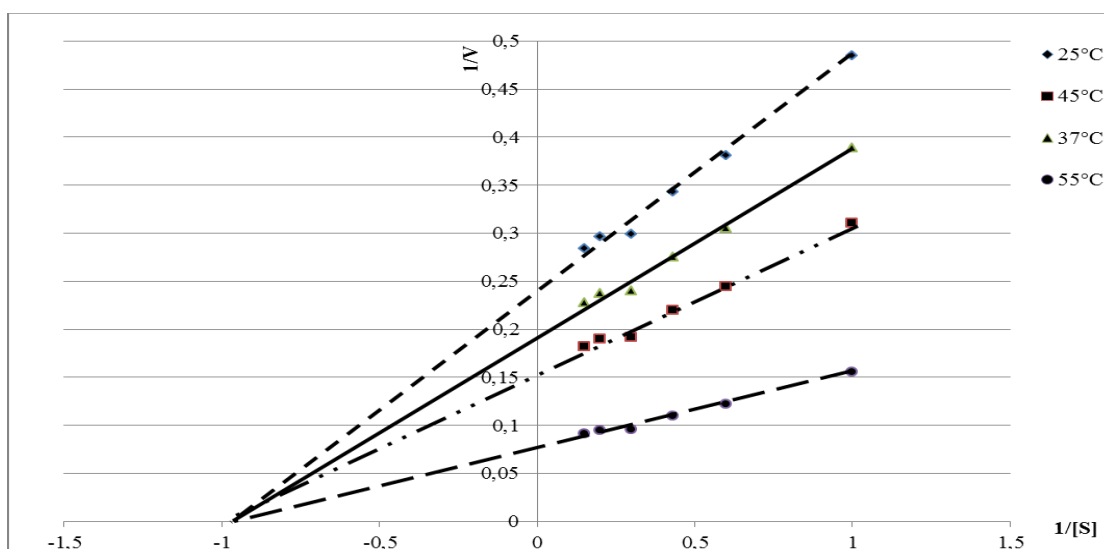


Рисунок 3.16 – Зависимости в координатах Лайнуивера-Берка для иммобилизованного препарата протеолитического комплекса (целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс) при различных температурах



Таблица 3.13 – Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен иммобилизованных форм гидролаз при различных температурах

Форма ферментного препарата	Температура, °С	$V_{max} (\cdot 10^3)$ , (моль/дм <sup>3</sup> ·с)
1	2	3
Целлюлоза-трипсин	25	0,91±0,05
	37	1,50±0,08
	45	2,39±0,12
	55	2,73±0,14
	$K_m=2,14\pm0,11$ г/дм <sup>3</sup>	
Диальдегидцеллюлоза (2%)-трипсин	25	0,93±0,05
	37	1,54±0,08
	45	2,41±0,12
	55	2,76±0,14
	$K_m=2,16\pm0,11$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-хитозан-трипсин	25	1,13±0,06
	37	1,85±0,09
	45	2,79±0,14
	55	3,09±0,15
	$K_m=2,33\pm0,12$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-альгинат-трипсин	25	1,01±0,05
	37	1,67±0,08
	45	2,61±0,13
	55	2,91±0,15
	$K_m=2,21\pm0,11$ г/дм <sup>3</sup>	
Микрочастицы трипсина	25	0,64±0,03
	37	0,96±0,05
	45	1,43±0,07
	55	1,54±0,08
	$K_m=2,06\pm0,10$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-протеолитический комплекс	25	0,05±0,01
	37	0,06±0,01
	45	0,10±0,01
	55	0,23±0,01
	$K_m=0,73\pm0,04$ г/дм <sup>3</sup>	
Диальдегидцеллюлоза (2%)- протеолитический комплекс	25	0,06±0,01
	37	0,06±0,01
	45	0,11±0,01
	55	0,23±0,01
	$K_m=0,71\pm0,04$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	25	0,08±0,01
	37	0,10±0,01
	45	0,13±0,01
	55	0,25±0,01
	$K_m=0,95\pm0,05$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-липаза	25	0,03±0,01
	37	0,05±0,01
	45	0,07±0,01
	55	0,08±0,01
	$K_m=4,08\pm0,20$ г/дм <sup>3</sup>	

1	2	3
Диальдегидцеллюлоза (2%)-липаза	24	0,03±0,01
	37	0,04±0,01
	45	0,06±0,01
	55	0,08±0,01
	$K_m=4,03\pm0,20$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-хитозан-липаза	25	0,03±0,01
	37	0,06±0,01
	45	0,08±0,01
	55	0,09±0,01
	$K_m=4,12\pm0,20$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-альгинат-липаза	25	0,031±0,01
	37	0,068±0,01
	45	0,110±0,01
	55	0,126±0,01
	$K_m=4,15\pm0,21$ г/дм <sup>3</sup>	
Микрочастицы липазы	25	0,06±0,01
	37	0,08±0,01
	45	0,10±0,01
	55	0,12±0,01
	$K_m=4,76\pm0,24$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-амилаза	25	36,61±1,81
	45	60,08±3,00
	55	74,92±3,74
	65	94,42±4,72
	$K_m=1,79\pm0,09$ г/дм <sup>3</sup>	
Диальдегидцеллюлоза (2%)-амилаза	25	37,22±1,86
	45	64,37±3,22
	55	80,52±4,03
	65	103,5±5,17
	$K_m=1,76\pm0,09$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-хитозан-амилаза	25	39,58±1,98
	45	79,27±3,96
	55	109,77±5,48
	65	114,75±5,74
	$K_m=1,90\pm0,09$ г/дм <sup>3</sup>	
Целлюлоза-альгинат-амилаза	25	37,75±1,89
	45	71,50±3,58
	55	89,18±4,46
	65	90,83±4,54
	$K_m=1,88\pm0,09$ г/дм <sup>3</sup>	
Микрочастицы амилазы	25	36,42±1,82
	45	59,43±2,97
	55	74,30±3,72
	65	91,10±4,56
	$K_m=1,76\pm0,09$ г/дм <sup>3</sup>	

Из приведенных результатов следует, что значения  $K_m$  иммобилизованных и нативных форм ферментов практически совпадают. Что касается численных значений  $V_{max}$ , то для более эффективных

иммобилизованных препаратов гидролаз наблюдается их увеличение в сравнении с нативными формами. Так, для иммобилизованного на хитозансодержащей целлюлозе трипсина значение  $V_{\max}$  увеличилось в 2 раза, для аналогичных препаратов протеолитического комплекса и амилазы - в 1,5 раза, для микрочастиц липазы - в 1,4 раза в сравнении с соответствующими нативными ферментами. Однако для ряда иммобилизованных препаратов (протеолитический комплекс, иммобилизованный на целлюлозе и диальдегидцеллюлозе, а также препараты липазы на диальдегидцеллюлозе и хитозансодержащей целлюлозе) можно увидеть небольшое уменьшение значений  $V_{\max}$  относительно нативных ферментов (на 14%), что может быть обусловлено пространственными затруднениями, создаваемыми при взаимодействии субстрата и фермента нерастворимой матрицей.

### **3.3. Установление механизмов иммобилизации ферментов на полисахаридные носители**

Для выявления пространственной структуры фермента применяют методы рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса, инфракрасной спектроскопии, некоторые виды микроскопии и др. Инфракрасная (ИК) спектроскопия является одним из основных методов анализа органических соединений. С помощью нее можно быстро и надёжно идентифицировать различные функциональные группы, непредельные фрагменты молекул: двойные и тройные углерод-углеродные связи, ароматические и гетероароматические системы. Методами ИК-спектроскопии изучают межмолекулярные взаимодействия соединений, приводящие к образованию различных химических связей.

В данной работе были исследованы взаимодействия между компонентами в следующих системах: фермент-целлюлоза; фермент-хитозан/альгинат натрия; целлюлоза-хитозан/альгинат натрия; целлюлоза-хитозан/альгинат натрия-фермент. Для анализа образовавшихся связей в иммобилизованной системе необходимо предварительно рассмотреть отдельные составляющие данной сложной системы. На рисунке 3.17

представлены ИК-спектры водных растворов ферментов, полисахаридов и текстильных носителей. В Приложении 1 даны характеристики колебательных частот вышеприведенных соединений.

На ИК-спектрах нативных гидролаз (рис. 3.17 а-г) присутствуют ярко выраженные максимумы поглощения ( $1630-1700\text{ см}^{-1}$  и  $1650-1550\text{ см}^{-1}$ ), свойственные валентным колебаниям карбонильных групп  $\text{C}=\text{O}$  и деформационным колебаниям аминокрупп белков, которые доказывают наличие пептидной связи. Как известно, протеолитический комплекс и трипсин относятся к классу сериновых протеаз, в активный центр которых входит гистидин. Соответствующая гистидину полоса поглощения ( $3400-3300\text{ см}^{-1}$ ) характеризует наличие валентной  $=\text{NH}-$  связи.

Максимумы поглощения в диапазоне частот  $1650-1590\text{ см}^{-1}$  довольно слабой интенсивности свидетельствуют о наличии  $-\text{NH}_2-$  группы в структуре хитозана (рис. 3.17 д).

ИК-спектр альгината натрия (рис. 3.17 е) свидетельствует о наличии в нём карбонильных групп (максимум поглощения при  $2950-2820\text{ см}^{-1}$ ), гидроксильных групп (максимум поглощения при  $1090-1027\text{ см}^{-1}$ ). Аналогичные максимумы поглощения видны и на ИК-спектре целлюлозы (рис. 3.22 ж): соответственно, для гидроксильных групп при частотах  $1062\text{ см}^{-1}$  и карбонильных при частотах  $2896\text{ см}^{-1}$ .

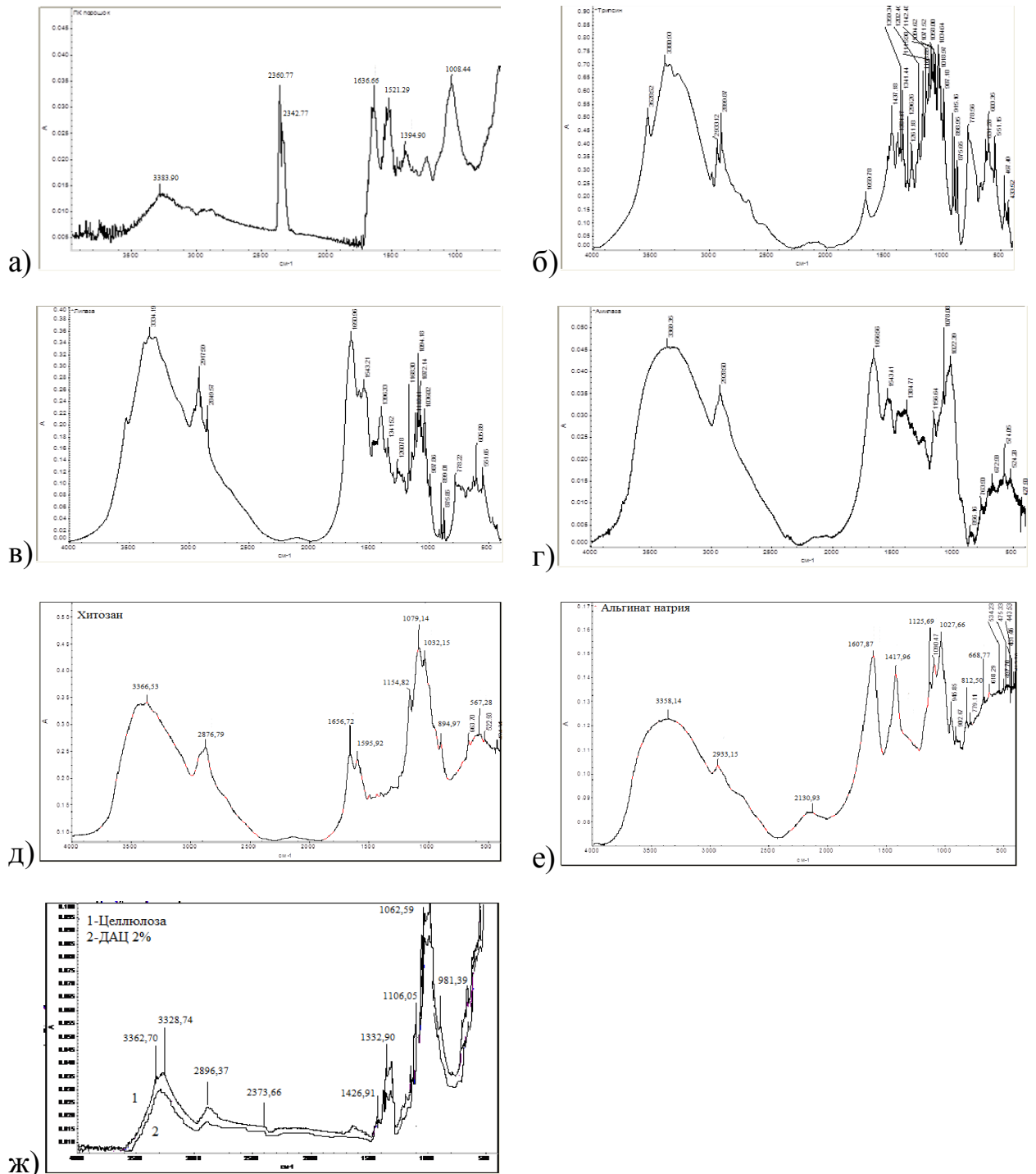


Рисунок 3.17 – ИК-спектры нативных гидролаз, полисахаридов и немодифицированных носителей: а) трипсин; б) протеолитический комплекс; в) липаза; г) амилаза; д) 0,5% гель хитозана; е) 0,5% гель альгината натрия; ж) целлюлоза и диальдегидцеллюлоза 2% степени окисленности

На стадии модификации носителя (целлюлозы) хитозаном происходит взаимодействие альдегидных групп целлюлозной матрицы с аминогруппами полисахарида с образованием ковалентной азометиновой связи. Образование азометиновой связи подтверждается наличием максимума поглощения при

частоте  $1663\text{ см}^{-1}$  с довольно высокой интенсивностью (рис. 3.18 а). При обработке целлюлозы альгинатом натрия происходит взаимодействие их гидроксильных групп с образованием простой эфирной связи, максимум поглощения которой соответствует  $1159\text{ см}^{-1}$  (рис. 3.18 б). Соответствующие максимумы поглощения на рис. 3.18 выделены красным цветом.

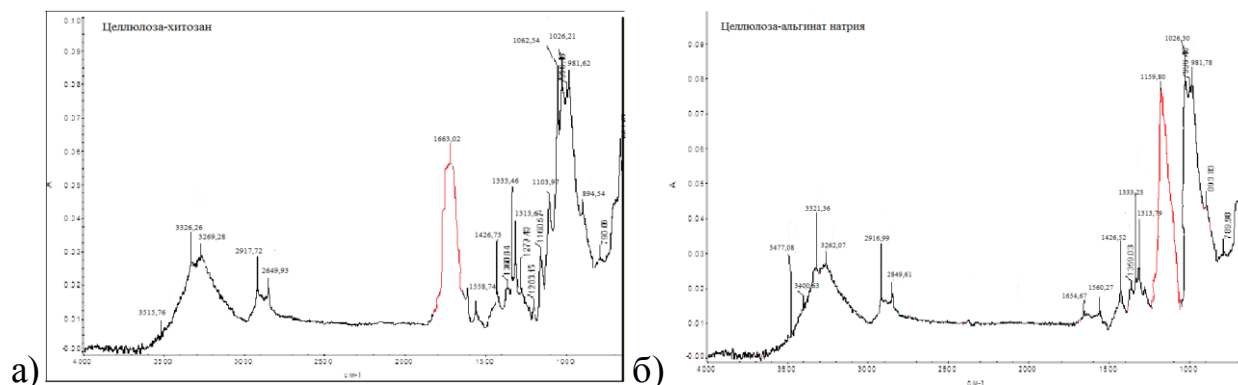


Рисунок 3.18 – ИК-спектры образцов текстильных носителей, модифицированных полисахаридами: а) целлюлоза-хитозан; б) целлюлоза-альгинат натрия

На рисунке 3.19 представлены ИК-спектры взаимодействия белков с полисахаридами (хитозаном и альгинатом натрия). В сравнении со спектрами индивидуальных соединений видны значительные изменения. Ферменты вступают в реакцию с хитозаном, используя как amino-, так и гидроксильные группы. ИК-спектры комплекса, получаемого при взаимодействии белков с хитозаном, содержат максимумы поглощения при  $1690\text{--}1630\text{ см}^{-1}$ , отвечающие колебаниям валентным  $\text{--N=C--}$  связям (рис. 3.19 а, в, д, е). Альгинат натрия легко вступает в реакцию с аминокислотами ферментов. Взаимодействие альдегидных и гидроксильных групп альгината натрия с аминокислотами белка приводит к образованию Шиффовых оснований – альдиминов, которые далее претерпевают внутримолекулярную перегруппировку. Последующие реакции дегидратации, альдольной конденсации позволяют получить сшитые продукты с образованием двойных валентных  $\text{C=C--C=C}$  связей. На ИК спектрах данным связям соответствуют максимумы поглощения при частотах  $1608\text{--}1607\text{ см}^{-1}$  (рис. 3.19 б, г, ж).

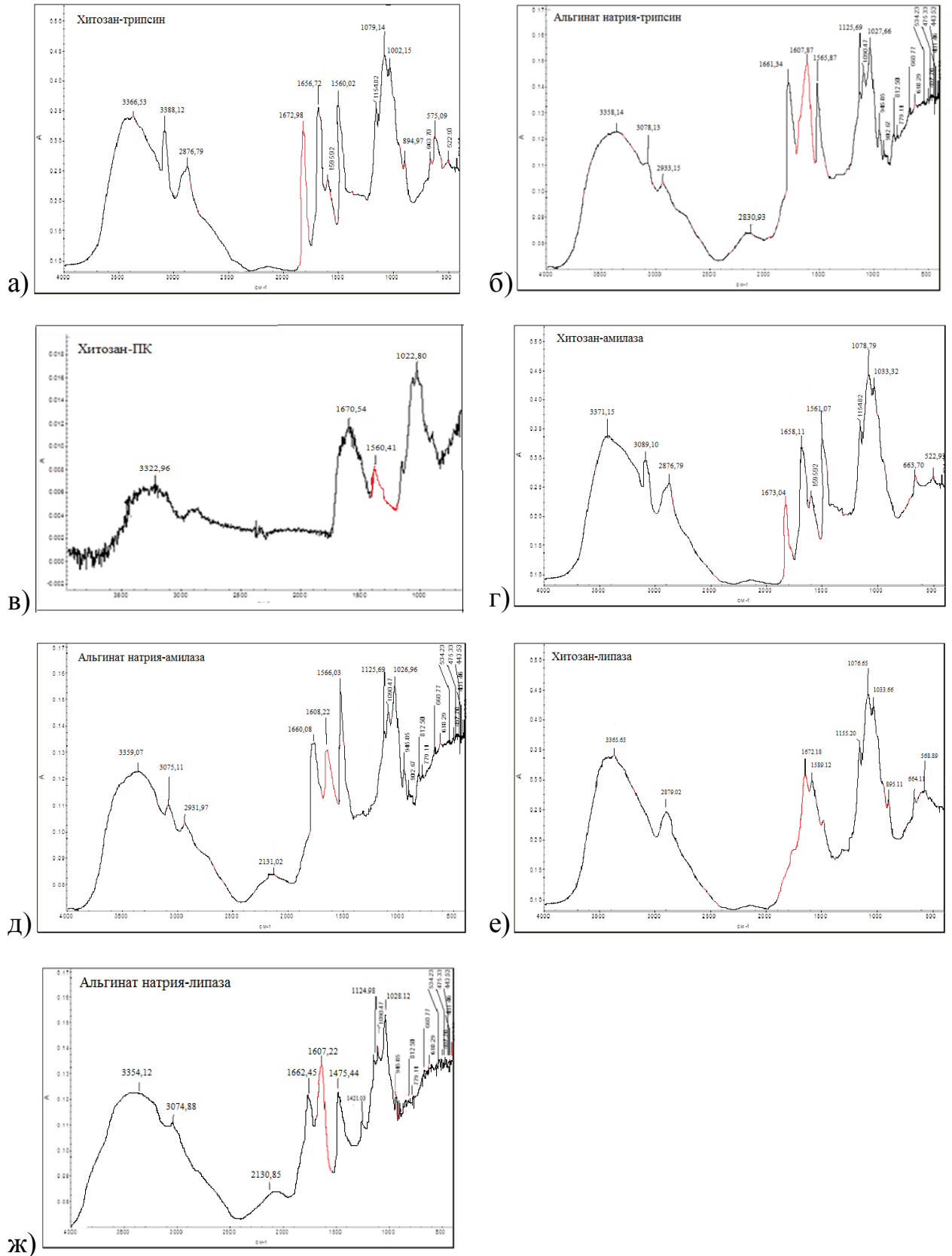


Рисунок 3.19 – ИК-спектры нативных гидролаз, стабилизированных полисахаридами: а) трипсин-хитозан; б) трипсин-альгинат натрия; в) протеолитический комплекс-хитозан; г) амилаза-хитозан; д) амилаза-альгинат натрия; е) липаза-хитозан; ж) липаза-альгинат натрия

ИК-спектры взаимодействия целлюлозного носителя с гидролитическими ферментами представлены на рисунке 3.20. Образование ковалентной связи между альдегидными группами активированной целлюлозы и аминок группами белка происходит с образованием азометиновой связи (основания Шиффа). Взаимодействие аминов и карбонильных соединений протекает в две обратимые стадии [235]. На первой стадии аминок группа присоединяется к карбонильной группе с образованием промежуточного аминок спирта, который подвергается дегидратации на второй стадии.

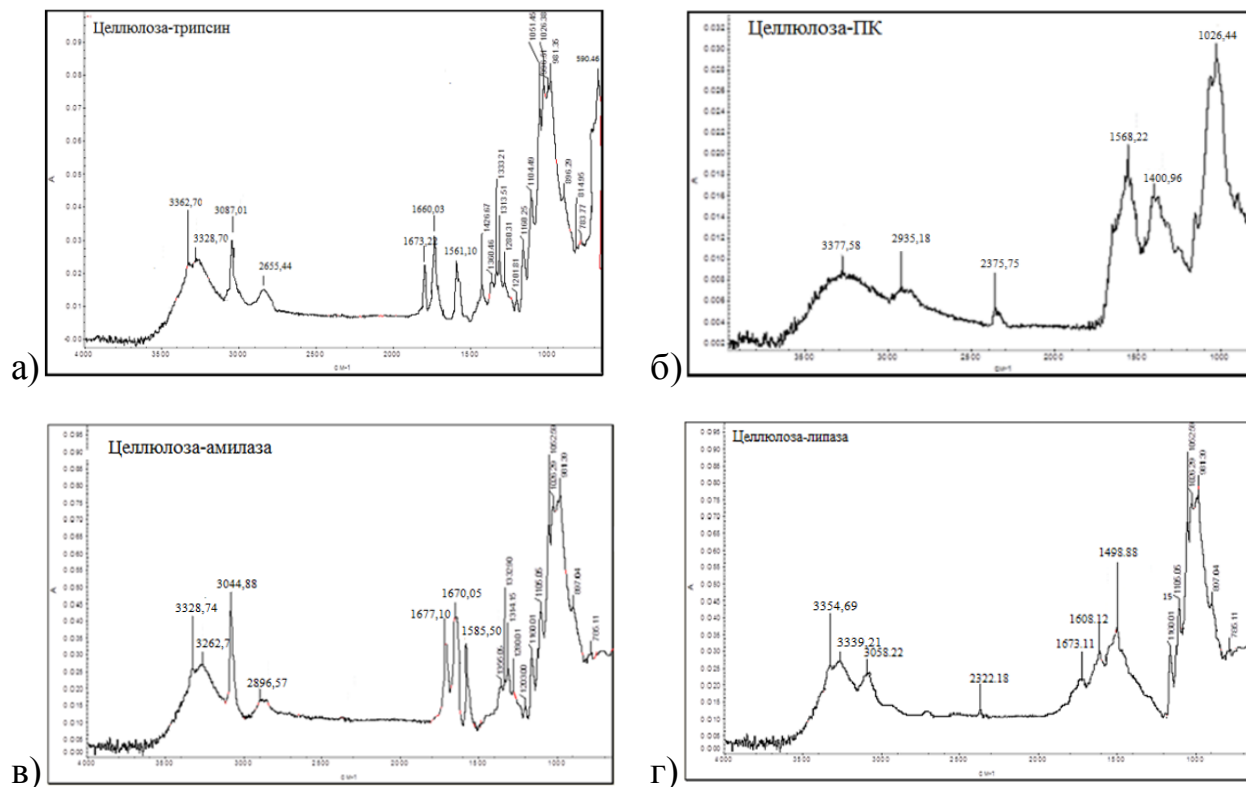


Рисунок 3.20 – ИК-спектры гидролаз на текстильных носителях, не модифицированных полисахаридами: а) целлюлоза-трипсин; б) целлюлоза-протеолитический комплекс; в) целлюлоза-амилаза; г) целлюлоза-липаза

ИК-спектры иммобилизованных препаратов гидролаз представлены на рисунке 3.21.



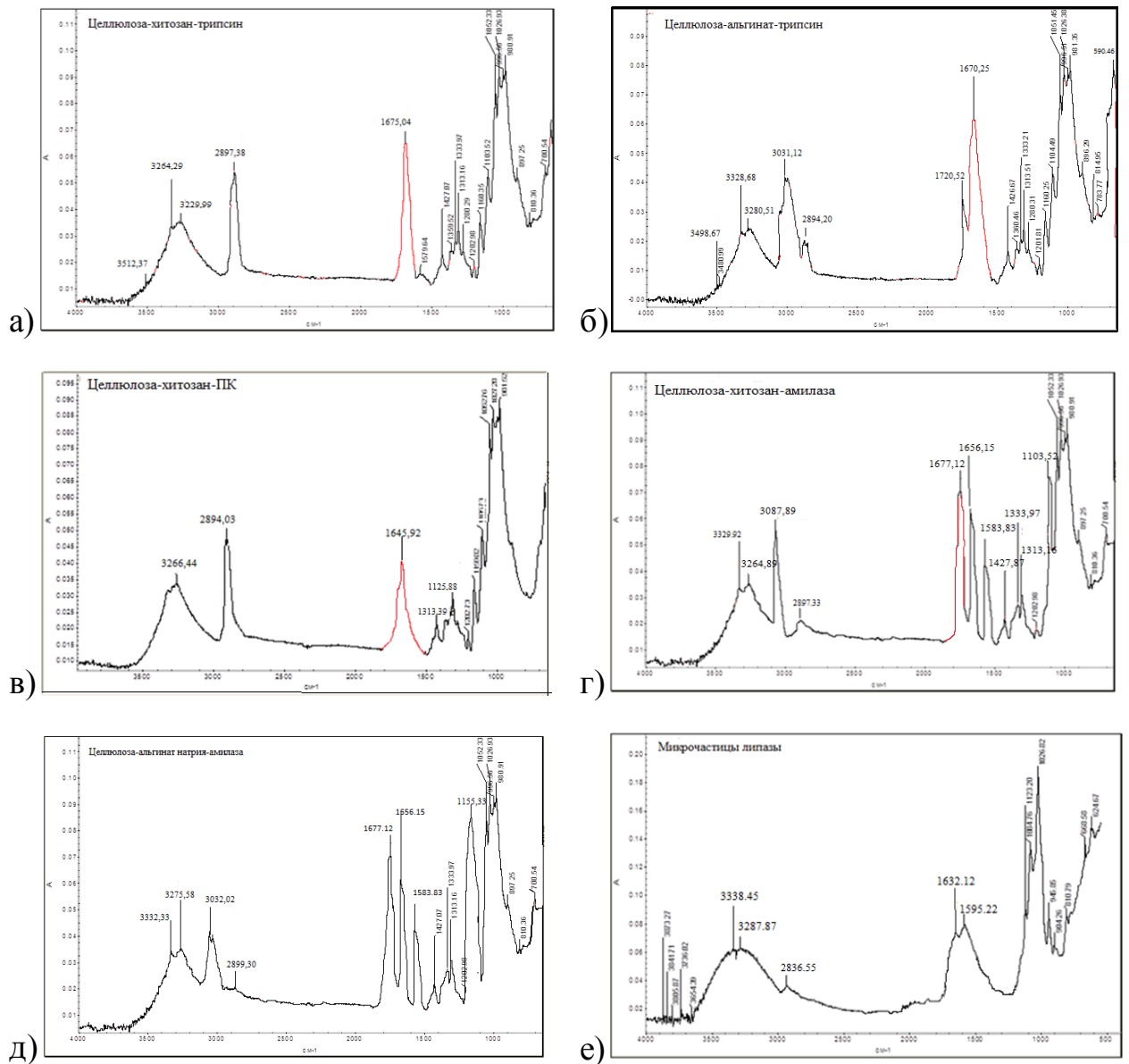


Рисунок 3.21 – ИК-спектры иммобилизованных препаратов гидролаз: а) целлюлоза-хитозан-трипсин; б) целлюлоза-альгинат-трипсин; в) целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс; г) целлюлоза-хитозан-амилаза; д) целлюлоза-альгинат-амилаза; е) микрочастицы липазы

Важнейшим условием химического метода иммобилизации ферментов является образование ковалентных связей между функциональными группами фермента с носителем. Для того, чтобы выяснить, происходит ли образование новых ковалентных связей при иммобилизации гидролаз на полисахаридные носители было проведено наложение спектров с помощью программы SpectraSuite. На рисунке 3.22 представлены полученные результаты. На ИК-спектрах ферментных препаратов, в отличие от спектра носителя, видны соответствующие колебательные переходы пептидной

связи, а именно: появление связи C=O ( $1630-1700\text{ см}^{-1}$ , полоса амид I) и деформация связи N-H ( $1650-1550\text{ см}^{-1}$ , полоса амид II). В случае носителя целлюлоза-хитозан (рис. 3.22 (а)) на спектре присутствует полоса поглощения  $1690-1630\text{ см}^{-1}$ , соответствующей азометиновой связи C=N, которая может образоваться в результате взаимодействия с карбонильными группами целлюлозы как аминогрупп хитозана, так и аминогрупп фермента. В случае носителя целлюлоза-альгинат (рис. 3.22 б) азометиновая связь появляется только на спектре, содержащем фермент, что доказывает взаимодействие аминогрупп фермента и карбонильных групп целлюлозы. Также процесс иммобилизации в 2-х рассмотренных случаях сопровождается появлением колебаний в области  $3300-2500\text{ см}^{-1}$ , свидетельствующих о деформации ОН-группы, что обусловлено образованием новых водородных связей. Таким образом, можно предположить, что иммобилизация на полисахаридные носители является химической.

На рис. 3.22 (в) приведен ИК-спектры хитозана, альгината натрия и микрочастиц липазы. На ИК-спектре препарата липазы присутствуют полосы поглощения, соответствующие несвязанным аминогруппам хитозана ( $1650-1590\text{ см}^{-1}$ ), гидроксильным ( $1150-1000\text{ см}^{-1}$ ) и карбонильным ( $2900-2820\text{ см}^{-1}$ ) группам. Сравнение данного спектра поглощения со спектрами индивидуальных соединений (хитозана и альгината натрия) показывает, что в результате иммобилизации фермента методом микрокапсулирования не происходит образования новых ковалентных связей, что позволяет предположить физическую иммобилизацию ферментов в альгинатные микрочастицы.

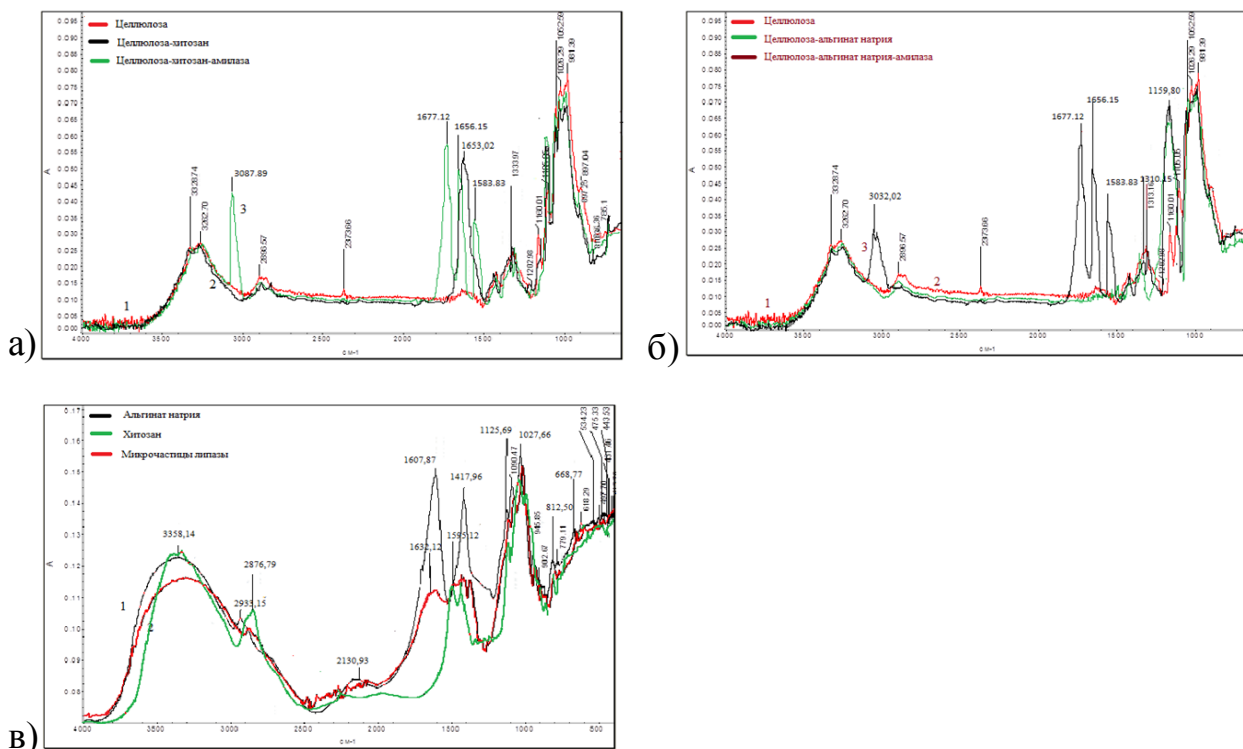


Рисунок 3.22 – ИК-спектры гидролаз: а) амилазы, иммобилизованной на матрице целлюлоза-хитозан; б) амилазы, иммобилизованной на матрице целлюлоза-альгинат натрия; в) липазы, иммобилизованной в микрочастицы альгината натрия

### 3.4. Влияние иммобилизации на операционную стабильность гидролаз

Следующим этапом работы явилось изучение влияния рН и температуры среды на операционную стабильность полученных иммобилизованных форм гидролаз, а также определение их температурного и рН оптимумов. Процесс иммобилизации, как отмечается во многих литературных источниках [12,19,33,165], может существенно влиять на температурный оптимум ферментов, поскольку даже незначительная модификация активного центра ферментов может привести к необратимым изменениям их свойств.

Данные исследования для иммобилизованных ферментных препаратов проводили аналогично описанному выше для нативных. Полученные результаты приведены на рисунке 3.23.

Из представленных данных видно, что для препаратов протеаз и липазы температурный оптимум действия остается таким же, как и для нативных ферментов и составляет 37°C.

Операционная стабильность [234] данных ферментных препаратов возросла вследствие иммобилизации: степень сохранения активности при более высоких температурах выше, чем для нативных ферментов. Таким образом, при 75°C степень сохранения активности иммобилизованных форм трипсина увеличилась в 2 раза, протеолитического комплекса – в 2,5 раза, амилазы – в 1,3 раза, липазы – в 1,9 раз в сравнении с соответствующими нативными ферментами.

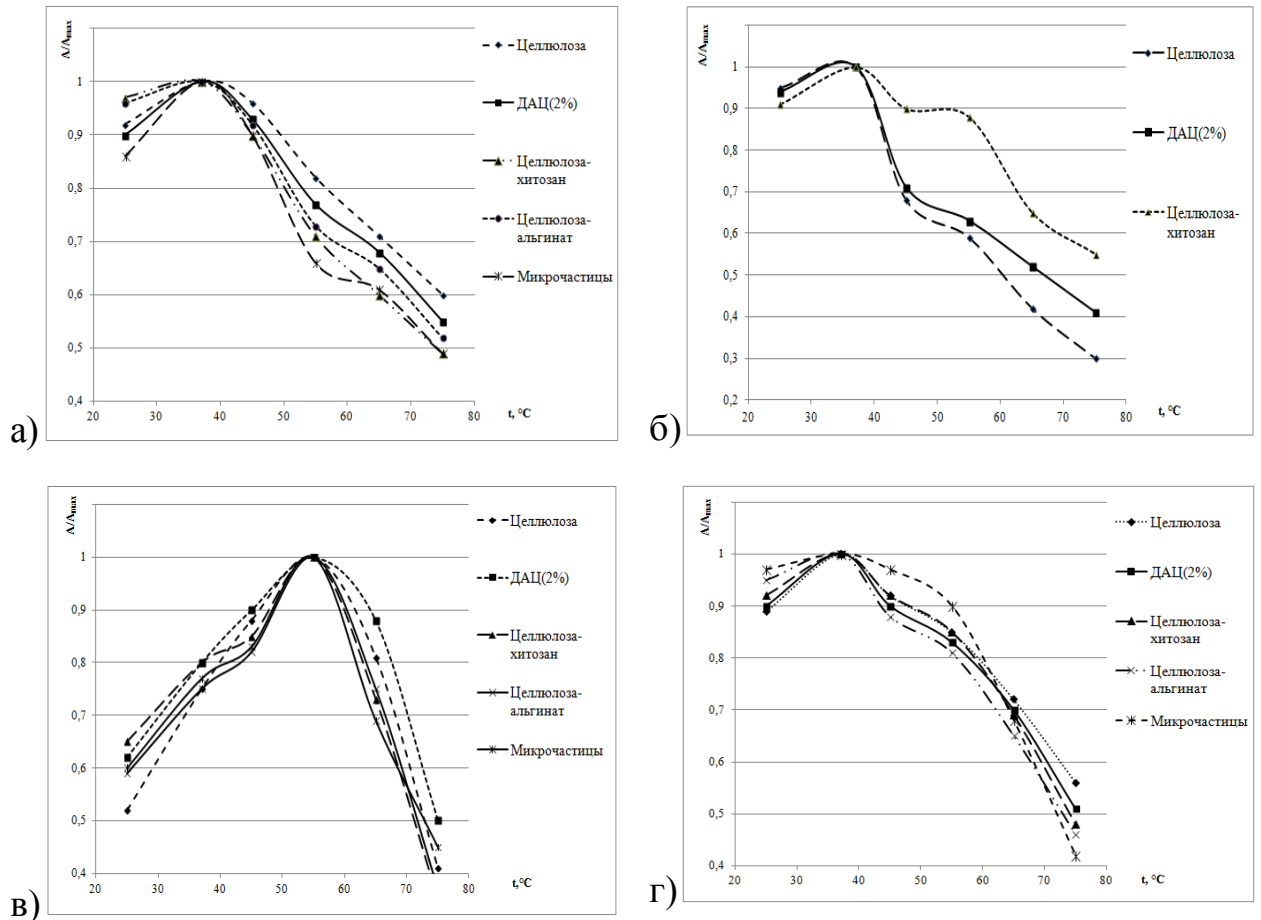


Рисунок 3.23 – Влияние температуры на относительную активность иммобилизованных гидролаз: а) трипсина; б) протеолитического комплекса; в) амилазы; г) липазы при оптимальном значении рН среды

Кроме того, в случае иммобилизованной амилазы наблюдалось смещение температурного оптимума в сторону более высоких температур – до 55°C. Такое смещение может быть обусловлено наличием целлюлозной матрицы, которая создает стерические затруднения и защищает молекулу фермента от действия тепловой денатурации. Аналогичные данные по

изменению свойств иммобилизованных ферментов (смещение температурного оптимума бактериальной амилазы в сторону более высокой температуры с 60°C до 65°C) по отношению к нативным представлены в работах Yandri и Suhartati [75]. Следовательно, иммобилизация позволяет повысить стабильность ферментного препарата при высоких температурах. Благодаря этому возможно проведение ферментативного гидролиза без поддержания асептических условий, что упрощает и удешевляет технологический процесс.

Как известно, в состав активного центра ферментов входят ионогенные группы, благодаря которым осуществляется распознавание субстрата ферментом и их взаимодействие, протекают каталитические реакции [61]. Поскольку функционирование фермента как биокатализатора зависит от наличия некоторых специфических групп, то каждая из них должна находиться в определенном состоянии, соответствующем стерическому расположению и заряду. При изменении pH среды вследствие изменения этого «состояния» снижается активность фермента и его стабильность. Иммобилизация часто способствует смещению pH оптимума иммобилизованного фермента по сравнению с нативным. Это, как правило, связано с изменением микроокружения фермента, а, следовательно, с изменением количества протонов. Влияние на операционную стабильность иммобилизованного препарата при неоптимальных значениях pH среды оказывает также носитель, который может снижать скорость диффузии протонов и способствовать их неравномерному распределению по его поверхности [94].

Результаты исследований по определению pH оптимума иммобилизованных ферментов, выполненные аналогично ранее описанным, приведены на рис. 3.24.

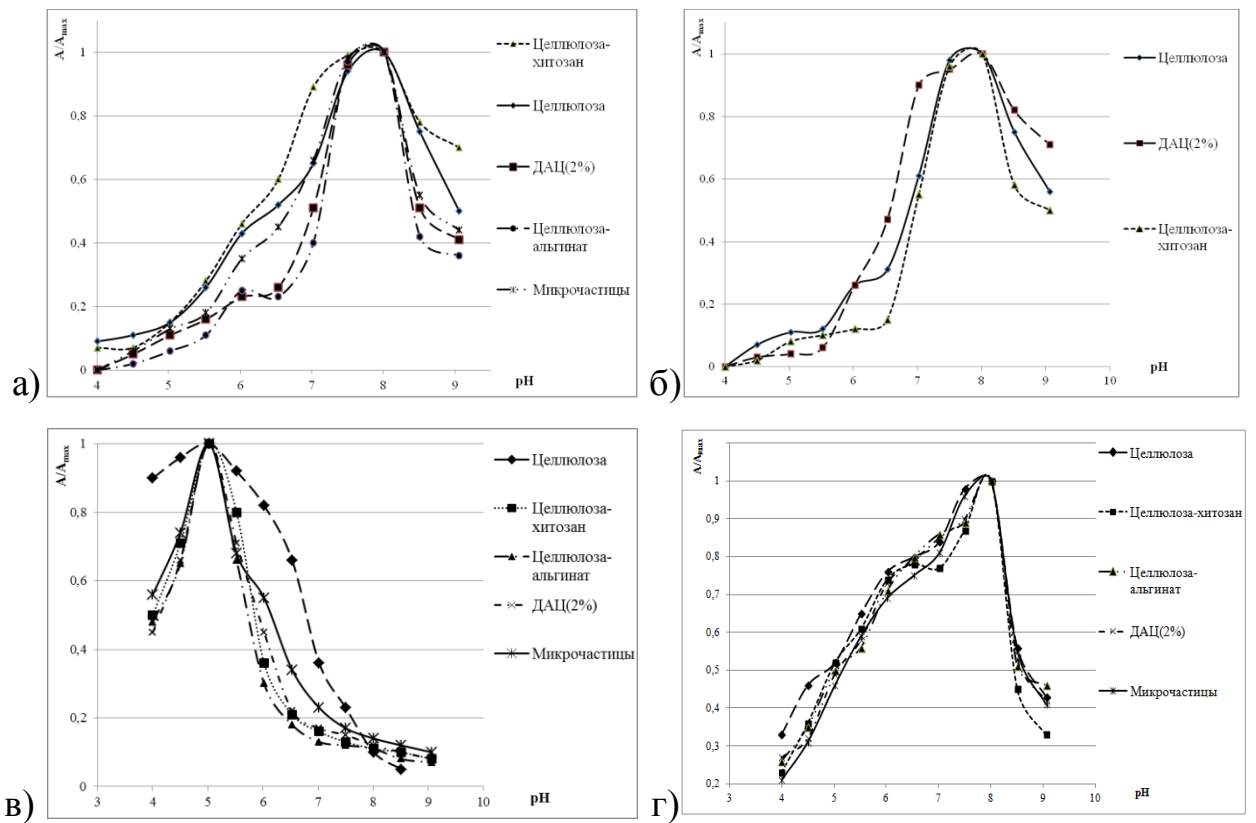


Рисунок 3.24 – Влияние pH на остаточную ферментативную активность иммобилизованных гидролаз: а) трипсина; б) протеолитического комплекса; в) амилазы; г) липазы при оптимальной температуре

Как видно из рис. 3.24, оптимальное значение pH для иммобилизованных форм гидролаз практически не изменилось по сравнению с нативными ферментами. Из полученных данных следует, что иммобилизация гидролаз на целлюлозные носители, содержащие полисахариды, и микрокапсулирование, не приводят к смещению pH оптимума иммобилизованных препаратов в сравнении с их нативными формами. Этот факт указывает на то, что при иммобилизации ферментов не затрагиваются ионогенные группы, участвующие в формировании их активного центра [242]. Таким образом, pH-оптимум иммобилизованных препаратов трипсина и протеолитического комплекса составляет 7,8; амилазы – 5,0 и липазы - 8,0. Однако следует отметить, что иммобилизация, как на целлюлозные носители, так и в микрокапсулы сужает оптимум pH ферментативной активности в сравнении с нативными ферментами.

Помимо оценки операционной стабильности ферментов необходимо оценить их функциональную стабильность.

### **3.5. Влияние иммобилизации на функциональную стабильность гидролаз**

Функциональная стабильность представляет способность сохранять активность ферментного препарата после предынкубации в условиях, отличных от оптимальных. При этом активность фермента определяется в оптимальных условиях его действия. Как отмечалось выше, термостабильность фермента является важным фактором, определяющим его практическое применение в промышленности [12,61]. Получение термостабильного иммобилизованного ферментного препарата гидролаз, способного сохранять свою активность при оптимальных и повышенных температурах, позволило бы снизить затраты на проведение ферментативных процессов в различных отраслях медицины, пищевой и химической промышленности. Знание кинетики процессов термоинактивации гидролитических ферментов позволяет прогнозировать устойчивость ферментов через определенный промежуток времени.

В связи с этим были проведены исследования процессов термической инактивации иммобилизованных препаратов трипсина, протеолитического комплекса, амилазы и липазы.

Как известно из литературных источников, ковалентная иммобилизация ферментов значительно влияет на стабильность ферментов в процессе термической денатурации. В работах [12,75,91] содержится достаточное количество примеров сохранения стабильности ферментов при термоинактивации после их модификации (ковалентной иммобилизации, включения в структуру полимерных гелей, сорбции на носителе и др.). Было отмечено повышение термостабильности модифицированных препаратов по сравнению с нативными ферментами на несколько порядков.

Для оценки функциональной стабильности иммобилизованные ферментные препараты инкубировали в 0,067 М фосфатном буфере при

температурах 25-65°C в течение различных промежутков времени, после чего измеряли остаточную активность в оптимальных для каждого ферментного препарата условиях. Полученные данные процесса термоинактивации (в течение 72 часов) иммобилизованных ферментных препаратов относительно их нативных форм приведены на рис.3.25.

Так же, как и в случае с нативными гидролазами, были рассчитаны эффективные константы скорости термоинактивации для иммобилизованных ферментов (таблица 3.14).

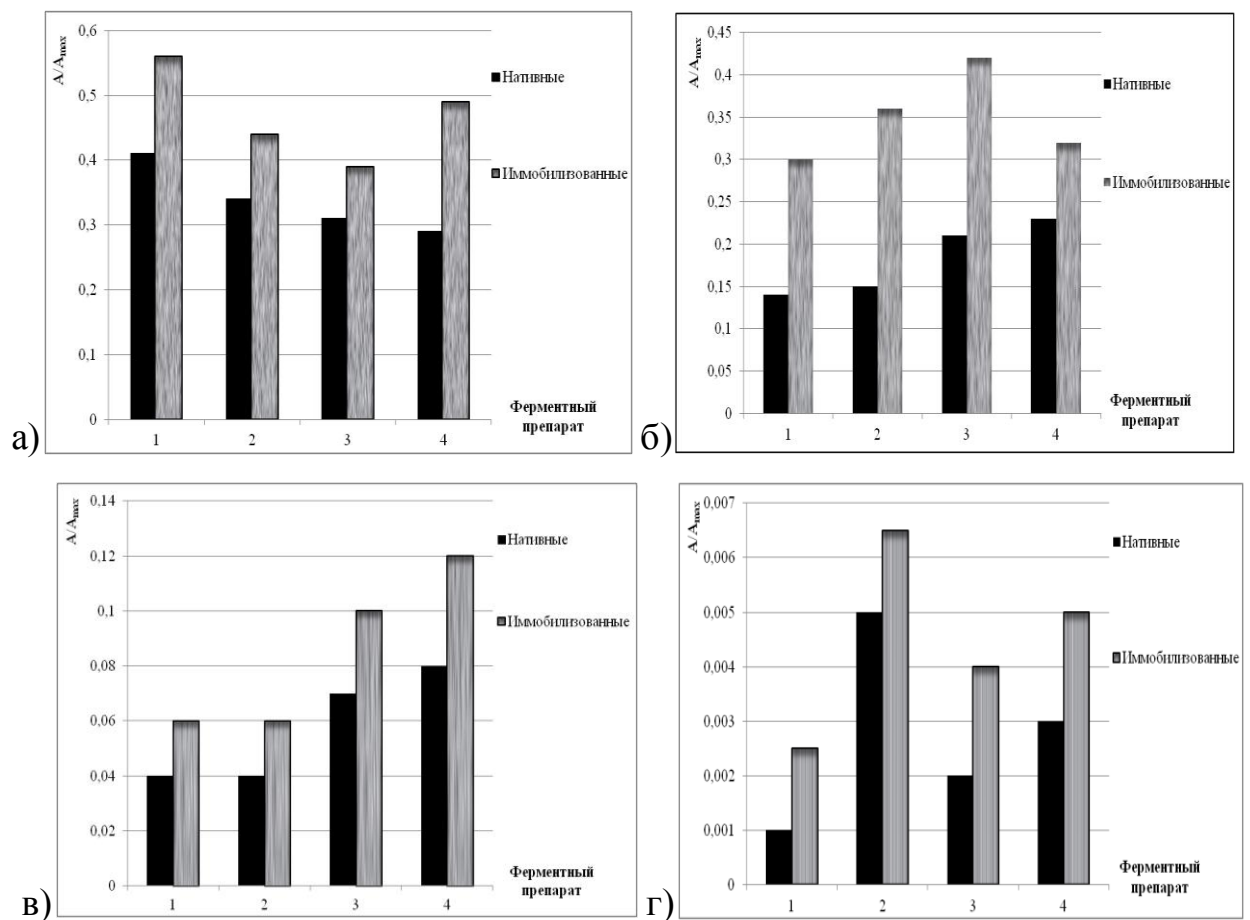


Рисунок 3.25 – Динамика изменения ферментативной активности иммобилизованных гидролаз на носителе целлюлоза-хитозан (1-трипсина, 2-ПК, 3-амилазы) и микрочастиц (4-липазы) при оптимальном значении pH в течение 72 часов в зависимости от термоинактивации при температурах: а) 25°C, б) 37°C, в) 45°C, г) 65°C



Таблица 3.14 – Значения эффективных констант скорости термоинактивации иммобилизованных форм гидролаз при различных температурах

Ферментный препарат	Значения константы инактивации $k_{ин}$ ( $\cdot 10^{-3}$ ) ( $c^{-1}$ ) при различных температурах, $^{\circ}C$				
	25 $^{\circ}C$	37 $^{\circ}C$	45 $^{\circ}C$	55 $^{\circ}C$	65 $^{\circ}C$
Целлюлоза-протеолитический комплекс	0,06±0,01	1,69±0,03 0,25±0,01	1,74±77,04 0,29±0,01	2,06±0,01	2,15±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-протеолитический комплекс	0,05±0,01	1,71±0,03 0,24±0,01	0,75±0,01 0,29±0,01	9,41±0,47	10,55±0,53
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	0,05±0,01	1,00±0,05 0,20±0,01	1,45±0,02 0,28±0,01	2,49±0,02 0,31±0,01	2,55±0,03
Целлюлоза-трипсин	0,05±0,01	0,42±0,02 0,08±0,01	0,94±0,05 0,14±0,01	10,89±0,54	11,55±0,58
Диальдегидцеллюлоза (2%)-трипсин	0,05±0,01	0,79±0,04 0,14±0,01	0,79±0,19 0,29±0,01	10,86±0,54	11,59±0,58
Целлюлоза-хитозан-трипсин	0,05±0,01	0,38±0,02 0,06±0,01	0,44±0,02 0,09±0,01	7,44±0,37	9,80±0,49
Целлюлоза-альгинат-трипсин	0,08±0,01	0,40±0,02 0,07±0,01	0,43±0,02 0,11±0,01	7,48±0,37	9,91±0,50
Микрочастицы трипсина	0,15±0,01	0,83±0,04 0,14±0,01	0,89±0,04 0,17±0,01	11,04±0,55	14,09±0,70
Целлюлоза-амилаза	0,11±0,01	0,13±0,01	0,19±0,01	0,14±0,002	0,25±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-амилаза	0,11±0,01	0,15±0,01	0,23±0,01	0,14±0,002	0,24±0,01
Целлюлоза-хитозан-амилаза	0,06±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01	0,06±0,01	0,20±0,01
Целлюлоза-альгинат-амилаза,	0,08±0,01	0,12±0,01	0,18±0,01	0,12±0,01	0,23±0,01
Микрочастицы амилазы	0,19±0,01	0,21±0,01	0,25±0,01	0,16±0,01	0,28±0,01
Целлюлоза-липаза	0,06±0,01	0,19±0,01	0,23±0,01	0,29±0,01	0,49±0,02
Диальдегидцеллюлоза (2%)-липаза	0,06±0,01	0,20±0,01	0,24±0,01	0,30±0,01	0,51±0,02
Целлюлоза-хитозан-липаза	0,06±0,01	0,15±0,01	0,17±0,01	0,26±0,01	0,44±0,02
Целлюлоза-альгинат-липаза	0,06±0,01	0,17±0,01	0,15±0,01	0,25±0,01	0,42±0,02
Микрочастицы липазы	0,04±0,01	0,05±0,01	0,12±0,01	0,19±0,01	0,35±0,02

При сопоставлении значений констант скорости термоинактивации нативных и иммобилизованных гидролаз можно сделать вывод о положительном влиянии иммобилизации ферментов на их стабильность при температуре, отличной от оптимальной. Наибольшее снижение  $k_{ин}$  наблюдается при термоинактивации иммобилизованных на

хитозансодержащей целлюлозе следующих гидролаз: трипсина (в 2 раза), протеолитического комплекса (в 3,5 раза), амилазы (в 1,8 раз) и микрочастиц липазы (в 3 раза) в сравнении с данными констант скорости инактивации аналогичных экспериментов с нативными формами гидролаз при оптимальных температурах для каждого ферментного препарата.

На следующем этапе работы анализировали функциональную стабильность иммобилизованных ферментных препаратов в процессе рН-инактивации. Эксперимент проводили, инкубируя препараты гидролаз в 0,067 М фосфатном буфере с необходимым значением рН (от 4,0 до 9,0 в зависимости от эксперимента) при оптимальной температуре, с отбором проб через определенные промежутки времени, в которых измеряли активность ферментных препаратов в оптимальных для каждого из них условиях. На рис. 3.26 приведены данные по рН-инактивации иммобилизованных форм гидролаз в сравнении с нативными в течение 4 часов.

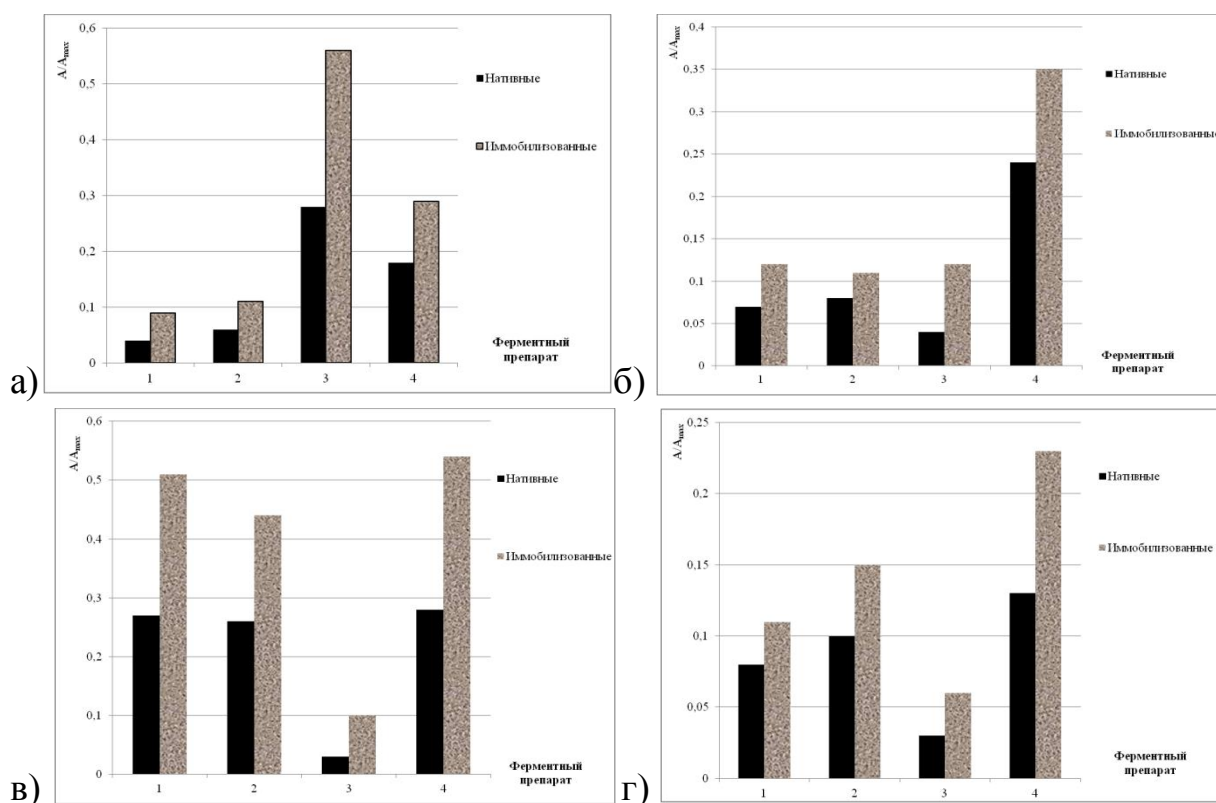


Рисунок 3.26—Динамика изменения ферментативной активности иммобилизованных гидролаз на носителе целлюлоза-хитозан (1-трипсина, 2-ПК, 3-амилазы) и микрочастиц (4-липазы) при оптимальной температуре в течение 4 часов в зависимости от рН-инактивации при значениях рН: а) 5,0; б) 7,0; в) 8,0; г) 9,0

В таблице 3.15 приведены результаты расчета констант инактивации иммобилизованных ферментных препаратов при различных значениях рН среды, рассчитанные вышеописанным способом.

Таблица 3.15 – Эффективные константы скорости рН-инактивации иммобилизованных форм гидролаз

Ферментный препарат	Значения константы инактивации $k_{ин}$ ( $\cdot 10^{-3}$ ) ( $c^{-1}$ ) при различных значениях рН			
	рН 5,0	рН 7,0	рН 8,0	рН 8,5
Целлюлоза-протеолитический комплекс	2,06±0,10	2,25±0,11	0,97±0,05	2,04±0,10
Диальдегидцеллюлоза (2%)-протеолитический комплекс	2,02±0,10	2,15±0,11	0,82±0,04	2,08±0,10
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	1,89±0,09	2,04 ±0,10	0,75±0,04	1,85±0,09
Целлюлоза-трипсин	2,93±0,15	2,46±0,12	0,72±0,04	2,16±0,11
Диальдегидцеллюлоза (2%)-трипсин	2,97±0,15	2,50±0,13	0,76±0,04	2,20±0,11
Целлюлоза-хитозан-трипсин	2,36±0,12	1,93±0,09	0,52±0,03	1,98±0,10
Целлюлоза-альгинат-трипсин	2,47±0,12	2,15±0,11	0,60±0,03	2,12±0,11
Микрочастицы трипсина	2,94±0,15	2,15±0,11	0,75±0,04	2,19±0,11
Целлюлоза-липаза	1,42±0,07	1,32±0,07	0,80±0,04	1,80±0,09
Диальдегидцеллюлоза (2%)-липаза	1,39±0,07	1,30±0,07	0,77±0,04	1,41±0,07
Целлюлоза-хитозан-липаза	1,17±0,06	1,21±0,06	0,74±0,04	1,18±0,06
Целлюлоза-альгинат-липаза	1,40±0,07	0,82±0,04	0,61±0,03	1,62±0,08
Микрочастицы липазы	1,10±0,05	1,03±0,05	0,39±0,02	1,04±0,05
Целлюлоза-амилаза	0,57±0,03	2,35±0,12	2,78±0,14	3,07±0,15
Диальдегидцеллюлоза (2%)-амилаза	0,53±0,03	2,34±0,12	2,59±0,13	3,06±0,15
Целлюлоза-хитозан-амилаза	0,30±0,01	1,83±0,09	2,42±0,12	2,74±0,14
Целлюлоза-альгинат-амилаза	0,38±0,01	2,16±0,11	2,46±0,12	2,86±0,14
Микрочастицы амилазы	0,49±0,02	2,30±0,12	2,60±0,13	2,92±0,15

Из полученных результатов видно, что при рН-инактивации иммобилизованных форм гидролаз потери активности ниже, чем нативных ферментов. Наибольшее снижение значений констант инактивации произошло в случае иммобилизованных на хитозансодержащей целлюлозе препаратов гидролаз: трипсина (в 1,5 раза), протеолитического комплекса (в 1,5 раза), амилазы (в 2 раза) и микрочастиц липазы (в 2 раза) при оптимальных для каждого ферментного препарата значениях рН.

Количественной мерой стабилизации при термо- и рН-инактивации служит величина эффекта стабилизации ( $\theta$ ) при данной температуре и рН (таблица 3.16), которая представляет собой отношение констант скорости инактивации нативного и модифицированного фермента.

Таблица 3.16 – Значения эффекта стабилизации ( $\theta$ ) различных форм гидролаз при оптимальной температуре и рН

Ферментный препарат	Термоинактивация	рН-инактивация
Целлюлоза-трипсин	0,96	0,91
ДАЦ-трипсин	0,92	0,88
Хитозан-трипсин	1,95	1,44
Альгинат-трипсин	1,90	1,40
<b>Целлюлоза-хитозан-трипсин</b>	<b>2,00</b>	<b>1,50</b>
Целлюлоза-альгинат-трипсин	1,90	1,42
Микрочастицы трипсина	1,50	1,32
Целлюлоза-ПК	1,10	1,20
ДАЦ-ПК	1,05	1,10
Хитозан-ПК	2,20	1,45
Альгинат-ПК	0,75	0,92
<b>Целлюлоза-хитозан-ПК</b>	<b>2,38</b>	<b>1,50</b>
Целлюлоза-амилаза	1,30	1,25
ДАЦ-амилаза	1,20	1,10
Хитозан-амилаза	2,20	1,95
Альгинат-амилаза	2,10	1,60
<b>Целлюлоза-хитозан-амилаза</b>	<b>2,33</b>	<b>1,97</b>
Целлюлоза-альгинат-амилаза	2,15	1,65
Микрочастицы амилазы	1,80	1,45
Целлюлоза-липаза	0,95	0,90
ДАЦ-липаза	0,85	0,75
Хитозан-липаза	2,95	1,65
Альгинат-липаза	2,50	1,40
Целлюлоза-хитозан-липаза	1,20	1,25
Целлюлоза-альгинат-липаза	1,10	1,30
<b>Микрочастицы липазы</b>	<b>3,80</b>	<b>2,03</b>

Значения  $\theta > 1$  означают, что стабилизация ферментов приводит к повышению их функциональной стабильности в процессах тепловой и рН-инактивациях. Наибольшее увеличение данного параметра наблюдается при иммобилизации протеаз и амилазы на носитель целлюлоза-хитозан, а также в случае микрочастиц липазы.

### 3.6. Влияние иммобилизации на стабильность гидролаз при хранении гидролаз

При изучении различных видов стабильности ферментного препарата важное значение имеет анализ их стабильности при хранении. Ферментные препараты хранили в течение длительного времени (24 месяца) при комнатной температуре, определяя через определенные промежутки времени остаточную ферментативную активность. На рисунке 3.27 представлены данные по сохранению ферментативной активности иммобилизованных форм гидролаз в течение 24 месяцев при комнатной температуре.

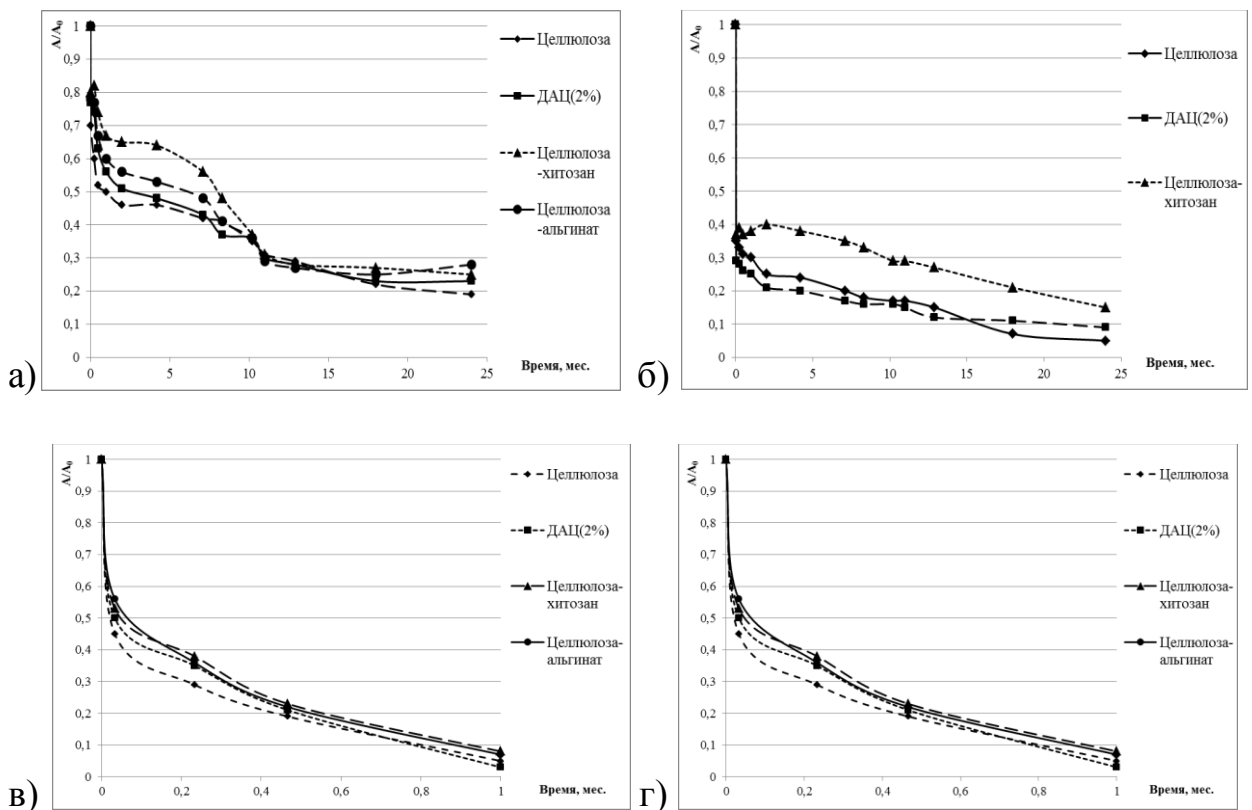


Рисунок 3.27 – Динамика изменения ферментативной активности иммобилизованных на целлюлозных матрицах гидролаз: а) трипсина, б) протеолитического комплекса, в) амилазы, г) липазы

С помощью полученных зависимостей были найдены кинетические параметры процесса инактивации при хранении иммобилизованных препаратов гидролаз. В таблице 3.17 представлены константы скорости инактивации иммобилизованных на целлюлозных носителях гидролитических ферментов при их хранении при комнатной температуре.

Таблица 3.17– Значения эффективных констант инактивации иммобилизованных на текстильные носители гидролаз в течение времени хранения

Ферментный препарат	Константа инактивации $k_{in}$ , ( $\cdot 10^{-3}$ ), $c^{-1}$
Целлюлоза-трипсин	0,90±0,04 0,14±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-трипсин	0,91±0,05 0,13±0,01
<b>Целлюлоза-хитозан-трипсин</b>	<b>0,67±0,03</b> <b>0,11±0,01</b>
Целлюлоза-альгинат-трипсин	0,75±0,04 0,14±0,01
Целлюлоза-протеолитический комплекс	1,56±0,08 0,15±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)- протеолитический комплекс	1,53±0,08 0,15±0,01
<b>Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс</b>	<b>0,98±0,07</b> <b>0,09±0,01</b>
Целлюлоза-амилаза	0,19±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-амилаза	0,20±0,01
<b>Целлюлоза-хитозан-амилаза</b>	<b>0,11±0,01</b>
Целлюлоза-альгинат-амилаза	0,12±0,01
Целлюлоза-липаза	0,20±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-липаза	0,21±0,01
Целлюлоза-хитозан-липаза	0,19±0,01
Целлюлоза-альгинат-липаза	0,19±0,01

Из представленных данных видно, что иммобилизация гидролаз на текстильные носители способствует повышению стабильности при хранении для исследуемых ферментных препаратов в течение длительного времени (24 месяцев). При этом наибольшее сохранение активности иммобилизованного препарата амилазы на хитозансодержащей целлюлозе достигает 52%, для аналогичных препаратов трипсина и ПК – 28% и 15% соответственно. Иммобилизация липазы на целлюлозные носители не позволяет сохранять активность фермента в течение такого же длительного времени (после месяца хранения препаратов остаточная активность составляет 3-8%).

На рисунке 3.28 представлены данные по изменению ферментативной активности иммобилизованных путем микрокапсулирования гидролаз при хранении в течение 96 часов при комнатной температуре.

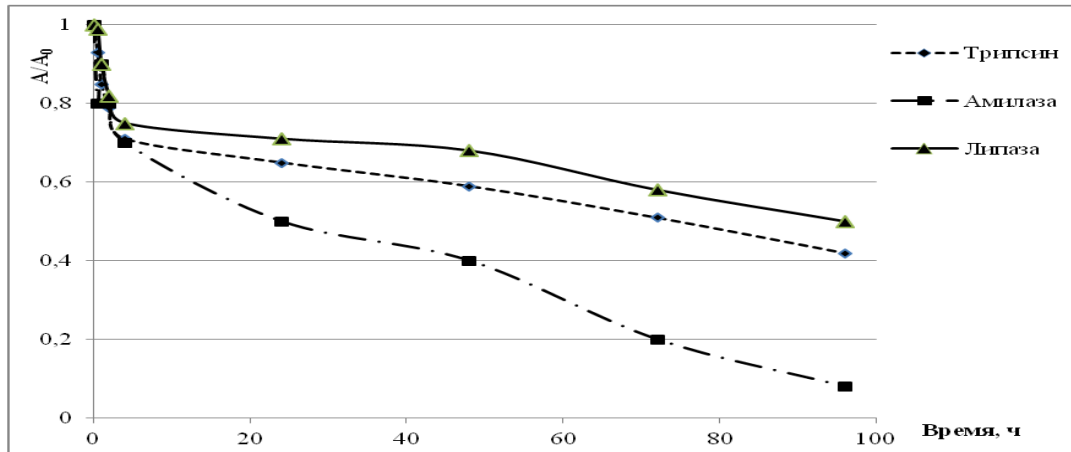


Рисунок 3.28 – Динамика изменения ферментативной активности иммобилизованных методом микрокапсулирования гидролаз при хранении при комнатной температуре.

Аналогично ранее описанному были определены эффективные константы инактивации гидролаз, иммобилизованных методом микрокапсулирования, представленные в таблице 3.18.

Таблица 3.18 - Значения констант скорости инактивации иммобилизованных методом микрокапсулирования гидролаз

Фермент	Константа инактивации, $k_{in}$ , ( $\cdot 10^{-3}$ ), $c^{-1}$
Трипсин	0,10±0,01
Амилаза	0,08±0,01
<b>Липаза</b>	<b>0,09±0,01</b>

Из данных таблицы видно, что в сравнении с нативными формами гидролаз, степень сохранения активности в течение 96 часов в случае микрочастиц липазы достигает 50% (в 2 раза больше, чем для нативной липазы). Степень сохранения активности в течение 96 часов для микрочастиц трипсина и амилазы составляет 41% (в 1,2 раза больше, чем для нативного трипсина) и 8% (в 1,5 раза больше, чем для нативной амилазы), соответственно.

### 3.7. Влияние иммобилизации на конформационную стабильность гидролаз

Важной характеристикой любого ферментного препарата является его конформационная стабильность, т.е. способность сохранять свою конформацию в условиях внешнего воздействия. В качестве термодинамических параметров для иммобилизованных форм ферментов также, как и для нативных, были рассчитаны значения энергии активации и предэкспоненциального множителя. Соответствующие результаты представлены на рисунке 3.29 (на примере иммобилизованной амилазы) и в таблице 3.19.

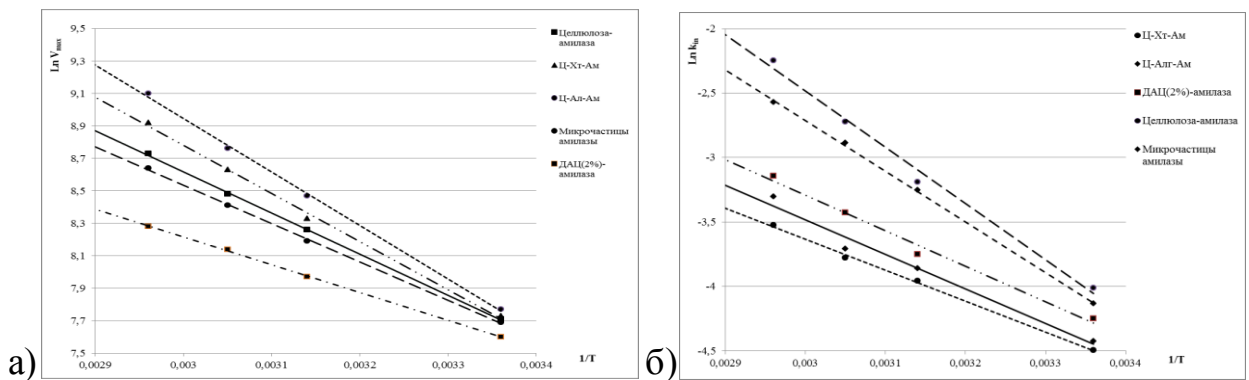


Рисунок 3.29 – График в координатах Аррениуса для иммобилизованных форм амилазы а)  $V_{\max}$ ; б)  $k_{in}$

Таблица 3.19 – Значения энергии активации и предэкспоненциального множителя уравнения Аррениуса для иммобилизованных гидролаз в оптимальных условиях

Форма ферментного препарата	$V_{\max}$		$k_{in}$	
	$E_a$ , кДж/моль	$A_0, (\cdot 10^3)$ , моль/(дм <sup>3</sup> ·с)	$E_a$ , кДж/моль	$A_0, (\cdot 10^3)$ , моль/(дм <sup>3</sup> ·с)
1	2	3	4	5
Целлюлоза-трипсин	56,61±2,83	0,06±0,01	31,20±1,56	0,03±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-трипсин	57,26±2,86	0,07±0,01	30,45±1,52	0,03±0,01
Целлюлоза-хитозан-трипсин	60,14±3,01	0,08±0,01	20,20±1,01	0,02±0,01
Целлюлоза-альгинат-трипсин	59,66±2,98	0,08±0,01	22,52±1,13	0,02±0,01
Микрочастицы трипсина	51,16±2,56	0,07±0,01	19,55±0,98	0,02±0,01
Целлюлоза-протеолитический комплекс	30,07±1,50	0,05±0,01	32,80±1,64	0,03±0,01



1	2	3	4	5
Диальдегидцеллюлоза (2%)- протеолитический комплекс	29,25±1,46	0,05±0,01	25,45±1,27	0,03±0,01
Целлюлоза-хитозан- протелитический комплекс	59,05±2,95	0,08±0,01	12,10±0,61	0,02±0,01
Целлюлоза-амилаза	18,05±0,90	0,05±0,01	35,22±1,76	0,03±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)- амилаза	18,02±0,89	0,05±0,01	32,02±1,60	0,03±0,01
Целлюлоза-хитозан –амилаза	24,21±2,15	0,06±0,01	23,27±2,18	0,03±0,01
Целлюлоза-альгинат –амилаза	19,05±0,95	0,05±0,01	27,21±1,36	0,03±0,01
Микрочастицы амилазы	18,69±0,93	0,05±0,01	29,98±1,50	0,03±0,01
Целлюлоза-липаза	48,69±0,93	0,05±0,01	37,11±1,85	0,03±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)- липаза	47,69±0,93	0,05±0,01	32,26±1,36	0,03±0,01
Целлюлоза-хитозан-липаза	49,69±0,93	0,05±0,01	29,45±1,61	0,03±0,01
Целлюлоза-альгинат-липаза	18,69±0,93	0,05±0,01	28,41±1,42	0,03±0,01
Микрочастицы липазы	57,60±2,38	0,06±0,01	21,45±1,07	0,02±0,01

Аналогично предыдущему эксперименту были получены зависимости максимальной скорости реакции и константы инактивации в зависимости от рН ферментативного гидролиза. Значения параметров уравнения кислотно-основного катализа приведены в таблице 3.20.

Таблица 3.20 – Значения  $K_a$  и  $k_0$  для иммобилизованных гидролаз уравнения кислотно-основного катализа Таблицу переделать по аналогии с энергиями активации

Ферментный препарат	$V_{max}$		$k_{in}$	
	$K_a, (\cdot 10^{-3}),$ дм <sup>3</sup> /моль	$k_0, (\cdot 10^3),$ моль/(дм <sup>3</sup> ·с)	$K_a, (\cdot 10^{-3}),$ дм <sup>3</sup> /моль	$k_0, (\cdot 10^3),$ моль/(дм <sup>3</sup> ·с)
Целлюлоза-трипсин	24,61±1,23	0,72±0,04	28,05±1,40	0,02±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-трипсин	25,05±1,25	0,76±0,04	29,08±1,45	0,02±0,01
Целлюлоза-хитозан-трипсин	33,62±1,68	1,16±0,06	23,48±1,17	0,02±0,01
Целлюлоза-альгинат-трипсин	30,32±1,52	1,01±0,05	25,22±1,26	0,02±0,01
Микрочастицы трипсина	24,33±1,22	0,68±0,03	27,26±1,36	0,02±0,01
Целлюлоза-протеолитический комплекс	39,12±1,96	0,08±0,01	24,13±1,21	0,02±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-протеолитический комплекс	36,67±1,83	0,07±0,01	23,86±1,19	0,02±0,01
Целлюлоза-хитозан-протелитический комплекс	43,62±2,18	0,08±0,01	19,56±0,98	0,02±0,01
Целлюлоза-амилаза	12,68±0,63	113,70±5,68	41,08±2,05	0,04±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-амилаза	11,60±0,58	113,17±5,66	40,13±2,06	0,03±0,01
Целлюлоза-хитозан –амилаза	13,62±0,68	120,33±6,02	31,68±1,58	0,02±0,01
Целлюлоза-альгинат –амилаза	13,02±0,65	115,83±5,79	34,50±1,72	0,03±0,01
Микрочастицы амилазы	12,62±0,63	110,83±5,54	38,52±1,93	0,04±0,01
Целлюлоза-липаза	35,50±1,78	0,03±0,01	65,01±2,79	0,04±0,01
Диальдегидцеллюлоза (2%)-липаза	34,71±1,74	0,02±0,01	63,82±3,19	0,04±0,01
Целлюлоза-хитозан-липаза	39,57±1,99	0,03±0,01	60,12±3,01	0,03±0,01
Целлюлоза-альгинат-липаза	41,86±2,09	0,03±0,01	59,66±2,98	0,03±0,01
Микрочастицы липазы	48,56±2,43	0,04±0,01	55,91±2,79	0,02±0,01

На рисунке 3.29 и в таблице 3.21 представлена обработка экспериментальных данных и результаты расчета значений термодинамических параметров процесса термоинактивации (диапазон температур 25-55°C) различных иммобилизованных гидролаз при оптимальном значении рН. На рисунке 3.30 приведены зависимости для протеаз и амилазы, иммобилизованных на носителе целлюлоза-хитозан, и для

микрочастиц липазы. Аналогичные зависимости были получены для всех иммобилизованных форм гидролаз.

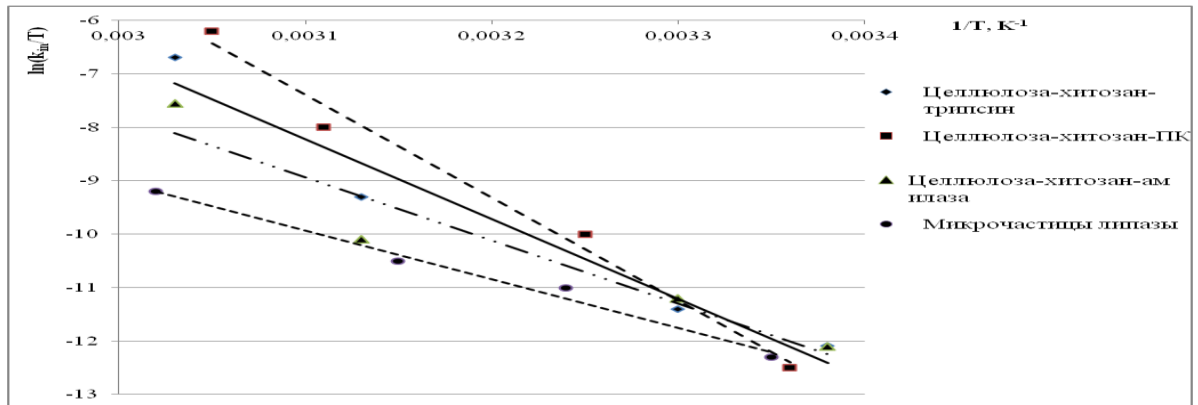


Рисунок 3.30 – Зависимость константы скорости инактивации иммобилизованных гидролаз от температуры в координатах  $(\ln(k_{in}/T) - 1/T)$

Таблица 3.21 - Значения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакции термоинактивации иммобилизованных гидролаз

Ферментный препарат	$\Delta G_i$ , кДж/моль	$\Delta H_i$ , кДж/моль	$\Delta S_i$ , Дж/К·моль
Целлюлоза-трипсин	106,4±5,3	16,4±0,8	-(290,3±14,5)
Диальдегидцеллюлоза (2%)-трипсин	108,3±5,4	16,3±0,8	-(296,8±14,8)
Целлюлоза-хитозан-трипсин	100,2±5,0	17,6±0,9	-(266,5±13,3)
Целлюлоза-альгинат-трипсин	110,3±5,5	17,2±0,9	-(300,3±15,0)
Микрочастицы трипсина	112,2±5,6	17,0±0,9	-(307,1±15,3)
Целлюлоза-протеолитический комплекс	118,3±5,9	17,3±0,9	-(325,8±16,3)
Диальдегидцеллюлоза (2%)-протеолитический комплекс	116,6±5,8	17,1±0,9	-(321,0±16,1)
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	110,8±5,5	19,3±0,9	-(295,2±14,8)
Целлюлоза-амилаза	97,3±4,8	13,5±0,7	-(255,5±12,8)
Диальдегидцеллюлоза(2%)-амилаза	100,1±5,0	13,4±0,7	-(264,3±13,2)
Целлюлоза-хитозан-амилаза	95,1±4,2	14,9±0,7	-(244,5±12,5)
Целлюлоза-альгинат-амилаза	99,4±4,9	14,7±0,7	-(258,2±12,9)
Микрочастицы амилазы	99,6±4,9	14,2±0,7	-(260,3±13,0)
Целлюлоза-липаза	128,0 ±5,9	11,0±0,6	-(345,2±17,3)
Целлюлоза-хитозан-липаза	127,8 ±5,9	10,0±0,6	-(347,7±17,4)
Целлюлоза-альгинат-липаза	128,1 ±5,9	10,9±0,6	-(345,8±17,3)
Микрочастицы липазы	124,1 ±6,2	11,1±0,6	-(364,5±18,2)

Из сравнения полученных значений термодинамических характеристик для нативных и иммобилизованных форм гидролаз следует, что иммобилизация гидролаз приводит к повышению их конформационной стабильности в сравнении с их нативными формами. Из литературы известно, что увеличение конформационной стабильности сопровождается понижением величины энергии Гиббса. Наибольшее снижение значений энергии Гиббса наблюдается в случае препаратов трипсина (на 14,0%), ПК (на 8,7%), амилазы (на 6,0%), иммобилизованных на хитозансодержащей целлюлозе, а также для микрочастиц липазы (на 5,3%). Процесс термоинактивации сопровождается увеличением энтальпии и энтропии процесса. Наибольшее повышение данных параметров наблюдается в случае протеаз (трипсина и ПК) и амилазы, иммобилизованных на носителе целлюлоза-хитозан (на 12%), а также для микрочастиц липазы (на 11%).

### **3.8. Влияние иммобилизации на твердые носители на стабильность и устойчивость гидролаз**

В результате проведенных исследований было установлено, что иммобилизация ферментов во всех случаях приводит к повышению функциональной, операционной стабильности ферментов, а также повышает их стабильность при хранении. На заключительном этапе анализа устойчивости и стабильности иммобилизованных препаратов гидролаз было проведено сравнение кинетических и термодинамических параметров. Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 3.22. Таким образом, наилучшими носителями для иммобилизации протеаз и амилазы служит целлюлоза-хитозан, для иммобилизации липазы – хитозан-альгинатные микрочастицы. Было установлено, что иммобилизация на полисахаридные носители повышает операционную, функциональную и конформационную стабильность гидролаз, а также стабильность при хранении. Наблюдаемые закономерности позволяют рекомендовать иммобилизованные на полисахариды гидролазы для практического использования.

Таблица 3.22 - Сравнение наиболее эффективных иммобилизованных препаратов гидролаз с соответствующей нативной формой по кинетическим и термодинамическим параметрам

Ферментный препарат	$k_{in} (\cdot 10^{-3}) \text{ с}^{-1}$ (термоинактивация)	$k_{in} (\cdot 10^{-3}) \text{ с}^{-1}$ (рН-инактивация)	$K_m, \text{ г/дм}^3$	$V_{max} (\cdot 10^3),$ (моль/дм <sup>3</sup> ·с)	$E_a,$ кДж/моль	$K_a, (\cdot 10^{-3}),$ дм <sup>3</sup> /моль	$\Delta G_i,$ кДж/моль	$\Theta$	Время хранения при $A_{50\%}$
Нативные ферменты									
Протеолитический комплекс	1,30±0,07 0,24±0,02	1,12±0,06	0,76±0,04	0,07±0,01	26,57±1,33	32,15±1,61	121,3±6,1	1,00	57 ч.
Трипсин	0,76±0,04 0,11±0,01	0,78±0,04	2,12±0,11	0,94±0,05	34,20±1,71	22,45±1,12	116,4±5,8	1,00	60,5 ч.
Амилаза	0,14±0,01	0,59 ±0,03	1,78±0,09	57,42±2,87	17,16±1,38	12,15±1,18	101,2±7,1	1,00	18,5 ч.
Липаза	0,19±0,01	0,79±0,04	4,00±0,20	0,07±0,01	33,67±1,68	39,22±1,96	117,9±5,9	1,00	39,5 ч.
Наиболее эффективные иммобилизованные препараты									
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	1,00±0,05 0,20±0,01	0,75±0,04	0,95±0,05	0,10±0,01	59,05±2,95	39,12±1,96	110,8±5,5	2,38	0,25 мес.
Целлюлоза-хитозан-трипсин	0,38±0,02 0,06±0,01	0,52±0,03	2,33±0,12	1,85±0,09	60,15±3,01	33,62±1,68	100,2±5,0	2,00	7,5 мес.
Целлюлоза-хитозан-амилаза	0,12±0,01	0,30±0,01	1,90±0,09	109,77±5,48	24,21±2,15	13,62±0,68	95,1±4,2	2,33	72 ч.
Микрочастицы липаза	0,05±0,01	0,39±0,02	4,76±0,24	0,08±0,01	57,60±2,38	48,56±2,43	124,1±6,2	3,80	96 ч.

### **3.9. Практическое применение препаратов иммобилизованных гидролаз**

Анализ литературных данных [21,22,33,36,47] показывает, что гидролитические ферменты имеют важное практическое значение. Среди возможных аспектов их применения были выбраны следующие:

- получение современных раневых покрытий и перевязочных материалов на основе протеолитических ферментов;
- гидролиз ячменного солода амилазой, который широко применяется в пивоварении;
- гидролиз жиросодержащих отходов мясоперерабатывающей промышленности панкреатической липазой в производстве биодизеля, для утилизации отработанных масел в пищевой промышленности, в производстве лекарственных препаратов.

В качестве биокатализаторов были выбраны иммобилизованные формы ферментных препаратов, которые по результатам предыдущих исследований оказались наиболее эффективными: трипсин, ПК, грибная амилаза, иммобилизованные на хитозансодержащей целлюлозе; липаза, иммобилизованная методом микрокапсулирования в хитозан-альгинатные микрочастицы.

#### ***3.9.1. Применение протеолитических ферментов для приготовления современных перевязочных материалов***

Проблема ожоговых ран остается актуальной уже долгое время, несмотря на значительные успехи исследований в этой сфере. В лечении ран различной этиологии раневые покрытия сохраняют приоритетное значение, что обусловлено доступностью и простотой их применения в различных условиях. По мнению ряда авторов [19-24], эффективное раневое покрытие должно отвечать нескольким требованиям: быть нетравматичным, обладать пролонгированным и комплексным лечебным действием. Также раневое покрытие должно сохранять активность в течение относительно длительного срока хранения. В связи с этим представляется актуальным создание

высокоэффективных раневых покрытий и исследование их свойств. В нашей работе в качестве раневых покрытий были получены иммобилизованные на хитозансодержащей целлюлозе протеазы (трипсин и протеолитический комплекс) в описанных выше условиях.

На первом этапе была исследована пролонгированность действия данных препаратов. Для этого исследовали динамику выделения фермента и полисахарида во внешнюю среду в фосфатном буфере рН 6,2 (данное значение рН соответствует раневой среде) в течение 72 часов. На рисунке 3.31 представлено изменение ферментативной активности в фосфатных буферных растворах рН 6,2 при выдерживании в них исследуемых образцов иммобилизованных ферментных препаратов. За  $A_0$  принята активность нативного фермента в начальный момент времени.

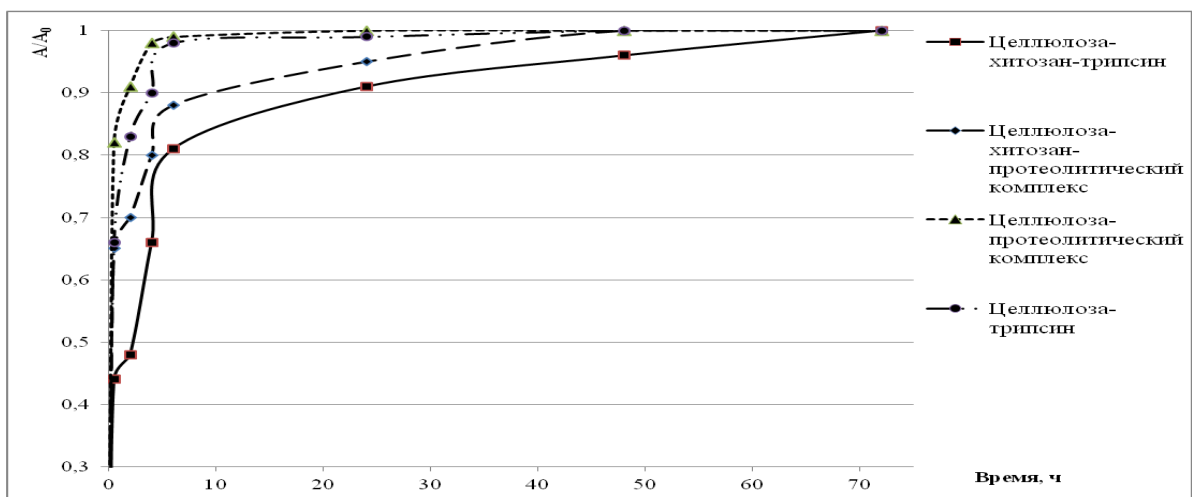


Рисунок 3.31 - Изменение ферментативной активности в 0,067 М буферных растворах (рН 6,2) при выдерживании в них иммобилизованных образцов трипсина и протеолитического комплекса в течение 72 часов

Из рисунка 3.31 видно, что при инкубации иммобилизованного ферментного препарата в буферном растворе наблюдается увеличение ферментативной активности, которое можно объяснить следующим образом. Ферментный препарат начинает высвобождаться сразу же после помещения раневого покрытия в буферный раствор, поскольку некоторое количество ферментного препарата после сушки механически фиксируется на

поверхности носителя, и сразу переходит во внешнюю среду при наложении покрытия на рану. В первые 15 минут выдерживания всех образцов в буферный раствор переходят молекулы фермента, которые после сушки удерживались на носителе посредством ионных и водородных сил, что составляет 45% для препарата целлюлоза-хитозан-трипсин и 78% для препарата целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс. Далее происходит постепенное высвобождение ковалентно связанного с целлюлозной матрицей (за счет образования азометиновой связи) и хитозаном (за счет взаимодействия положительно заряженных аминогрупп хитозана и отрицательно заряженных карбоксильных групп фермента) ферментного комплекса. В случае иммобилизованных протеаз на целлюлозе (без хитозана) не наблюдается подобного пролонгированного эффекта высвобождения ферментного препарата в модельную раневую среду. В первые 15 минут происходит выделение более 90% фермента. Это можно объяснить тем, что фермент, нестабилизированный хитозаном, слабее удерживается на носителе и сильнее подвержен гидролитической деструкции, чем стабилизированный препарат. Для подтверждения данного факта были найдены константы высвобождения ферментного препарата для каждого из исследуемых образцов (рисунок 3.32, таблица 3.23).

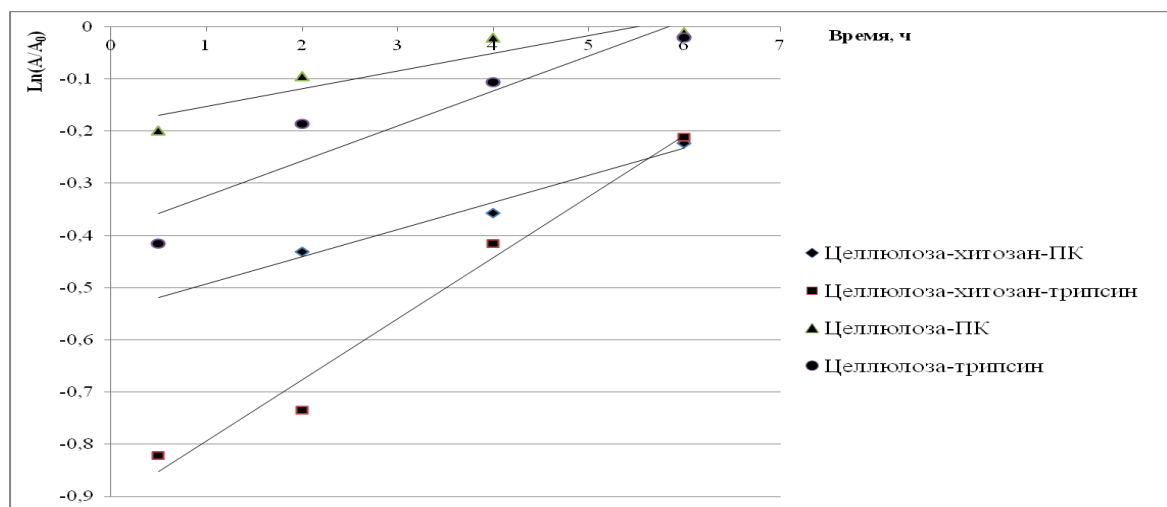


Рисунок 3.32- Зависимость изменения относительной ферментативной активности модельного буферного раствора pH 6,2 в течение времени высвобождения ФП в полулогарифмических координатах



Таблица 3.23– Значения констант высвобождения ферментного препарата в модельный буферный раствор рН 6,2

Ферментный препарат	Константа высвобождения $k$ , ( $\cdot 10^{-3}$ ), $c^{-1}$
Целлюлоза-трипсин	0,117±0,005
Целлюлоза-хитозан-трипсин	0,067±0,003
Целлюлоза-протеолитический комплекс	0,052±0,003
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	0,034±0,002

Из полученных данных видно, что константы высвобождения ферментного препарата в модельный буферный раствор рН 6,2 для нестабилизированных хитозаном иммобилизованных форм протеаз значительно выше (в 1,7 раза для препарата трипсина и в 1,5 раза для препарата ПК), чем для ферментных препаратов, в составе которых присутствует хитозан. Следовательно, эти данные свидетельствуют о более пролонгированном эффекте действия последних при использовании их в качестве раневых покрытий.

В ряде литературных источников [12,13,18,20], посвященных изучению факторов ускорения процессов ранозаживления при помощи текстильных ферментосодержащих материалов, уделяется значительное внимание атравматичности данных препаратов (сохранение смачивающего раствора при наложении повязки на рану). Эта характеристика является одним из основополагающих критериев, которым должен отвечать иммобилизованный препарат на целлюлозной основе. Высыхание такого препарата ведет не только к повреждению или травмированию раневой поверхности, но и к инактивации ферментов в нем [244].

Для создания наиболее оптимальной среды для заживления ран часто используется глицерин в качестве смягчающего компонента.

Известно, что ферменты имеют довольно лабильную структуру и проявляют наибольшую активность лишь в узком диапазоне изменения факторов внешней среды. Добавление органического растворителя, такого как глицерин, в иммобилизованную ферментативную систему, может снизить операционную стабильность и активность иммобилизованного

препарата в сравнении с нативным ферментом. Использование в качестве композиционного материала полисахаридов (хитозана) позволяет защитить ферменты от инактивирующего действия глицерина. Необходимо было проверить, как глицерин влияет на ферментативную активность протеаз, входящих в иммобилизованные препараты.

Известно, что гидратация является одним из основных факторов, влияющих на фолдинг белков и проявление их функциональной активности. Низкомолекулярные органические соединения могут выступать как регуляторы активности ферментов, при этом возможно, как непосредственное влияние органических соединений на белок через межмолекулярные контакты, так и их опосредованное действие через изменение структуры гидратной оболочки.

Как известно [243], денатурация белка в водно-органических смесях обусловлена разрушением гидратной оболочки молекулы белка вследствие конкурентного вытеснения входящих в ее состав молекул воды на молекулы органического растворителя. Следовательно, можно предположить, что увеличения операционной стабильности фермента при денатурирующем воздействии органического растворителя можно добиться, если увеличить прочность связывания гидратной оболочки белка с его поверхностью. В свою очередь, способность поверхности удерживать гидратную оболочку тем выше, чем более гидрофильной она является. Таким образом, гидрофилизация поверхности белка должна приводить к росту его стабильности к денатурации в водно-органических смесях.

Для определения влияния глицерина на сохранение ферментативной активности иммобилизованных протеаз органический растворитель (содержание основного компонента 100%) сначала смешивали с раствором 0,067 М фосфатного буфера необходимого значения рН в определенном соотношении. К заданному объему раствора нативного ферментного препарата или навеске иммобилизованного препарата добавляли полученный раствор глицерина в фосфатном буфере и выдерживали 10 минут при

заданной температуре. Затем определяли остаточную ферментативную активность образцов. За 100% принимали значение ферментативной активности в отсутствии глицерина. В качестве субстрата в реакции с трипсином был взят казеин, в реакции с протеолитическим комплексом – азоколл. На рисунках 3.33, 3.34 представлено влияние концентрации глицерина на ферментативную активность гидролаз.

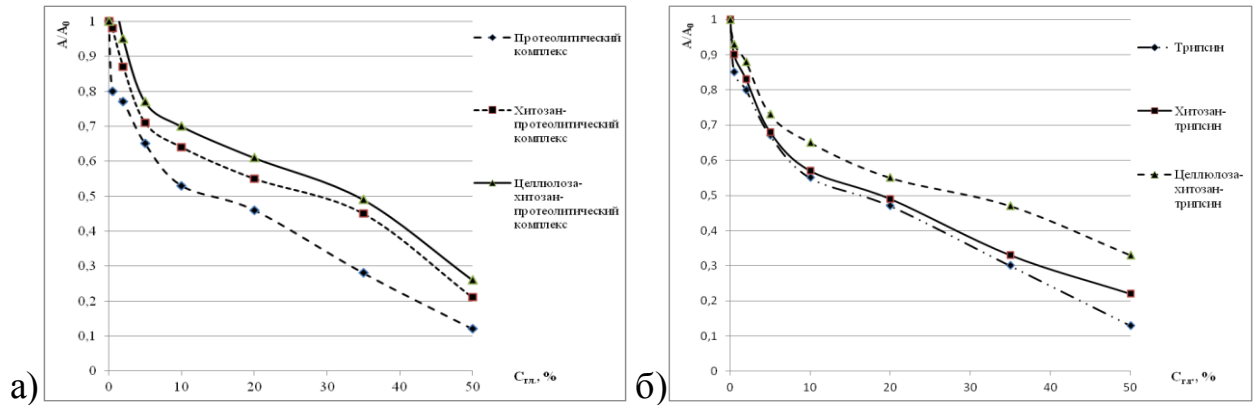


Рисунок 3.33– Влияние концентрации глицерина на остаточную ферментативную активность протеаз: а) ПК; б) трипсина.

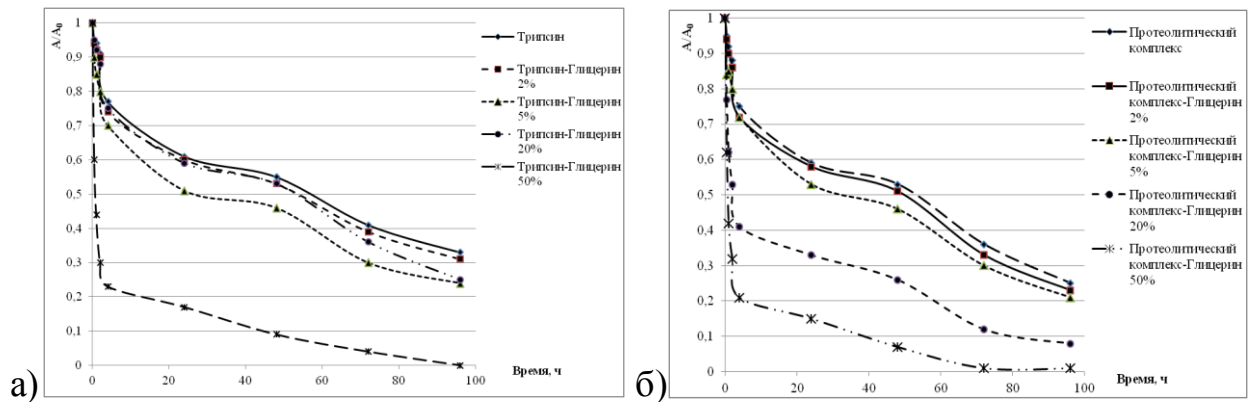


Рисунок 3.34– Влияние концентрации глицерина на остаточную ферментативную активность в процессе хранения препаратов гидролаз в оптимальных условиях (37°C, pH 8,0):

а) трипсина; б) ПК

В таблице 3.24 приведены соответствующие значения констант скорости инактивации в процессе хранения и значения времени хранения при  $A_{50\%}$  для различных форм ферментов при разных концентрациях глицерина.

Таблица 3.24- Влияние концентрации глицерина на константу инактивации препаратов протеаз и время их хранения при  $A_{50\%}$ 

Препарат	Константа инактивации $k_{in}, (\cdot 10^{-3}), c^{-1}$	Время хранения при $A_{50\%}$
1	2	3
Трипсин	0,78±0,04 0,11±0,01	60,5 ч
Трипсин-Глицерин 2%	0,80±0,04 0,13±0,01	59,2 ч
Трипсин-Глицерин 5%	0,82±0,04 0,19±0,01	24,3 ч
Трипсин-Глицерин 10%	0,98±0,04 0,20±0,01	7,2 ч
Трипсин-Глицерин 20%	1,38±0,04 0,22±0,01	1,5 ч
Трипсин-Глицерин 35%	2,78±0,14 0,36±0,02	0,5 ч
Трипсин-Глицерин 50%	3,12±0,16 0,41±0,02	0,2 ч
Хитозан-Трипсин-Глицерин 2%	0,79±0,04 0,12±0,01	59,6 ч
Хитозан-Трипсин-Глицерин 5%	0,80±0,04 0,13±0,01	26,1 ч
Хитозан-Трипсин-Глицерин 10%	0,81±0,04 0,15±0,01	15,3 ч
Хитозан-Трипсин-Глицерин 20%	0,88±0,05 0,19±0,01	5,2 ч
Хитозан-Трипсин-Глицерин 35%	2,18±0,11 0,26±0,01	2,5 ч
Хитозан-Трипсин-Глицерин 50%	3,00±0,15 0,38±0,02	1,1 ч
Целлюлоза-Хитозан-Трипсин-Глицерин 2%	0,69±0,02 0,06±0,01	7,1 мес
Целлюлоза-Хитозан-Трипсин-Глицерин 5%	0,73±0,02 0,08±0,01	7,1 мес
Целлюлоза-Хитозан-Трипсин-Глицерин 10%	0,88±0,02 0,09±0,01	4,1 мес
Целлюлоза-Хитозан-Трипсин-Глицерин 20%	0,98±0,02 0,12 ±0,01	2,3 мес
Целлюлоза-Хитозан-Трипсин-Глицерин 35%	1,38±0,02 0,22±0,01	81,2 ч
Целлюлоза-Хитозан-Трипсин-Глицерин 50%	3,11±0,16 0,40±0,01	48,7 ч
Протеолитический комплекс	1,15±0,05 0,21±0,02	57,0 ч
Протеолитический комплекс -Глицерин 2%	1,22±0,06 0,28±0,01	53,0 ч
Протеолитический комплекс -Глицерин 5%	1,35±0,07 0,31±0,01	35,1 ч
Протеолитический комплекс -Глицерин 10%	2,05±0,11 0,36±0,02	20,5 ч

1	2	3
Протеолитический комплекс -Глицерин 20%	2,30±0,05 0,41±0,02	2,1 ч
Протеолитический комплекс -Глицерин 35%	2,85±0,14 0,52±0,02	1,5 ч
Протеолитический комплекс -Глицерин 50%	3,35±0,05 0,61±0,02	0,5 ч
Хитозан- Протеолитический комплекс-Глицерин 2%	1,20±0,05 0,24±0,02	55,2 ч
Хитозан- Протеолитический комплекс -Глицерин 5%	1,27±0,05 0,23±0,02	36,6 ч
Хитозан- Протеолитический комплекс -Глицерин 10%	1,85±0,09 0,27±0,02	25,2 ч
Хитозан- Протеолитический комплекс -Глицерин 20%	2,16±0,11 0,38±0,02	3,1 ч
Хитозан- Протеолитический комплекс -Глицерин 35%	2,54±0,13 0,46±0,02	0,8 ч
Хитозан- Протеолитический комплекс -Глицерин 50%	3,02±0,15 0,51±0,02	0,5 ч
Целлюлоза-Хитозан-Протеолитический комплекс- Глицерин 2%	0,98±0,04 0,11±0,01	0,24 мес
Целлюлоза-Хитозан-Протеолитический комплекс- Глицерин 5%	1,02±0,05 0,13±0,01	0,24 мес
Целлюлоза-Хитозан-Протеолитический комплекс- Глицерин 10%	1,25±0,05 0,15±0,01	0,20 мес
Целлюлоза-Хитозан-Протеолитический комплекс- Глицерин 20%	1,42±0,08 0,21±0,01	57,6 ч
Целлюлоза-Хитозан-Протеолитический комплекс- Глицерин 35%	2,02±0,11 0,30±0,01	48,0 ч
Целлюлоза-Хитозан-Протеолитический комплекс- Глицерин 50%	2,46±0,12 0,40±0,02	31,0 ч

Как видно из полученных данных, иммобилизованные препараты протеаз более стабильны при воздействии глицерина в сравнении с нативными. При этом остаточная активность иммобилизованных препаратов примерно в 2 раза выше, чем для нативных ферментов. Это свидетельствует о том, что носитель целлюлоза-хитозан стабилизирует трипсин и протеолитический комплекс и защищает от денатурирующего действия глицерина. Однако глицерин оказывает влияние и на сохранение активности иммобилизованных форм протеаз. Чем выше процентное содержание глицерина в пробе, тем меньше устойчивость препарата. Оптимальная

концентрация глицерина, при которой потери ферментативной активности минимальны, составляет 2-5%. Согласно литературным данным, наилучшей концентрацией глицерина в иммобилизованном препарате, которая наилучшим образом обеспечивает атравматичность препарата в условиях наложения его на рану, составляет 5%. Таким образом, проведенные исследования показывают, что предложенный способ иммобилизации позволяет создать атравматичные перевязочные материалы.

В клинической практике для ускорения заживления гнойно-некротических и язвенных ран в соответствующие препараты добавляют препарат аскорутин, в состав которого входят витамины С и Р.

Витамин С, или L-аскорбиновая кислота, является биологически активным веществом, необходимым для правильного функционирования костной и соединительной ткани. Известно, что витамин С используется в косметологии для снижения скорости процессов старения, для ускорения восстановления и заживления тканей. В медицине витамин С применяется как антиоксидант, который участвует в окислительно-восстановительных реакциях в организме. Известно, что благодаря присутствию витамина С аскорутин нормализует состояние стенок капилляров, повышает их эластичность и прочность.

На первом этапе были подобраны концентрации витамина С и аскорутина, при которых потери ферментативной активности нативных ферментов минимальны (трипсина и протеолитического комплекса (рисунок 3.35, таблица 3.25).

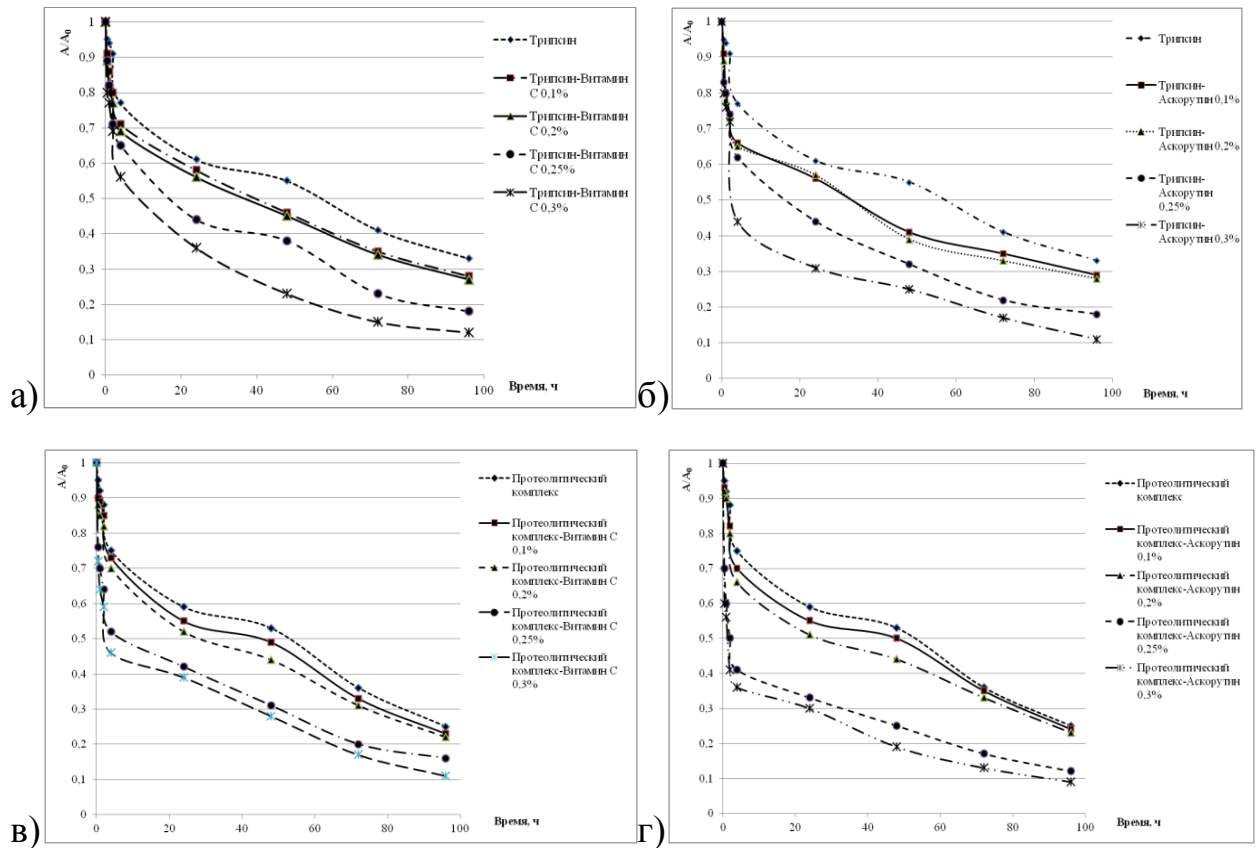


Рисунок 3.35– Влияние концентрации витамина С и аскорутина на остаточную ферментативную активность нативных гидролаз при хранении при комнатной температуре: а,б) трипсина; в,г) ПК

Таблица 3.25– Влияние концентрации витамина С и аскорутина на константу инактивации препаратов гидролаз в течение времени хранения и время их хранения при  $A_{50\%}$

Фермент	Константа инактивации $k_{in}, (\cdot 10^{-3}), c^{-1}$	Время хранения при $A_{50\%}, ч$
1	2	3
Трипсин	$0,78 \pm 0,04$ $0,11 \pm 0,01$	60,5
Трипсин-Витамин С 0,1%	$0,79 \pm 0,04$ $0,13 \pm 0,01$	40,0
Трипсин- Витамин С 0,2%	$0,83 \pm 0,04$ $0,14 \pm 0,01$	39,2
Трипсин- Витамин С 0,25%	$0,98 \pm 0,05$ $0,19 \pm 0,01$	18,7
Трипсин- Витамин С 0,3%	$1,28 \pm 0,06$ $0,29 \pm 0,01$	12,3
Трипсин-Аскорутин 0,1%	$0,80 \pm 0,04$ $0,13 \pm 0,01$	37,0
Трипсин-Аскорутин 0,2%	$0,83 \pm 0,04$ $0,15 \pm 0,01$	37,0
Трипсин-Аскорутин 0,25%	$0,96 \pm 0,05$ $0,22 \pm 0,01$	19,5
Трипсин-Аскорутин 0,3%	$1,30 \pm 0,07$ $0,29 \pm 0,01$	5,4

1	2	3
Протеолитический комплекс	1,15±0,06 0,21±0,02	57,0
Протеолитический комплекс -Витамин С 0,1%	1,18±0,06 0,23±0,02	47,0
Протеолитический комплекс - Витамин С 0,2%	1,19±0,06 0,24±0,02	30,1
Протеолитический комплекс -Витамин С 0,25%	1,45±0,07 0,31±0,02	8,1
Протеолитический комплекс - Витамин С 0,3%	1,51±0,07 0,39±0,02	5,2
Протеолитический комплекс -Аскорутин 0,1%	1,18±0,06 0,24±0,02	50,0
Протеолитический комплекс - Аскорутин 0,2%	1,23±0,06 0,25±0,02	43,0
Протеолитический комплекс -Аскорутин 0,25%	1,44±0,07 0,36±0,02	4,1
Протеолитический комплекс - Аскорутин 0,3%	1,53±0,07 0,40±0,02	3,7

Из полученных данных видно, что концентрации витамина С и аскорутина, при которой потери ферментативной активности не превышают 5%, составляет 0,2%, что соответствует литературным рекомендациям по нормам добавления указанных соединений в препараты для заживления ран. При увеличении концентрации до 0,3% наблюдается значительное снижение ферментативной активности нативных протеаз (до 10%). Значения ферментативной активности ферментов при добавлении 0,1% и 0,2% витаминов близки, следовательно, для достижения большего лечебного эффекта целесообразно добавлять к ферментам витамин С и аскорутин в концентрации 0,2%.

Далее аналогично вышеописанной методики иммобилизации гидролаз были получены иммобилизованные на хитозансодержащую целлюлозу препараты трипсина и ПК в присутствии 5% глицерина с добавлением витамина С или аскорутина в количестве 0,2%.

На рисунке 3.36 и в таблице 3.26 приведены данные по сохранению активности препаратов протеаз в присутствии витаминов в зависимости от



времени хранения препаратов. За 100% принимали активность нативных ферментов в отсутствии витаминов.

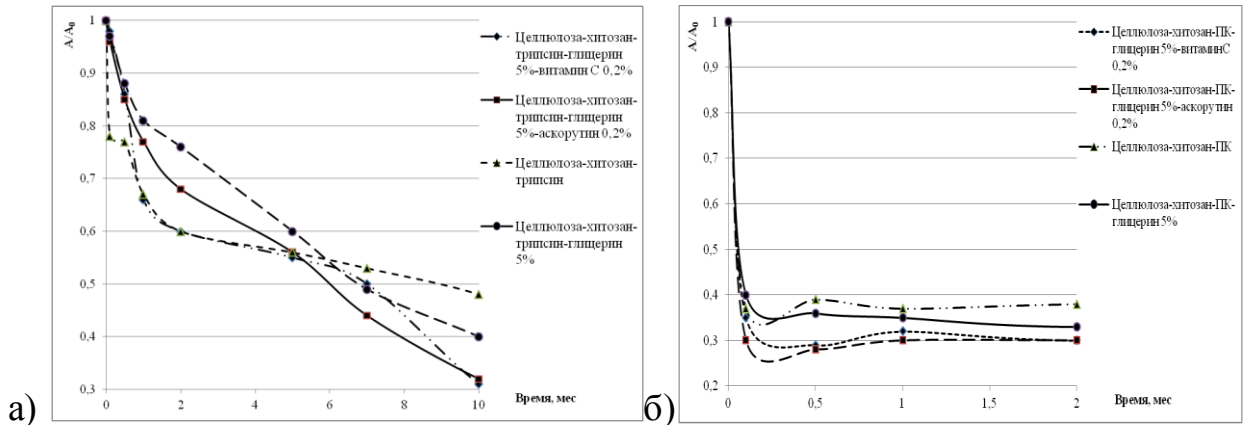


Рисунок 3.36 – Динамика сохранения протеолитической активности при хранении иммобилизованных форм протеаз в присутствии витамина С и аскорутина  
а) трипсина, б) протеолитического комплекса

Таблица 3.26– Влияние концентрации глицерина, витамина С и аскорутина на константу инактивации препаратов гидролаз и время их хранения при  $A_{50\%}$

Ферментный препарат	Константа инактивации $k_{in}$ , ( $\cdot 10^{-3}$ ), $c^{-1}$	Время хранения при $A_{50\%}$
Трипсин	$0,78 \pm 0,04$ $0,11 \pm 0,01$	60,5 ч
Целлюлоза-хитозан-трипсин	$0,38 \pm 0,02$ $0,06 \pm 0,01$	7,5 мес
Целлюлоза-хитозан-трипсин-глицерин 5%	$0,43 \pm 0,02$ $0,08 \pm 0,01$	7,1 мес
Целлюлоза-хитозан-трипсин-глицерин 5%-витамин С 0,2%	$0,45 \pm 0,02$ $0,10 \pm 0,01$	7,0 мес
Целлюлоза-хитозан-трипсин-глицерин 5%-аскорутин 0,2%	$0,46 \pm 0,02$ $0,11 \pm 0,01$	6,7 мес
Протеолитический комплекс	$1,15 \pm 0,06$ $0,21 \pm 0,02$	57,0 ч
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс	$0,42 \pm 0,02$ $0,05 \pm 0,01$	0,25 мес
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс-Глицерин 5%	$0,44 \pm 0,02$ $0,11 \pm 0,01$	0,24 мес
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс-глицерин 5%-витамин С 0,2%	$0,62 \pm 0,03$ $0,13 \pm 0,01$	0,23 мес
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс-глицерин 5%-аскорутин 0,2%	$0,63 \pm 0,03$ $0,11 \pm 0,01$	0,23 мес

Из приведенных данных видно, что добавление витамина С и аскорутина в состав иммобилизованных протеаз на носителе целлюлоза-

хитозан-глицерин 5% практически не приводит к увеличению потерь ферментативной активности в процессе хранения. Значения констант скорости инактивации и время хранения при  $A_{50\%}$  для препаратов, содержащих глицерин и витамины, практически не отличаются от аналогичных значений для иммобилизованных препаратов протеаз, не содержащих вышеуказанных соединений. Это означает, что добавление количества 0,2% витамина С или аскорутин возможно при иммобилизации протеаз на хитозансодержащую целлюлозу. Из полученных данных следует, что оптимальными раневыми покрытиями являются иммобилизованные на носителе целлюлоза-хитозан- глицерин 5% трипсин и протеолитический комплекс с витамином С или аскорутин в количестве 0,2%.

### ***3.9.2. Гидролиз ячменного солода нативной и иммобилизованной грибной амилазой***

Для оценки практического применения наиболее эффективного иммобилизованного препарата грибной амилазы (амилазы, иммобилизованной на хитозансодержащей целлюлозе) в качестве промышленного субстрата был выбран ячменный солод, в составе которого в основном преобладают крахмал и некрахмальные полисахариды (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества и др.). Реакцию гидролиза данного субстрата проводили как нативным ферментом, так и иммобилизованным при оптимальных температурах (45°C для нативной амилазы и 55°C для иммобилизованной), рН среды 5,0 в течение 8 ч. Степень гидролиза ячменного солода рассчитывали относительно содержания крахмала в ячменном солоде (81%). Первоначально подбирали оптимальную концентрацию ячменного солода в суспензии, которую варьировали в диапазоне 0,5-15%. Полученные результаты представлены на рис. 3.37.

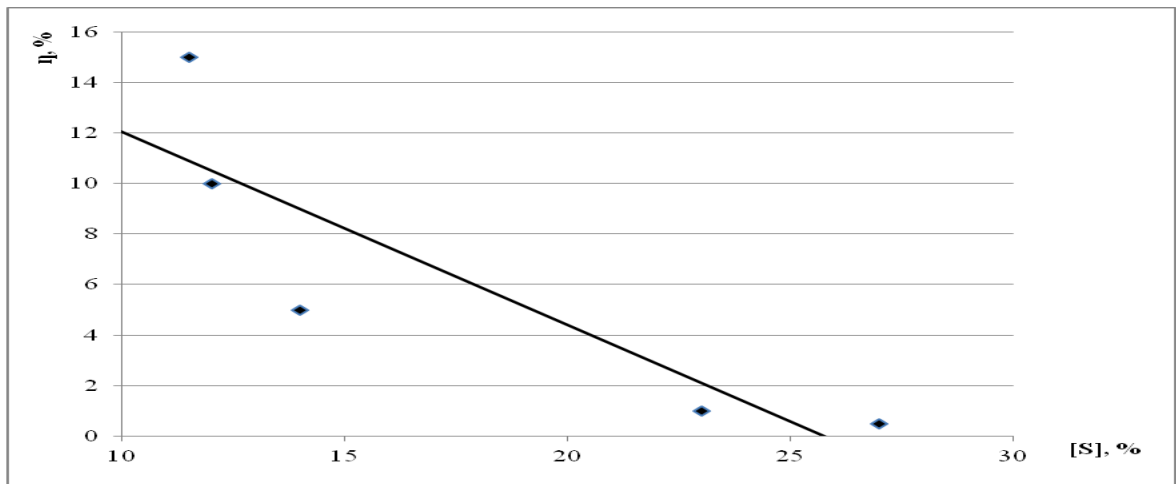


Рисунок 3.37 - Зависимость степени гидролиза ячменного солода нативной амилазой от обратной концентрации субстрата, 1/г

Наибольшая степень гидролиза (27%) ячменного солода достигается при самой низкой концентрации субстрата 0,5%. Однако данный субстрат отличается высокой влажностью, что затрудняет его использование в промышленных целях. В случае более концентрированных субстратов (5-15%) степень гидролиза мала и составляет 11-14%, что делает работу с концентрированными субстратами в промышленных условиях нецелесообразной. Исходя из этого в качестве наиболее эффективной концентрации субстрата была выбрана концентрация 1%, степень гидролиза при которой достигает 18,5%.

В промышленных условиях с целью улучшения технико-экономических показателей производства необходимо минимизировать расход ферментного препарата, который является дорогостоящим реагентом. Поэтому на следующем этапе работы подбирали оптимальную концентрацию амилазы, как нативной, так и иммобилизованной. Гидролиз ячменного солода проводили в вышеуказанных условиях при выбранной наилучшей концентрации субстрата 1%. Концентрацию ферментного препарата варьировали в интервале 1-15% от массы субстрата. Полученные результаты приведены на рис. 3.38.

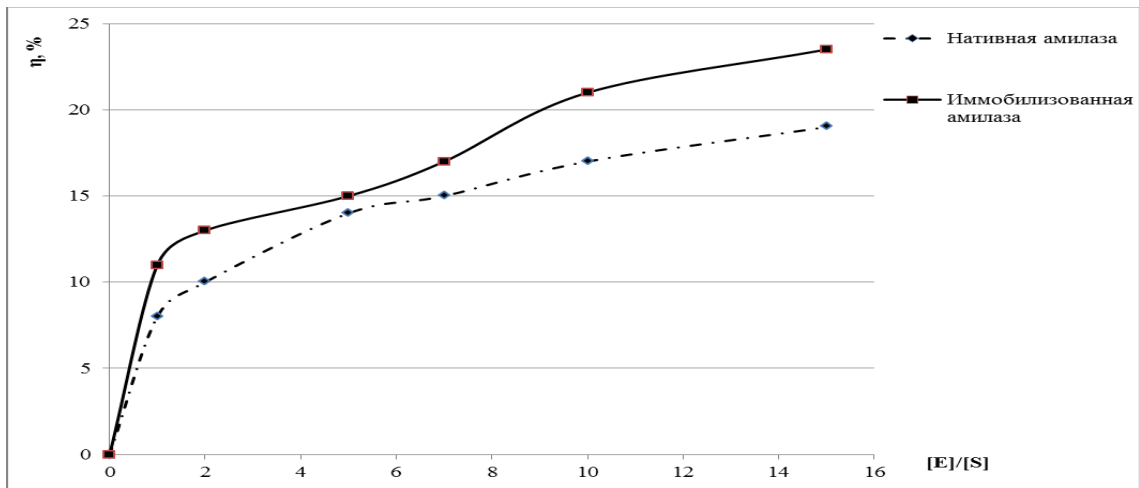


Рисунок 3.38 – Зависимость степени гидролиза субстрата от соотношения фермент:субстрат (%)

Из данных рисунка 3.38 следует, что гидролиз ячменного солода амилазой, иммобилизованной на хитозансодержащей целлюлозе, идет с более высоким выходом по сравнению с нативным ферментом. Однако, из полученных данных следует, что максимальная степень гидролиза ячменного солода не превышает 23,5%, что обусловлено практически полной инактивацией фермента. Одним из приемов, повышающих выход продуктов ферментативного гидролиза, является дробная загрузка ферментного препарата.

При исследовании влияния дробной загрузки ферментного препарата на эффективность гидролиза процесс проводили при концентрации субстрата в суспензии равной 1% и соотношении фермента к субстрату 10% по массе. Полученные результаты представлены на рис. 3.38. Из рисунка видно, что через два часа после начала гидролиза практически прекращается повышение степени гидролиза субстрата вследствие практически полной его инактивации. Поэтому вносить следующую порцию ферментного препарата целесообразно именно через 2 часа после начала гидролиза.

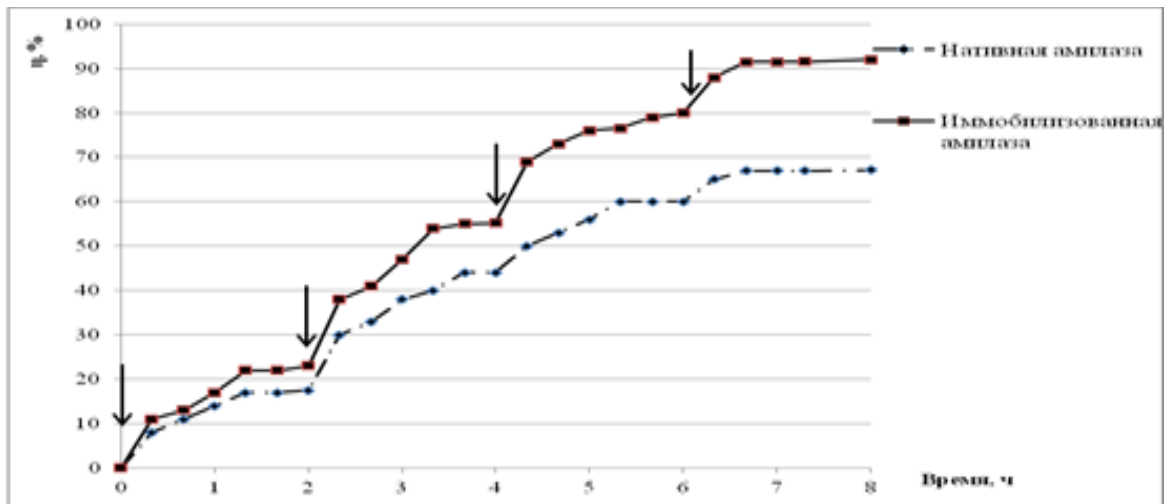


Рисунок 3.39 –Динамика ферментативного гидролиза ячменного солода нативной и иммобилизованной амилазой при дробной загрузке ФП ( ↓ - момент внесения ФП)

По данным рисунка 3.39 видно, что было проведено 4 загрузки ферментного препарата через каждые 2 часа гидролиза. В результате была достигнута максимальная степень гидролиза субстрата иммобилизованным ферментным препаратом равная 92%. Эта величина для нативного фермента составила 68%. Таким образом, представляется проводить гидролиз ячменного солода при следующих условиях: рН 5,0, 45°С для нативной и 55°С для иммобилизованной амилазы, концентрация субстрата 1%, соотношение фермента к субстрату 10% по массе, 4 загрузки ферментного препарата в течение 8 часов гидролиза.

Проведённые эксперименты подтверждают целесообразность использования иммобилизованной на хитозансодержащей целлюлозе амилазы с целью повышения эффективности гидролиза ячменного солода в пивоваренном производстве.

### ***3.9.3. Гидролиз отходов мясоперерабатывающей промышленности нативной и иммобилизованной липазой***

Липазы широко используются в промышленности благодаря способности катализировать широкий спектр химических реакций. Наиболее важной реакцией, катализируемой липазой, является гидролиз триглицеридов в глицерин и жирные кислоты. Многие литературные источники [54-56]

свидетельствуют о том, что получение биодизеля более выгодно ферментативным путем, так как скорость образования глицерина выше, и процесс очистки становится более простым. Кроме того, липаза, используемая в производстве биодизеля, катализирует процесс при наличии водной фазы в субстрате (масле) и обеспечивает более высокий выход биодизеля без образования мыльной фазы.

Главной проблемой современных мясоперерабатывающих производств является переработка и утилизация жировых отходов [245]. Известно несколько методов переработки жировых отходов: физико-химические и микробиологические. Физико-химические технологии, осуществляющиеся в довольно жестких условиях, являются малоэффективными и дорогостоящими. Микробиологический способ переработки жира основан на использовании биологических препаратов, содержащих ферменты или живые клетки микроорганизмов. Такой метод характеризуется высокой эффективностью и экологичностью.

В данной работе оценивали эффективность иммобилизованного препарата липазы (микрочастиц липазы) для гидролиза промышленного субстрата – жиросодержащего отхода мясопереработки. Как известно, катализ липазой является гетерогенным, так как она действует на границе раздела водной и органической фаз, что объясняет продолжительность его протекания. Поэтому с целью повышения доступности субстрата была осуществлена его предобработка путем ультразвукового диспергирования (15-20 минут, комнатная температура) [246].

Реакцию гидролиза проводили при оптимальной температуре для нативного и иммобилизованного фермента 37°C, pH среды 8,0 в течение 2 часов. Аналогично предыдущему исследованию первым этапом определяли оптимальную концентрацию субстрата в суспензии, которую варьировали в диапазоне 10-60%. Результаты эксперимента приведены на рисунке 3.40.

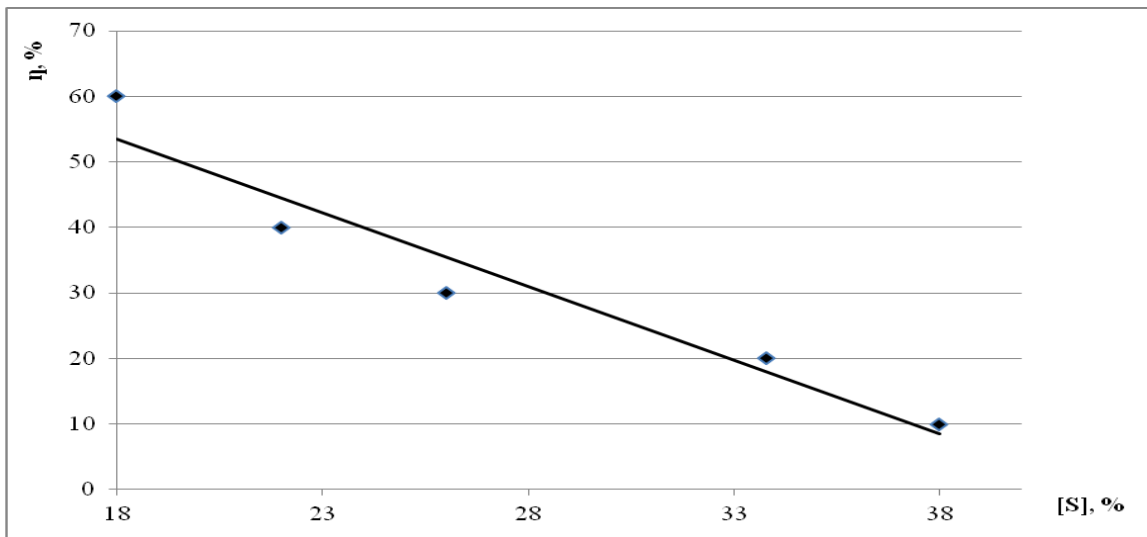


Рисунок 3.40 – Зависимость степени гидролиза нативной липазой от обратной концентрации субстрата

Из рисунка 3.40 видно, что максимальная степень гидролиза (38%) нативной липазой достигается при использовании разбавленного субстрата, концентрация которого составляет 10%. Использование такого субстрата в промышленных масштабах неэффективно за счет избыточного содержания воды. Концентрацию субстрата, при которой достигаемая степень гидролиза не превышает 30%, нецелесообразно использовать с экономической точки зрения. Следовательно, для гидролиза необходимо использовать жиросодержащий субстрат с концентрацией 20%, при которой степень гидролиза составляет 34%.

В промышленных условиях с целью улучшения технико-экономических показателей производства необходимо минимизировать расход ферментного препарата, который является дорогостоящим реагентом. Поэтому на следующем этапе работы подбирали оптимальную концентрацию нативной и иммобилизованной липазы. Гидролиз жиросодержащего субстрата проводили в вышеуказанных условиях с концентрацией субстрата 20%. Концентрацию ферментного препарата варьировали в интервале 0,1-0,5% от массы субстрата. Полученные результаты приведены на рис. 3.41.

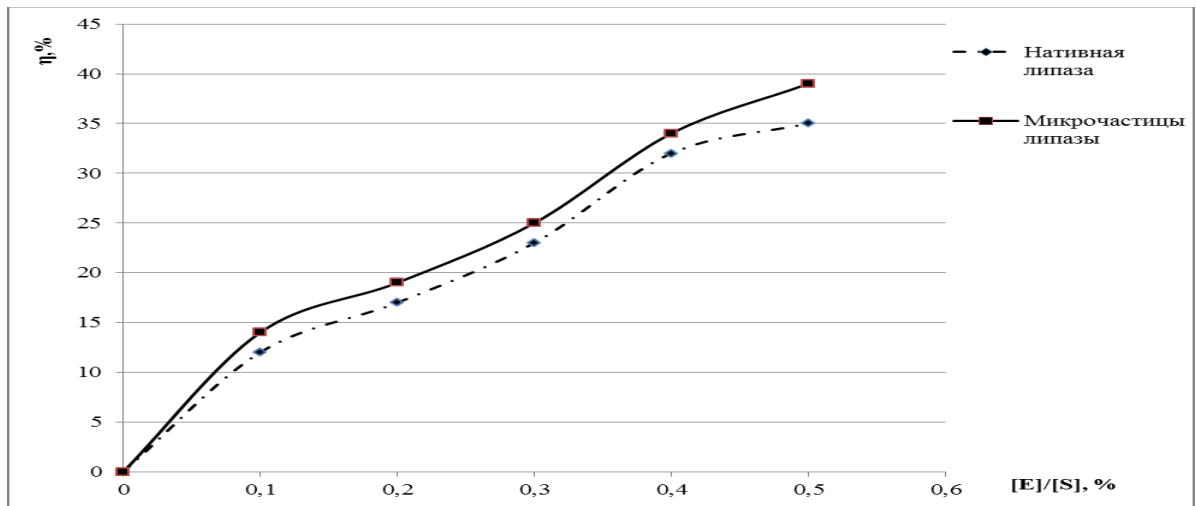


Рисунок 3.41 – Зависимость степени гидролиза субстрата от соотношения фермент:субстрат (%)

Из представленного рисунка видно, что при различных соотношениях фермента к субстрату степень гидролиза нативной липазой ниже, чем иммобилизованным препаратом. Это объясняется более устойчивой структурой микрочастиц липазы, в которых фермент защищен от инактивирующего воздействия хитозан-альгинатной оболочкой.

Максимальная степень гидролиза жиросодержащего субстрата иммобилизованной липазой не превышает 39%, что делает целесообразным применить дробную загрузку ферментного препарата липазы. На рисунке 3.42 представлены результаты дробной загрузки ферментного препарата для нативной и иммобилизованной липазы. Гидролиз проводили при концентрации жиросодержащего субстрата 20%, соотношении фермента к субстрату 0,5% по массе.

Из рисунка видно, что первая стадия гидролиза проходила в течение 23 часов. При достижении степени гидролиза постоянного значения осуществляли загрузку ферментного препарата липазы в том же количестве, которое вносили на первой стадии.



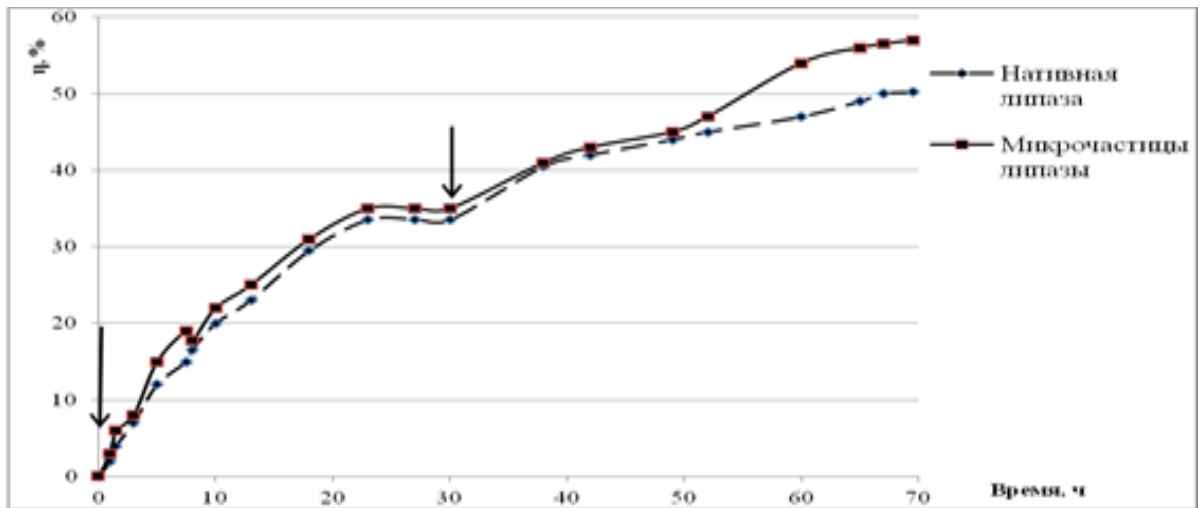


Рисунок 3.42 – Дробная загрузка нативной и иммобилизованной липазы при гидролизе жиросодержащего отхода в течение 70 часов ( ↓ момент внесения ФП)

При проведении данного эксперимента было сделано 2 загрузки ферментного препарата липазы. Максимальная степень гидролиза нативной липазой составила 50%, иммобилизованной липазой – 57,5%. Однако следует отметить, продолжительность второй стадии гидролиза значительно возросла (до 40 часов), что говорит об уменьшении интенсивности протекания процесса в связи с ингибирующим действием образующихся продуктов. Следовательно, проводить гидролиз жиросодержащего отхода необходимо при следующих условиях: 37°C, pH 8,0, концентрация субстрата 20%, соотношение фермента к субстрату 0,5% по массе, 2 загрузки иммобилизованного ферментного препарата липазы, длительность гидролиза 70 часов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные иммобилизованные препараты гидролитических ферментов (протеаз, амилаз и липаз) обладают большей эффективностью по сравнению с нативными, что делает их перспективными для широкого практического использования.

## ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы кинетические и термодинамические свойства нативных гидролитических ферментов (трипсина КРС, ПК из гепатопанкреаса краба, амилазы гриба *Aspergillus oryzae*, липазы КРС);

2. Подобраны наиболее эффективные условия иммобилизации гидролитических ферментов: для протеаз (трипсина КРС и ПК) - на носитель целлюлоза-хитозан; для грибной амилазы - на носитель целлюлоза-хитозан; для липазы КРС: микрокапсулирование в хитозан-альгинатные микрочастицы. Показано, что иммобилизация на природные полисахариды более эффективна, чем на синтетические: степень сохранения ферментативной активности в случае использования природных носителей составляет в среднем не менее 80%, тогда как в случае синтетических 50-80%.

3. Исследовано влияние иммобилизации на конформационную, операционную, функциональную и стабильность при хранении. Доказано, что иммобилизация протеаз и амилазы на носитель целлюлоза-хитозан и липазы в хитозан-альгинатные микрочастицы приводит к увеличению стабильности относительно нативных форм гидролаз;

4. Изучена динамика высвобождения протеолитических ферментов (трипсина и ПК) в раневую среду, которая позволила установить срок пролонгированного действия препарата 72 ч, что соответствует требованиям, предъявляемым к медицинским препаратам. Подобраны концентрации смягчающего агента (глицерина) и витаминов (С и аскорутин), не вызывающие снижения протеолитической активности. На основе полученных данных разработан новый тип атравматичного перевязочного материала следующего состава: целлюлоза - хитозан- протеолитический фермент (трипсин или ПК) – 5% глицерин – 0,2% аскорутин (или витамин С), обладающего пролонгированным действием в течение 72 часов для препарата трипсина и 24 часов для препарата ПК;

5. Предложены наиболее эффективные условия проведения гидролиза ячменного солода: препарат иммобилизованной амилазы на носителе целлюлоза-хитозан, 55°C, рН 5,0, 4 загрузки ФП, 8 часов, степень гидролиза 92%;

6. Предложены наиболее эффективные условия проведения гидролиза жиросодержащих отходов при использовании микрочастиц липазы: рН 8,0, 37°C, 2 загрузки ФП, 70 часов, степень гидролиза 57,5%.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Березин И. В. Инженерная энзимология. Серия Биотехнология. М.: Высшая школа, 1987. 143 с.
2. Falch E. A. Industrial enzymes developments in production and application // *Biotechnol Adv.* 1991. No.9. pp. 43–58.
3. Posorske L. H. Industrial scale application of enzymes to the fat and oil's industry // *J. Am Oil Chem Soc.* 1984. No.61. pp. 1758–1760.
4. Trincone A. Potential biocatalysts originating from sea environments // *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 2010. No.66. pp. 241–256.
5. Памирский И. Э. Анализ степени структурной и функциональной однотипности поливалентного ингибитора протеаз, содержащегося в поджелудочной железе животных, и соевого ингибитора трипсина: дис. ... канд. биол. наук. Благовещенск, 2009. 117 с.
6. Izabel Soares, Zacarias Tavora, Rodrigo Patera Barcelos *Microorganism-Produced Enzymes in the Food Industry // Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry.* 2012. pp. 83-94.
7. Зинина О. В. О безопасности ферментированных мясopодуkтов // *Международный научно-исследовательский журнал.* 2015. № 21 (33). 35 с.
8. Rocco Rossano, Marilena Larocca, Paolo Riccio *Digestive Enzymes of the Crustaceans Munida and Their Application in Cheese Manufacturing: A Review // Marine Drugs.* 2011. No.9(7). pp. 1220-1231.
9. C. Arunachalam, K. Saritha *Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry // Indian Journal of Science and Technology.* 2009. No.12. pp. 29-32.
10. Y. S. Muniv, G. P. Bhawane *Comparative Study on the Characteristics of Midgut Protease in Different Multivoltine Races of Silkworm, Bombyx mori L. // Biological Forum — An International Journal.* 2012. No.4. pp. 75-78.
11. I. Maldupa, A. Brinkmane, I. Rendeniece, A. Mihailova *Evidence based toothpaste classification, according to certain characteristics of their chemical*

composition // *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*. 2012. No.14. pp. 12-22.

12. Толстых П. И., Гостищев В. К., Арутюнян Б. Н., Вирник А. Д. Протеолитические ферменты, иммобилизованные на волокнистых материалах, в хирургии. Ереван: Айстан, 1990. 137 с.

13. Белов А. А. Разработка промышленных технологий получения медицинских материалов на основе модифицированных волокнообразующих полимеров, содержащих биологически-активные белковые вещества: дис. ... док. техн. наук. М., 2009. 393 с.

14. Ефименко Н. А., Лысенко М. В., Стернин Ю. И. Протеолитические энзимы в хирургии: исторические аспекты и современные представления о применении // *Русский медицинский журнал*. 2011. № 5. С. 368-369.

15. Полиферментные препараты в гнойной хирургии: методические рекомендации / Под ред. член-корр. РАМН Н.А. Ефименко. М., 2005. 264 с.

16. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2006. 1206 с.

17. Eriksson E. Research directions in wound healing // *Contemp. Surg. Suppl*. 2000. pp. 28-30.

18. Толстых М. П., Луцевич О. Э., Медушева Е. О. Теоретические и практические аспекты заживления ран. М.: Дипак, 2007. 96 с.

19. Юданова Т. Н. Полимерные раневые покрытия с ферментативным и антимикробным действием: дис. ... док. хим. наук. М., 2004. 329 с.

20. Филатов В. Н., Рыльцев В. В. Биологически активные текстильные материалы. М.: ЦНИИТЭИ Легпром, 2002. 248 с.

21. Ющук Я. Д., Малиновский М. Ю., Сундуков А. В. Системная энзимотерапия (Вобэнзим, Флогэнзим) в комплексном лечении вирусных гепатитов // *Вестник инфектологии и паразитологии*. 2002. С. 45-48.

22. Анисенко О. В. Синтез сорбентов с заданными свойствами и создание на их основе биопрепаратов иммобилизованных ферментов: дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2005. 135 с.

23. Loke W.K., Yong L.L., Khor E. Wound dressing with sustained antimicrobial capability // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. No.1, Vol. 53. pp. 8-17.
24. Аннаев А. Г. Применение биологически активной композиции на основе альгината натрия (Сипралин) в комплексном лечении гнойных ран: дис. ... канд. мед. наук. М., 1992. 169 с.
25. Романовская И. И. Потенциальное раневое покрытие с трипсином, иммобилизованным в модифицированный поли-N-винилпирролидон // *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2009. № 9. С. 182-187.
26. Макарова Е. Л. Закономерности адсорбционной иммобилизации глюкоамилазы на биополимерах и углеродных нанотрубках: дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, 2014. 132 с.
27. Joana Paula Menezes Biazus, Roberto Rodrigues de Souza, Jesus Espinoza Márquez Production and characterization of amylases from *Zea mays* malt // *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2009. No.4, Vol. 52. pp. 991-1000.
28. Сереброва С. Ю. Перспективы применения ферментных препаратов в гастроэнтерологии // *Русский медицинский журнал «Болезни органов пищеварения».* Москва. 2006. № 1. С. 23-26.
29. Paula Monteiro de Souza, Pérola de Oliveira e Magalhães Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry // *Brazilian Journal of Microbiology.* 2010. No.4, Vol. 41. pp. 850-861.
30. Yen Yen Chai, Chun Shiong Chong, Ummirul Mukminin Kahar, Kavitha Muniandy Application of Statistical Experimental Design for Optimization of Novel  $\alpha$ -amylase Production by *Anoxybacillus* Species // *Journal of Biological Sciences.* 2013. No.7, Vol. 13. pp. 605-613.
31. Nasratun M., Said H.A., Noraziah A., Abd Alla A.N. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction // *Journal of Applied Science.* 2010. No.21, Vol. 10. pp. 2701-2704.
32. Шеламова С. А. Некоторые каталитические свойства липазы I *Rhizopus oryzae* 1403 / Шеламова С.А., Тырсин Ю.А. // *Вестник ОГУ.* 2009. № 6. С. 434-437.

33. Беленова А. С. Исследование закономерностей гидролиза триглицеридов свободной и иммобилизованной липазой: дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, 2011. 162 с.
34. Горохова И. В. Изучение каталитических свойств липаз, иммобилизованных в гидрофобных средах: дис. ... канд. хим. наук. М., 2003. 129 с.
35. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae* / Salah RB et al. // FEMS Microbiology Letters. 2006. No.2, Vol. 260, pp. 241-248.
36. Fariha H. Industrial applications of microbial lipases // Enzyme and Microbial Technology. 2006. No.2, Vol. 39. pp. 235-251.
37. Мельниченко А. А. Агрегация циркулирующих в крови модифицированных липопротеидов низкой плотности. Роль в накоплении внутриклеточного холестерина: дис. ... канд. биол. наук. М., 2006. 121 с.
38. Богомолов В. В. Эффективность ингибитора кишечных липаз и бигуанидов в лечении больных сахарным диабетом 2-го типа с избыточной массой тела и ожирением: дис. ... канд. мед. наук. М., 2008. 138 с.
39. Мотина Е. А. Получение, исследование физико-химических свойств и применение дрожжевой липазы в технологии сырокопченых колбас: дис. ... канд. тех. наук. Воронеж, 2009. 190 с.
40. Application of advanced materials as support for immobilization of lipase from *Candida rugosa* // Biocatalysis and biotransformation. 2005. No.3-4, Vol. 23. pp. 233-239.
41. Pereira E.B., Zanin G.M., Castro H.F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions // Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2003. No.04, Vol. 20. pp. 343 – 355.
42. Shafei M.S., Allam, R.F. Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum* // Malaysian Journal of Microbiology. 2010. No. 6(2). pp. 196-202.

43. Dejan I. Bezbradica, Jasmina J. Ćorović, Radivoje M. Prodanović Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit // Original scientific paper. 2005. No.36. pp. 179-186.
44. Zorica D.Knezevic-Jugovic, Jasmina J. Damnjanovic The immobilization of lipase on sepabeads: coupling, characterization and application in geranyl butyrate synthesis in a low aqueous system // Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly. 2008. No.14 (4). pp. 245-249.
45. Zhu S. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester / S. Zhu, Y. Wu, Z. Yu // Journal of Biotechnology. 2005. No.4? Vol. 116. pp. 397-401.
46. Ершов А. Технология рыбы и рыбных продуктов Учебник. СПб.: Гиорд, 2006. 941 с.
47. Глубокая переработка жиросодержащих отходов гидробионтов с получением биотоплива: дис. ... канд.тех.наук. Воронеж, 2013. 161 с.
48. Боева Н. П. Технология кормовой муки из рыб повышенной жирности // Рыбное хозяйство. 2002. № 3. С. 53-54.
49. Кривошеин Д. А. Экология и безопасность жизнедеятельности: учеб. пособие для вузов. М.: ЮНИТА - ДАНА, 2000. 447 с.
50. Баранов, В. В. Технология рыбы и рыбных продуктов Учебник для вузов. СПб.: Гиорд, 2006. 944 с.
51. Schmidt-Dannert Recombinate microbial lipases for biotechnological applications // Bioorg. and Med. Chem. 1999. No.10. pp. 2123–2130.
52. Тульская Е. В. Влияние природных и синтетических полимеров на биохимические свойства липаз из различных источников: дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 138 с.
53. Nevena D. Ognjanović, Svetlana V. Šaponjić, Dejan I. Bezbradica, Zorica D. Knežević Lipase-catalysed biodiesel synthesis with different acylacceptors // Original scientific paper. 2008. No.39. pp. 161-69.
54. Carlos Luna, Enrique Sancho, Diego Luna, Verónica Caballero Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1,3-Selective Ethanolysis with Pig Pancreatic



- Lipase Covalently Immobilized on  $\text{AlPO}_4$  Support // *Energies*. 2013. No. 6. pp. 3879-3900.
55. Гарабаджиу А. В., Галынкин В. А., Карасев М. М. и др. Основные аспекты использования липаз для получения биодизеля // *Управление научных исследований СПбГТИ (ТУ)*. 2010. № 33. С. 63—68.
56. Carlos Luna, Cristobal Verdugo, Enrique D. Sancho, Diego Luna A Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from *Rhizopus oryzae*, Optimized by Response Surface Methodology // *Energies*. 2014. No.7. pp. 3383-3399.
57. Шнайдер К. Л. Ферментативный гидролиз растительных масел с использованием неводных сред: дис. ... канд. хим. наук. Казань, 2009. 135 с.
58. Гамаюрова В. С. Влияние воды на ферментативный гидролиз растительных масел в неводных средах // *Биотехнология. Вода и пищевые продукты: материалы Международ. науч.- практ. конференции*. М.: ЗАО “Экспо-биохим-технологии”, РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2008. С. 263-264.
59. Чан Ньюн Тхи, Мукатова М. Д. Биотопливо из жиросодержащих отходов гидробиотнов // *Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство*. 2010. № 1. С. 182-186.
60. Betigeri S.S., Neau S.H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads // *Biomaterials*. 2002. No.17, Vol. 23. pp. 3627–3636.
61. Варфоломеев С. Д. *Химическая энзимология*. М.: Академия, 2005. 472 с.
62. Литвин Ф. Е. Коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса камчатского краба; выделение и свойства: дис. ... канд. биол. наук. М., 1993. 136 с.
63. Казанская Н. Ф. Ингибиторы – факторы регуляции протеолиза // *Биоорг. хим.* 1994. Т. 20. № 5. С. 485-491.
64. Панова А. А., Левицкий В. Ю., Можаяев В. В. Нативный, модифицированный и иммобилизованный химотрипсин в хаотропных средах. Пределы стабилизации // *Биоорг. химия*. 1994. Т. 20. № 7. С. 809-816.

65. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. 432 с.
66. Семенова С. А., Лютова Л. В., Руденская Г. Н. и др. Взаимодействие протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба с белками плазмы крови // сб. тез. док. VI симпозиум «Химия протеолитических ферментов». М., 2007. С. 156.
67. Соловьева Н. И. Коллагеназы различного происхождения и их роль в деструкции коллагена в норме и патологии: автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1991. 37 с.
68. Mekkes J.R., Le Poole I.C., Das P.K. Efficient debridement of necrotic wounds using proteolytic enzymes derived from Antarctic Krill: Double-blind, placebo-controlled study in standardized animal wound model // Wound repair and regeneration. 1998. No.1, Vol. 6. pp. 50-57.
69. Досон Р. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 543 с.
70. Безбородов А. М. Микробиологический синтез / Безбородов А. М., Квеситадзе Г. И. СПб.: Проспект Науки, 2011. 144 с.
71. Келети Т. Основы ферментативной кинетики, М.: Мир, 1990. 350 с.
72. Галич И. П. Амилазы микроорганизмов / И.П. Галич. Киев, 1987. 192 с.
73. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов : учеб. пособие. М.: Элевар, 2000. 512 с.
74. Experimental Approach To Optimize the Use of  $\alpha$ -Amylases in Breadmaking / С.М. Rosell [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. Vol. 49. pp. 2973-2977.
75. Yandri, Devi Susanti, Tati Suhartati Immobilization of  $\alpha$ -Amylase from Local Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Carboxymethyl Cellulose (CM-Cellulose) // Modern Applied Science. 2012. No.3, Vol. 6. pp.81-86.
76. Tarek E. El-Banna, Ahmed A. Abd-Aziz, Mohamed I. Abou-Dobara Production and immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* // Pakistan Journal of Biological Sciences. 2007. No. 10(12). pp. 2039-2047.

77. Сираева З. Ю. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней на основе *Bacillus Amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008: дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2012. 196 с.
78. Кабанов А. В. Исследование синтеза и стабильности амилолитических ферментов мицелиальным грибом *Aspergillus niger* штамм Л-4: дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2010. 93 с.
79. Квачадзе Л. Л. Селекция микроскопических грибов – продуцентов глюкоамилазы / Квачадзе Л. Л., Кутателадзе Л. Ю., Квеситадзе Р. И. // Микробиология. 1988. Т. 57, Вып. 3. С. 405-409.
80. Еремин А. Н. Имобилизация внеклеточной глюкозооксидазы *PenicilliumFuniculosum* 46.1 на геле гидроксидов алюминия и цинка // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 156-162.
81. Glucoamylase : structure / function relationships, and protein engineering / J. Sauer [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology. 2000. Vol. 1543. pp. 275-293.
82. Жеребцов Н. А. О механизме каталитического действия карбогидраз / Жеребцов Н. А., Корнеева О. С., Тертычная Т.Н. // Прикладная биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 2. С. 123-132.
83. Characterization and physicochemical properties of an lipase from *Pseudomonas mendocina* 3121-1 // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2002. Vol. 36. pp. 47-55.
84. Чекалова К. В. Разработка новой препаративной формы биологических фунгицидов на основе клеток микроорганизмов *Trichoderma viride* и *Pseudomonas fluorescens*: дис. ... канд. биол. наук. М., 2007. 162 с.
85. W. Aehle Enzymes in Industry. Production and applications: Weinheim, 2004. P. 515.
86. Костров С. В. Структурные детерминанты, существенные для функционирования и стабильности протеолитических ферментов: дис. ... док. хим. наук. М., 2001. 200 с.

87. Гасанов В. С. Разработка конструкций и синтез рекомбинантных химерных генно-инженерных белков ВИЧ-1 и исследование их свойств в твердофазном иммунном анализе: дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 92 с.
88. Левицкий В. Ю. Регуляция стабильности и каталитической активности ферментов изменением хаотропных свойств среды (на основе альфа-химотрипсина и рибонуклеазы: дис. ... канд. хим. наук. М., 1992. 152 с.
89. Raushan Kumar Singh, Manish Kumar Tiwari, Ranjitha Singh From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes // International Journal of Molecular Sciences. 2013. No.14 (1). pp. 1232-1277.
90. Петровский А. С. Структурная модификация ферментных белков для изменения эффективности катализируемых реакций: дис. ... канд. биол. наук. М., 2012. 160 с.
91. Бектенова Г. А. Иммуобилизация ферментов на неорганических и органических полимерных носителях: дис. ... док. хим. наук. Алматы, 2000. 287 с.
92. Артюхов А. А., Штильман М. И., Тсатсакис А. М. и др. Сшитые макропористые гидрогели поливинилового спирта для медицины и биотехнологии // 3-й Междунар. конгр. "Биотехнология: состояние и перспективы развития". Москва. 2005. С. 48-49.
93. Wilhelm Tischer, Frank Wedekind Immobilized Enzymes: Methods and Applications // Topics in Current Chemistry. 1999. Vol. 200. pp. 96-123.
94. Тривен М. Д. Иммуобилизованные ферменты. М.: Мир, 1988. 236 с.
95. Taqieddin E., Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules // Biomaterials. 2004. No.25. pp. 1937—1945.
96. Безруких А. Е., Есимбекова Е. Н., Кратасюка В. А. Температурная инактивация биферментной системы светящихся бактерий NADH: FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в желатине // Journal of Siberian Federal University. 2011. № 4. С. 64-74.

97. Есимбекова Е. Н., Торгашина И. Г., Кратасюк В. А. Сравнение иммобилизованной и растворимой биферментной системы НАДН: ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза // Биохимия. 2009. С. 853-859.
98. Филатов В. Н., Рыльцев В. В. Биологически активные текстильные материалы. М.: Информэлектро, 2002. 248 с.
99. Юданова Т. Н. Полимерные раневые покрытия с ферментативным и антимикробным действием: дис. ... док хим. наук. М., 2004. 329 с.
100. Штильман М. И. Полимеры в биологически активных системах // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 5. С. 48-53.
101. Бородина Т. Н. Получение и исследование биodeградируемых полиэлектролитных микрокапсул с контролируемым выходом белков, ДНК и других биоактивных соединений: дис. ... канд. хим. наук. М., 2008. 121 с.
102. Коваленко Г. А. Иммобилизация оксидоредуктаз на неорганических носителях: дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск, 1984. 176 с.
103. Шкутина И. В. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на ионогенных и неионогенных носителях: дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, 2001. 145 с.
104. Самков А. А. Адсорбционно иммобилизованные нокардиоморфные актиномицеты в биоремедиации нефтезагрязненных объектов: дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2009. 158 с.
105. Samir A. Bhakta<sup>1</sup>, Elizabeth Evans<sup>1</sup>, Tomás E. Benavidez Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review // *Analytica Chemical Acta*. 2014. No.10. pp. 1-19.
106. Chen Zun, Kong Wei, Zhou Hui, Li Wei, Shen Jia-Cong. Исследование по иммобилизации глюкоамилазы на привитой крахмальной подложке // *Shengwuhua xue zazhi*. Chin. Biochem. j. 1995. No.2. pp. 150-154.
107. Sheffield Deborah J., Harry Tim R., Smith Arnold J., Rogers Lyndon J. Immobilisation of bromoperoxidase from *Corallina officinalis* *Biotechnol. Techn.* 1994. No.8, Vol. 8. pp. 579-582.

108. Schafhauser D. Y., Storey K. B. Immobilization of glucose isomerase onto granular chicken bone//Appl. Biochem. and Biotechnol. 1992. Vol. 32. pp. 79-87.
109. Пестовский Ю.С. Иммуобилизация пероксидазы хрена в гидрогеле и микрочастицах альгината кальция // Научный журнал КубГАУ. 2013. № 92(08). С. 18-22.
110. Hoesli C. A., Raghuram K., Kiang R. L. J., Mocinecová D., Hu X., Johnson J. D., Lacík I. Pancreatic Cell Immobilization in Alginate Beads Produced by Emulsion and Internal Gelation // Biotechnology and Bioengineering. 2011. Vol. 108(2). pp. 424-434.
111. Способ иммуобилизации алкогольоксидазы: пат. SU 1615179 СССР №1615179; заявл. 23.05.88; опубл. 23.12.90. 4 с.
112. Пучкаев А. В., Метелица Д. И. Влияние степени гидратации обращенных мицелл аэрозоля ОТ и концентрации солюбилизированной уреазы на её стабильность // Биохимия. 1996. С. 25-31.
113. Бородина Т. Н. Получение и исследование биodeградируемых полиэлектролитных микрокапсул с контролируемым выходом белков, ДНК и других биоактивных соединений: дис. ... канд. хим. наук. М., 2008. 121 с.
114. Sukhorukov G. B., Antipov A. A., Voigt A., Donath E., Möhwald H. pH-Controlled Macromolecule Encapsulation in and Release from Polyelectrolyte Multilayer Nanocapsules // Macromol. Rapid Commun. 2001. Vol. 22. pp. 44-46.
115. Tiourina O. P., Sukhorukov G. B. Multilayer alginate/protamine micro-sized capsules: encapsulation of  $\alpha$ -chymotrypsin and controlled release study // Inter. J. of pharm. 2002. No.1-2, Vol. 242. pp. 155-161.
116. Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F., Sampaio P. Alginate/Chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery // Pharmaceutical Research. 2007. No.12, Vol. 24. pp. 2198-2206.
117. Kevin A. Janes, Marie P. Fresneau, Ana Marazuela Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin // Journal of Controlled Release. 2001. No.73. pp. 255-267.

118. Ramadas M, Paul W, Dileep KJ, Anitha Y, Sharma CP, Lipoinulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats // *J. Microencapsul.* 2000. No.4, Vol. 17. pp. 405-411.
119. Марквичева Е. А., Купцова С. В., Вихорева Г. А., Мареева Т. Ю. Хитозан-перспективный полимер для микрокапсулирования животных клеток и их использования в биомедицине: материалы 6 международной конференции "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М., 2001. С. 212-216.
120. Беляева А. В., Аникина О.М., Кинетические характеристики субтилизина 72, иммобилизованного на криогеле ПВС: материалы международной конференции студентов и аспирантов «Ломоносов», секция «Химия». М., 2003. 102 с.
121. Matsumoto M. Immobilization of lipase in microcapsules prepared by organic and inorganic materials / Matsumoto M., Sumi N., Ohmori K, Kondo K. // *Process Biochem.* 1998. Vol. 33. pp. 535-540.
122. Wright Wayne W, Baez Juan Carlos, Vanderkooi Jane M. II (Mixed trehalose/sucrose glasses used for protein incorporation as studied by infrared and optical spectroscopy // *J. Biochem.* 2002. No.1, Vol. 307. pp. 167-172.
123. Huzjak D., Huzjak Jasna, Krizanik J. The stability of p - galaktosi-dase (*Aspegillus oryzae*) immobilized on Eupergit C // *Pregramb.-tehnol. I bio-tehnol. rew.* 1994. No.4, Vol. 32. pp. 177 - 179.
124. Mehrnoush Amid, Yazid Manap Microencapsulation of Purified Amylase Enzyme from Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Peel in Arabic Gum-Chitosan using Freeze Drying // *Molecules.* 2014. No.19(3). pp. 3731-3743.
125. Каплун А. П., Ле Банг Шон, Краснопольский Ю. М. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ // *Вопр. мед. химии.* 1999. Т.45, № 1. С. 3-13.
126. Gradzielski M., Raphael M. Experimental Aspects of Colloidal Interactions in Mixed Systems of Liposome and Inorganic Nanoparticle and Their Applications

// International Journal of Molecular Sciences. 2012. No.9, Vol. 13. pp. 11610-11642.

127. Dash Tapaswi Rani Liposome as a potential drug delivery system: a review

// International Research Journal of Pharmacy. 2013. No.1. Vol. 4. pp. 6-12.

128. Шереметьев С. В. Ковалентная и электростатическая иммобилизация органических реагентов к полимерной и гелевой матрицам и чувствительные элементы на их основе: дис. ... канд. хим. наук. М., 2006. 194 с.

129. Ожимкова Е. В. Иммобилизованные на полимерных носителях гликозидазы – катализаторы гидролиза гетерополисахаридов: дис. ...канд. хим. наук. М., 2009. 137 с.

130. Григорьева М. А. Иммобилизации ферментов как способ получения эффективного препарата для практического применения // Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2008. № 1. С. 97-107.

131. Чернова В. В. Деструкция хитозана под действием некоторых ферментных препаратов медицинского назначения: дис. ... канд. хим. наук. Уфа, 2011. 197 с.

132. Сливкин А. И., Лапенко В. Л., Арзамасцев А. П., Болгов А. А. Аминоглюканы. в качестве биологически активных компонентов лекарственных средств // Вестник ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация. 2005. № 2. С. 73-87.

133. Коржиков В. А. Биофункциональные полимерно-неорганические носители для инженерии костной ткани: дис. ... канд. хим. наук. СПб., 2009. 151 с.

134. Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures / E. Katchalski-Katzir // Trends in Biotechnology. 1993. Vol. 11. pp. 471–478.

135. Коваленко Г. А. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов // Биотехнология. 2002. № 5. С. 81-93.



136. Коваленко Г. А. Каталитические свойства глюкоамилазы, иммобилизованной на углеродном носителе сибуните // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 4. С. 412-418.
137. Ковалева Т. А. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на кремниевых пластинках с целью разработки биосенсора // Биотехнология. 2011. № 3. С. 50-56.
138. Еремин А. Н. Иммобилизация внеклеточной глюкозооксидазы *PenicilliumFuniculosum* 46.1 на геле гидроксидов алюминия и цинка // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42, № 2. С. 156-162.
139. I. Stolarzewicz Immobilization of Yeast on Polymeric Supports // *Chemical And Biochemical Engineering*. 2011. No.1, Vol. 25. pp. 135-144.
140. Blandino A. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules // *Process Biochemistry*. 2001. Vol. 36. pp. 601-606.
141. Аванесян С. С. Биodeградируемые материалы на основе полисахаридов и белковых компонентов // Перспективные разработки науки и техники. 2008. Вып. 11. С. 42-46.
142. Ямпольская Г. П. Мономолекулярные слои белков и перспективы конструирования наноматериалов на их основе // Вестник Московского университета. Серия 2, Химия. 2001. Т. 42, № 5. С. 355-362.
143. Murata Y.; Kofuji K.; Kawashima S. Preparation of floating alginate beads for drug delivery to gastric mucosa // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2003. No.14. pp. 581-588.
144. Enas N. Danial Amal H. Hamza Rasha H. Mahmoud Characteristics of Immobilized Urease on Grafted Alginate Bead Systems // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2015. No.8(2). pp. 147-153.
145. Климова О. А., Чеботарев В. Ю. Препараты коллагенолитических протеаз беспозвоночных: биохимические аспекты медицинского и косметологического применения // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 130, № 7. С. 70–75.

146. Величко Т. И. Имобилизация некоторых антибиотиков и гепарина на коллагеновых материалах: дис. ... канд. хим. наук. М., 1991. 152 с.
147. Кудрявцев Г. И., Носов М. П., Волошина А. В. Полиамидные волокна. М.: Химия, 1976. С. 73.
148. Amao Y. Optical CO<sub>2</sub> sensor of the combination of colorimetric change of a-naphtholphthalein in poly(isobutyl methacrylate) and fluorescent porphyrin in polystyrene / Y. Amao, T. Komori // *Talanta*. 2005. No.4, Vol. 66. pp. 976-981.
149. Dmitrienko S.G. Chemical reactions of terminal groups in polyurethane foams // *Mendeleev Commun.* 2000. No.6. pp. 244-245.
150. Петухов Б. В. Полиэфирные волокна. М.: Химия, 1976. С. 260.
151. Gupte A. Stabilization of alginate beads using radiation polymerized polyacrylamide // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1999. Vol. 40. pp. 39-44.
152. Tauber M.M. Nitrile hydratase and amidase from *Rhodococcus rhodochrous* hydrolyze acrylic fibers and granular polyacrylonitriles // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. No.4, Vol. 66. pp. 1634-1638.
153. Гальбрайх Л. С. Целлюлоза и ее производные // Соросовский обр. журнал. Химия. 1996. С. 47 - 53.
154. Терентьев Э. П., Удовенко Н. К., Павлова Е. А. Основы химии целлюлозы и древесины // учебно-методическое пособие ГОУВПО СПбГТУ РП. СПб. 2010. 23 с.
155. Voskoboinikov I. V., Konstantinova S. A., Korotkov A. N., Gal'braikh L. S. Process for preparing nanocrystalline cellulose // *Fibre Chemistry*. 2011. No.2, Vol. 43. pp. 125-128.
156. Трофимова Н. Н., Бабкин В. А. Изучение кислотного гидролиза полисахаридов древесины лиственницы для получения кристаллической глюкозы // *Химия растительного сырья*. 2009. № 3. С. 31-37.
157. Торлопов М. А., Тарабукин Д. В., Фролова С. В. Ферментативный гидролиз порошков целлюлоз, полученных различными методами // *Химия растительного сырья*. 2007. № 3. С. 69–76.

158. Болобова А. В., Аскадский А. А., Кондращенко В. И., Рабинович М. Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов: Ферменты, модели, процессы. М.: Наука, 2002. 343 с.
159. Роговин З. А. Химия целлюлозы. М.: Химия, 1972. 244 с.
160. Сюткин В. Н., Николаев А. Г., Сажин С. А. и др. Азотсодержащие производные диальдегидцеллюлозы. Диальдегидцеллюлоза высокой степени окисления // Химия растительного сырья. 1999. № 2. С. 91-102.
161. Рабинович М. Л., Мельник М. С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Успехи биологической химии. 2000. Т. 40. С. 205—266.
162. Кричевский Г. Е. Химическая технология текстильных материалов. М.: Наука, 2000. С. 27-216.
163. Обыденникова Т. Н., Усов В. В., Терехов С. М., Якушин С. В. Использование современных раневых покрытий в комплексном лечении ожоговых ран // Бюллетень ВСНЦ СО РАН. 2007. № 4 (56). С. 127-129.
164. Кильдеева Н. Р., Бабак В. Г., Вихорева Г. А., Агеев Е. П., Голуб М. А. Новый подход к созданию материалов с контролируемым выделением лекарственного вещества // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2000. Т. 41, № 6. С. 423-425.
165. Москвичев Б. В., Поляк М. С. Имобилизованные ферменты. Серпухов: Наука, 1992. 112 с.
166. Malaprade L. Glycol Oxidative Cleavage // Compt. Rend. 1928 . Vol. 186. P. 382.
167. Иванов В. И., Леншина Н. Я., Иванова В. С. Об особенностях окисления целлюлозы перйодатом натрия и хлоритом натрия // Изв. АН СССР отд. хим. наук. 1958. № 5. С. 775-777.
168. Глупова З. А. Новые композиционные материалы на основе диальдегидцеллюлозы и гуанидинсодержащих соединений: дис. ... канд. хим. наук. Нальчик, 2013. 142 с.

169. Сравнительные характеристики традиционных перевязочных материалов и новых текстильных носителей для иммобилизации биологически активных веществ: сб. науч. трудов./ ВНИИТГП, под ред. Самойлова Т. И. М.: ЦНИИТЭИлегпром, 1988. С. 29–35.
170. Целлюлоза, обладающая биоцидными свойствами: пат. С08В15/06 Рос. Федерация. №2435785; заявл. 18.12.09; опубл. 10.12.11, 3 с.
171. Грядских Д. А. Синтез композиционных аффинных сорбентов с магнитными свойствами и их технологическое использование при изготовлении чумных иммунобиологических препаратов: дис. канд. биол. наук. Ставрополь, 2004. 153 с.
172. Жоголев К. Д., Никитин В. Ю., Цыган В. Н., Егоров В. Н. Хитозан в медицине и рациональном питании. // Медицина XXI века. СПб. 2000. 24 с.
173. Pradip Kumar Dutta, Joydeep Dutta, Tripathi V.S. Chitin and chitosan: Chemistry, Properties and Applications // Journal of Scientific and Industrial Research. 2004. Vol. 63. pp. 20-31.
174. George A. F. Roberts Thirty years of progress in chitin and chitosan // Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. 2008. Vol. 13. pp. 7-15.
175. Гальбрайт Л. С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение // Соросовский образовательный журнал. 2001. № 1. С. 51-56.
176. Chen P. H., Kuo T. Y., Kuo J. Y., Tseng Y. P., Wang D. M., Lai J. Y., Hsieh H. J. Novel chitosan–pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration // Carbohydrate Polymers. 2010. Vol. 82. pp. 1236–1242.
177. Пестов А. В. N-(2-карбоксиэтил) хитозан: синтез, свойства, применение: дис. ... канд. хим. наук. Екатеринбург, 2007. 153 с.
178. Брыкалов А. В. Новые композиционные носители для иммобилизации ферментов // Современные достижения биотехнологии: Материалы Всерос. конф. Ставрополь. 1996. С. 279.

179. Chen L., Tianqing L. Interaction behaviors between chitosan and hemoglobin // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008. Vol. 42. pp. 441–446.
180. Kato A. Industrial application of Maillard-Type conjugates // *Food Science Technology Resech*. 2002. Vol. 8. pp. 193-199.
181. Shumilina D. V., Iina A. V., Kulikov S. N., Dzhavakhiya V. G. Elicitor activity of MF-3 protein from *Pseudomonas fluorescens* and combination of MF-3 protein with chitosan in different host – pathogen pairs // *Proc.6 Int. Conf. Of EUCHIS-04*. 2005. pp. 275-278.
182. Бакулин А. В. Получение и исследование комплексов хитозана и его производных с белками и меланинами: дис. канд. техн. наук. М., 2011, 131 с.
183. Mei Dai, XiuLing Zheng, Xu Xu, XiangYe Kong, XingYi Li Chitosan-Alginate Sponge: Preparation and Application in Curcumin Delivery for DermalWound Healing in Rat // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009. pp. 1-8.
184. Saether H. V., Holme H. K., Maurstad G., Smidsrod O., Stokke B. T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan // *Carbohydrate Polymers*. 2008. Vol.74. pp. 813–821.
185. Huguet M. L., Neufeld R. J., Dellacherie E. Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: comparison of chitosan and DEAE-dextran // *Process Biochem*. 1996. Vol. 31. pp. 347–353.
186. George M., Abraham T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review // *Journal of Controlled Release*. 2006. Vol. 114. P. 14.
187. Нудьга Л. А., Петрова В. А., Гофман И. В. и др. Изучение комплексообразования хитозана и природных поликислот и пленочные материалы на основе поликомплексов // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Мат. VII Междунар. Конф. Санкт-Петербург – Репино*. 2003. С. 336-340.

188. Yan X. Khor E., Lim L. Y. Chitosan –alginate films prepared with chitosans of different molecular weights // *Journal Biomedicine Material Research (Appl. Biomater.)*. 2001. No.4, Vol. 58. pp. 358-365.
189. Балышева В. И., Аронов Р. Б., Жестерев В. И. и др. Иммобилизация перевариваемых клеток ПСГК-60 и гибридных клеток SS-3 в альгинат-хитозановые микрокапсулы // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Мат. VII Междунар. Конф. Санкт-Петербург – Репино. 2003. С. 224-226.*
190. Федоров В. Д., Чиж И. М. Биологические активные перевязочные средства в комплексном лечении гнойно-некротических ран: метод. рек-ции. Железногорск, 2000. 36 с.
191. Arguelles-Monal W., Garciga M., Peniche-Covas C. Study of the stochiometric polyelectrolyte complex between chitosan and carboxymethyl cellulose // *Polimer Bull.* 1990. No.3. Vol. 23. pp. 307-313.
192. Роговина С. З., Акопова Т. А., Вихорева Г. А. и др. Получение двухкомпонентных систем хитозан-целлюлоза смешением в твердом состоянии// *Материалы Пятой Конференции Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Мат. V Междунар. конф. Москва-Щелково. 1999. С. 62-65.*
193. Se-Kwon Kim Chitin, Chitosan, Oligosacharides and their Derivatives // *Biological Activities and Applications / Ed. S.K. Kim. London, N.Y.: CRC Press. P. 633.*
194. Hengameh Honarkar, Mehdi Barikani Applications of biopolymers I: chitosan // *Monatsh Chem.* 2009. Vol. 140. pp. 1403–1420.
195. Ueno H., T. Mori, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan // *Delivery Reviews.* 2001. No.2. Vol. 52. pp. 105–115.
196. Жоголев К. Н., Никитин В. Ю., Буланьков Ю. И. Изучение влияния препаратов хитина и хитозана на течение раневого процесса // *Актуальные проблемы гнойно-септических инфекций.* 1996. С. 36-37.

197. Григорьева М. В. Полимерные системы с контролируемым высвобождением биологически активных соединений // Биотехнология. 2011. Т. 4, № 2. 15 с.
198. Скрыбина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 368 с.
199. Shi L. E., X. J. Fang, L. Y. Xing, M. Chen and D.S. Zhu Chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for biomedical engineering // J.Chem. Soc. Pak. 2011. No.33. pp. 929-934.
200. Ермак И. М. Взаимодействие бактериальных липополисахаридов с белками и полисахаридами. Модификация физиологической активности липополисахаридов: дис. док. хим. наук. Владивосток., 2006. 270 с.
201. Сафронова Т. М., Максимова С. Н., Ситникова Е. В. Антимикробная активность хитозана в пищевых средах // Рыбпром. Технология. 2007. № 2. с. 22-25.
202. Ma J., Wang H., He B., Chen, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts // Biomaterials. 2001. No.4, Vol. 22. pp. 331-336.
203. Albanna M. Z., Bou-Akl T. H., Blowytsky O., Walters III H. L., Matthew, H. W. Chitosan fibers with improved biological and mechanical properties for tissue engineering applications // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. 2012. Vol. 20. pp. 217-226.
204. Gu J., Hu W., Deng A., Zhao Q., Lu S., Gu X. Surgical repair of a 30 mm long human median nerve defect in the distal forearm by implantation of a chitosan – PGA nerve guidance conduit // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2012. No.2, Vol. 6. pp. 163-168.
205. Jinchen Sun, Huaping Tan Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications // Materials. 2013. No.6(4). pp. 1285-1309.

206. Mario Grassi, Chiara Sandolo, Danilo Perin, Tommasina Coviello Structural Characterization of Calcium Alginate Matrices by Means of Mechanical and Release Tests // *Molecules*. 2009. No.14. pp. 3003-3017.
207. Yan Zhou, Shin'ichiro Kajiyama, Hiroshi Masuhara, Yoichiro Hosokawa A new size and shape controlling method for producing calcium alginate beads with immobilized proteins // *J. Biomedical Science and Engineering*. 2009. No.2. pp. 287-293.
208. Hurteaux R., Edwards-Lévy F., Laurent-Maquin D., Lévy M. C. Coating alginate microspheres with a serum albumin-alginate membrane: application to the encapsulation of a peptide // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005. No.24. pp. 187–197.
209. Tan H., Wu. J., Huang D., Gao C. The design of biodegradable microcarriers for induced cell aggregation // *Macromol. Biosci.* 2010. No.10. pp. 156–163.
210. Abdi S.I.H., Choi J.Y., Lee J.S., Lim H.J., Lee C., Kim J. In vitro study of a blended hydrogel composed of Pluronic F-127-alginate-hyaluronic acid for its cell injection application // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. No.9. pp. 1–9.
211. Успенский Ю. П., Барышникова Н. В. Оптимизация лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: эффективность использования комбинации альгинатов и антацидов // Приложение *Consiliummedicum*. Гастроэнтерология. 2014. № 1 (17). С. 14-17.
212. Беспалов В. Г. Альгинат кальция. Источник растворимых пищевых волокон и кальция. М., 2010. 26 с.
213. Имбс Т. И. Полисахариды и низкомолекулярные метаболиты некоторых массовых видов бурых водорослей морей Дальнего Востока России. Способ комплексной переработки водорослей: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 2010. 119 с.
214. Claire Jouannin, Chloë Vincent, Isabelle Dez, Annie-Claude Gaumont, Thierry Vincent Study of Alginate-Supported Ionic Liquid and Pd Catalysts // *Nanomaterials*. 2012. No.2. pp. 31-53.
215. Филимонова Е. Ю., Яковлева Т. П. Оптимизация рецептурного состава альгинат содержащего плодово-ягодного десерта «Облепиха» // *Современные*



технологии продуктов питания: теория и практика производства. Омск. 2010. С. 289-291.

216. Gargi Dey, Bhupinder Singh, Rintu Banerjee Immobilization of  $\alpha$ -Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313 // BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY. 2003. No.2, Vol. 46. pp. 167-176.

217. Alsberg E., Anderson K. W. Cell-interactive Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering // Research reports. Biomaterials and Bioengineering. 2001. No.80(11). pp. 2025-2029.

218. Гурин А. Н., Комдев В. С., Федотов А. Ю. Сравнительная характеристика материалов на основе хитозана, альгината и фибрина в комплексе с р-трикальцийфосфатом для остеопластики (экспериментально-морфологическое исследование) // Стоматология. 2014. Т.93, № 1 С. 4-10.

219. Muhammad Iqbal Sabir , Xiaoxue Xu Li Li A review on biodegradable polymeric materials for bone tissueengineering applications // J. Mater. Sci. 2009. No.44. pp. 5713-5724.

220. Красноштанова А. А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности: дис. док. ... хим.наук. М., 2009. 290 с.

221. Павленко Н. М. Определение протеолитической активности ферментных препаратов // Известия вузов. Пищевая технология. 1968. № 8. С. 1059-1089.

222. Smith M., Cornish-Bowden A., Briggs D. The determination of barley amylase activity // J. Inst. Brew. 1979. No.3. pp. 157-159.

223. Пряхина Л. Г., Романюк Г. Г. и др. Новый метод определения активности липазы зерновых культур // Известия вузов. Пищевая технология. 1980. № 1. С. 102-104.

224. Васильев А. В., Гриненко Е. В., Щукин А. О. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений. СПб.: СПбГЛТА, 2007. 29 с.

225. Maninder S., Vasudevan P., Ray A.R., Guha S.K. Kinetics of degradation of biosoluble matrix by  $^{14}\text{C}$  tagging // Proc. Symp. Ing. Polym. And Radiat., Vallabh Vidyanagar Gujarat. 1979. pp. 385-390.
226. Димов К. Д., Лалева В. Н. Изменение функциональных групп при окислении целлюлозы йодной кислотой // ВМС. 1967. Т.9. № 8. С. 1646-1653.
227. Rutherford H. A., Minor F. W., Martin A. R. and Harris M. Oxidation of cellulose: the reaction of cellulose with periodic acid // J. of res. of the N. B. S. 1972. Vol. 29. pp. 131-143.
228. Sarmiento B., Ribeiro A. J., Veiga F. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation // J. Nanosci. Nanotechnol. 2007. pp. 2833-2841.
229. Coppi G., Iannuccelli V., Leo E, Bernabei M. T. Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles // J. Microencapsul. 2002. pp. 37-44.
230. Суясов Н. А., Шакир И. В., Панфилов В. И. Повышение эффективности биodeградации жиросодержащих отходов пищевой промышленности // Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. 2005. С. 337-338.
231. Воробьева И. С., Попов М. П. Модифицированный метод определения активности амилаз зерна по числу падения // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. № 4. С. 455-458.
232. Мартиросова Е. И. Изучение роли алкилоксибензолов в стабилизации и модуляции активности ферментных белков вещества: дис. ... канд. биол. наук. М., 2007. 150 с.
233. Тишков В. И., Углавнова С. В., Федорчук В. В. Влияние ионной силы и рН среды на термостабильность дрожжевой формиаатдегидрогеназы // АСТА NATURAE. 2010. № 2(5). Т.2. С. 86-92.
234. Мартиросова Е. И., Николаев Ю. А., Шаненко Е. Ф., Эль-Регистан Г. И. Использование алкилоксибензолов для повышения активности и стабильности ферментов // Химическая технология. 2007. №6. С. 250-256.

235. Антонов Е. Н., Баграташвили В. Н., Бородина Т. Н. Влияние селективного лазерного спекания на активность трипсина, инкапсулированного в полилактид // Альманах клинической медицины. 2008. № 17-2. С. 30-32.
236. Способ лечения гнойных заболеваний мягких тканей: пат. А61N5/067 Рос. Федерация. №2164427; заявл. 10.04.2005; опубл. 27.08.2006, 3с.
237. Белов А. А., Филатов В. Н. Полиферментные текстильные материалы: сб. науч. трудов. М.: Дипак, 2008. С. 26-31.
238. Медушева Е. О., Филатов Н.В. Применение повязки «Мультиферм» в лечение больных с трофическими язвами венозного генеза: сб. науч. трудов. М.: Дипак, 2008. С. 38-40.
239. Ковалева Т. А., Кожокина О. М., Багно О. П. Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах // Сорбционные и хроматографические процессы. Воронеж. 2008. Т.8. С.1035-1041.
240. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф., Григорьева Г.А. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на амфотерных полиэлектролитах // Журнал физической химии. 2001. Т.75, №11. С.2008 - 2010.
241. Шкутина И. В., Стоянова О. Ф., Лунина В. В. Влияние ионной формы полиамфолита АНКБ-2 на иммобилизацию ферментов // Сорбционные и хроматографические процессы. Воронеж. 2009. Т.9. С. 247-253.
242. Белова А. Б., Можяев В. В., Левашов А. В. и др. Взаимосвязь физико-химических характеристик органических растворителей с их денатурирующей способностью по отношению к белкам // Биохимия. 1991. Т.56, № 11. С. 1923-1945.
243. Belov A. A., Korotaeva A. I., Raspopova E. A. Influence solutions of glycerol on the enzymatic activity of Proteolytic complex of Hepatopancreas crab stabilized polysaccharide compounds // Chemical Technology. 2015. pp. 74-86.

244. Kazan D., Ertan H., Erarslan A. Stabilization of Escherichia coli Penicilin G Acylase Against. Thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialdehyde Polymers // Applied Microbiology and Biotechnolgy. 1997. No.48(2). pp. 191-197.
245. Киричко Н. А. Разработка кормовых продуктов на основе вторичных сырьевых ресурсов: дис. ... канд. тех. наук. М., 2005. С. 7-13.
246. Суясов Н. А. Использование жировых отходов мясопереработки в качестве сырья для получения белковой кормовой добавки: дис. ... канд. техн. наук. М., 2007. 156 с.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 - Характеристичные колебательные частоты индивидуальных соединений (нативные ферменты, полисахариды), носителей, иммобилизованных систем

Частота, см <sup>-1</sup>	Интенсивность	Характеристика колебательных частот
1	2	3
<b>Трипсин КРС</b>		
433,52-778,96	0,052-0,301	фоновые колебания
778,96	0,451	C <sub>аром.</sub> -H деформационные
1328,34	0,542	O-H свободная, деформационные
1437,18	0,421	C <sub>sp3</sub> - деформационные
1629,78	0,191	C=O валентные
2903,12	0,372	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3380,93	0,682	=NH- валентные
3628,52	0,491	O-H свободные валентные
<b>Протеолитический комплекс</b>		
1008,44	0,034	C-O первичные спирты
1394,90	0,021	O-H свободная, деформационные
1521,29	0,028	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> деформационные
1636,66	0,029	C=O валентные
2342,77-2360,77	0,025-0,031	=NH, -NH <sub>2</sub> валентные
3383,90	0,014	=NH- валентные
<b>Амилаза гриба <i>Aspergillus oryzae</i></b>		
427,93-896,93	0,004-0,014	фоновые колебания
1022,38	0,039	C-O первичные спирты
1196,64	0,026	C-O вторичные спирты
1384,77	0,029	O-H свободные деформационные
1543,41	0,031	-C=C- бензольное кольцо (от фенилаланина)
1626,56	0,041	C=O валентные
2928,50	0,035	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3300,36	0,046	NH <sub>2</sub> – валентные (первичные амины)
<b>Липаза КРС</b>		
561,16-987,96	0,103-0,172	фоновые колебания
1094,18	0,325	C-O первичные спирты
1168,30	0,261	C-O вторичные спирты
1396,33	0,231	O-H свободные деформационные
1543,21	0,272	-NH деформационные
1660,96	0,351	C=O валентные
2840,57-2917,50	0,192-0,311	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3334,10	0,370	NH <sub>2</sub> –валентные первичные амины
<b>Хитозан</b>		
522,90-894,97	0,220-0,252	фоновые колебания

1	2	3
1032,15-1079,17	0,420-0442	С-О первичные спирты
1154,82	0,342	С-О вторичные спирты
1595,92-1656,72	0,231-0,241	-NH <sub>2</sub> деформационные первичные амины
2876,79	0,262	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3366,53	0,341	NH <sub>2</sub> –валентные первичные амины
Альгинат натрия		
431,46-945,85	0,122-0,131	фоновые колебания
1090,66-1027,66-	0,142-0,163	С-О первичные спирты
1125,69	0,133	С-О вторичные спирты
1417,96	0,141	О-Н свободные деформационные
1607,87	0,151	COO <sup>-</sup> валентные
2933,15	0,105	-СНО карбонильные группы
3358,14	0,122	О-Н связанная Н-связью
Целлюлоза		
1062,59	0,069	С-О первичные спирты
1106,05	0,043	С-О вторичные спирты
1332,90-1426,91	0,018-0,022	О-Н свободные деформационные
2896,37	0,025	-СНО карбонильные группы
3262,70-3328,74	0,025-0,026	О-Н связанная Н-связью
Целлюлоза-хитозан		
1026,21-1062,54	0,072-0,082	С-О первичные спирты
1103,90	0,041	С-О вторичные спирты
1333,46	0,021	О-Н свободные деформационные
1426,73	0,011	О-Н свободные деформационные
1558,74	0,022	-NH деформационные
1663,02	0,061	C=N азометиновая связь
2649,93-2917,72	0,022	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3269,28-3326,26	0,031	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-альгинат натрия		
789,98-893,83	0,031-0,033	фоновые колебания
1026,30	0,082	С-О первичные спирты
1159,80	0,071	-O-CH <sub>2</sub> - простая эфирная связь
1313,29-1333,23	0,022	О-Н свободные деформационные
1426,52	0,011	О-Н свободные деформационные
2849,61-2916,99	0,012-0,022	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3262,07-3321,36	0,031	О-Н связанная Н-связью
Целлюлоза-трипсин		
783,77-896,29	0,020-0,031	фоновые колебания
1026,38-1051,45	0,070-0,082	С-О первичные спирты
1104,49-1160,25	0,042	С-О вторичные спирты

1	2	3
1313,51-1360,46	0,021	О-Н свободные деформационные
1426,67	0,014	О-Н свободные деформационные
1561,10	0,023	-NH деформационные
1660,03	0,030	C=O валентные
1673,22	0,022	C=N азометиновая связь
2655,04	0,023	-CHO карбонильные группы
3087,01	0,032	C-H валентные
3328,74-3362,70	0,023	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-протеолитический комплекс		
1026,40	0,031	C-O первичные спирты
1400,96	0,017	О-Н свободные деформационные
1568,22	0,018	-NH деформационные
2375,75	0,005	=NH, -NH <sub>2</sub> валентные
2935,18	0,006	-CHO карбонильные группы
3377,58	0,008	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-амилаза		
786,11-897,64	0,030-0,045	фоновые колебания
1062,38	0,072	C-O первичные спирты
1106,06-1160,01	0,027-0,036	C-O вторичные спирты
1314,15-1336,90	0,020-0,024	О-Н свободные деформационные
1585,50	0,031	-NH деформационные
1670,05	0,036	C=O валентные
1677,10	0,029	C=N азометиновая связь
2896,57	0,015	-CHO карбонильные группы
3044,88	0,038	О-Н деформационные
3262,70-3328,74	0,025-0,026	NH <sub>2</sub> -валентные первичные амины
Целлюлоза-липаза		
785,11-897,04	0,030-0,044	фоновые колебания
1026,29-1052,59	0,075	C-O спирты первичные
1105,05	0,043	C-O вторичные спирты
1498,88	0,018	О-Н свободные деформационные
1608,12	0,027	-NH деформационные
1673,11	0,021	C=N азометиновая связь
3058,22	0,024	О-Н деформационные
3339,21-3354,69	0,025-0,026	О-Н связанная Н-связью валентные
Хитозан-трипсин		
424,34-894,97	0,255-0,267	фоновые колебания
1032,15-1079,14	0,421-0,442	C-O первичные спирты
1154,82	0,353	C-O вторичные спирты
1560,02	0,351	COO <sup>-</sup> аминокислоты

1	2	3
1595,92	0,234	-NH деформационные
1656,72	0,242	C=O валентные
1672,98	0,311	C=N азометиновая связь
2876,79	0,257	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3088,12	0,321	O-H деформационные
3366,53	0,340	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Альгинат натрия-трипсин		
412,70-945,85	0,138-0,124	фоновые колебания
1027,66-1090,47	0,156-0,145	C-O первичные спирты
1125,69	0,138	C-O вторичные спирты
1565,03	0,145	-NH деформационные
1607,87	0,144	C=C-C=C сопряженные двойные связи
1661,34	0,140	C=O валентные
2830,93	0,083	-CHO карбонильные группы
2933,15	0,103	-CHO карбонильные группы
3078,13	0,111	O-H деформационные
3358,14	0,123	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Хитозан-протеолитический комплекс		
1022,80	0,017	C-O первичные спирты
1560,41	0,008	-NH деформационные
1670,54	0,012	C=N азометиновая связь
3322,96	0,006	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Хитозан-амилаза		
522,93-894,97	0,255	фоновые колебания
1033,32-1078,79	0,422	C-O первичные спирты
1154,82	0,353	C-O вторичные спирты
1561,07	0,311	COO <sup>-</sup> аминокислоты
1595,92	0,234	-NH деформационные
1658,11	0,312	C=O валентные
1673,04	0,213	N=C азометиновая связь
2876,79	0,257	-CHO карбонильные группы
3089,10	0,292	O-H деформационные
3371,15	0,341	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Альгинат натрия-амилаза		
431,46-945,85	0,137-0,124	фоновые колебания
1026,96-1090,47	0,156-0,145	C-O первичные спирты
1125,96	0,156	C-O вторичные спирты
1608,22	0,127	C=C-C=C сопряженные двойные связи
1660,08	0,132	C=O валентные
2731,02	0,084	-CHO карбонильные группы



1	2	3
2931,97	0,140	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3075,11	0,110	O-H деформационные
3359,07	0,122	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Хитозан-липаза		
664,11-895,11	0,251-565,89	фоновые колебания
1033,66	0,408	C-O первичные спирты
1076,65	0,449	C-O первичные спирты
1155,20	0,344	C-O вторичные спирты
1589,12	0,297	-NH деформационные
1672,18	0,305	N=C азометиновая связь
2879,02	0,265	C <sub>sp3</sub> -H валентные
3365,65	0,342	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Альгинат натрия-липаза		
412,70-945,85	0,138-0,124	фоновые колебания
1027,66-1090,47	0,421	C-O первичные спирты
1124,98	0,136	C-O вторичные спирты
1475,44-1421,03	0,122-0,111	O-H свободные деформационные
1607,22	0,132	C=C-C=C сопряженные двойные связи
1662,45	0,124	N=C, валентные
2730,85	0,086	-CHO карбонильные группы
3074,88	0,115	O-H деформационные
3354,12	0,122	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-альгинат натрия-трипсин		
783,77-896,29	0,027-0,038	фоновые колебания
1026,38-1051,45	0,068-0,073	C-O первичные спирты
1104,49-1160,25	0,028-0,041	C-O вторичные спирты
1313,51-1360,46	0,015-0,021	O-H свободные деформационные
1426,67	0,016	O-H свободные деформационные
1670,25	0,061	N=C азометиновая связь
1720,52	0,032	C=O валентные
2894,20	0,019	-CHO карбонильные группы
3031,12	0,041	O-H деформационные
3280,51-3328,68	0,021-0,022	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-хитозан-трипсин		
700,54-897,27	0,032-0,043	фоновые колебания
1026,33-1052,33	0,072-0,088	C-O первичные спирты
1103,52-1160,35	0,034-0,042	C-O вторичные спирты
1313,16-1359,52	0,023-0,031	O-H свободные деформационные
1427,07	0,023	O-H свободные деформационные
1675,04	0,065	N=C азометиновая связь

1	2	3
2897,38	0,053	-CHO карбонильные группы
3229,99-3264,29	0,033-0,035	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-хитозан-протеолитический комплекс		
1027,28-1062,76	0,078-0,086	фоновые колебания
1125,88	0,027	C-O вторичные спирты
1313,39	0,021	O-H свободные деформационные
1645,92	0,041	N=C азометиновая связь
2894,03	0,046	-CHO карбонильные группы
3266,44	0,034	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-хитозан-амилаза		
700,54-897,25	0,054-0,052	фоновые колебания
1026,93-1052,33	0,072-0,089	C-O первичные спирты
1103,52-1202,98	0,052	C-O вторичные спирты
1313,16-1333,97	0,028-0,032	O-H свободные деформационные
1427,07	0,018	O-H свободные деформационные
1583,83	0,040	-NH деформационные
1656,15	0,025	C=O валентные
1677,12	0,033	N=C азометиновая связь
2897,38	0,022	-CHO карбонильные группы
3087,89	0,055	O-H деформационные
3262,70-3328,74	0,026-0,027	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Целлюлоза-альгинат натрия-амилаза		
700,54-897,25	0,054-0,052	фоновые колебания
1026,93-1052,33	0,072-0,089	C-O первичные спирты
1155,33	0,085	-O-CH <sub>2</sub> - простая эфирная связь
1313,16-1333,97	0,028-0,032	O-H свободные деформационные
1427,07	0,018	O-H свободные деформационные
1583,83	0,040	-NH деформационные
1656,15	0,025	C=O валентные
1677,12	0,033	N=C азометиновая связь
2899,30	0,022	-CHO карбонильные группы
3032,02	0,055	O-H деформационные
3275,58-3332,33	0,026-0,027	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины
Микрочастицы липазы		
624,87-704,26	0,061-0,141	фоновые колебания
1026,82-1084,76	0,121-0,173	C-O первичные спирты
1123,20	0,071	C-O вторичные спирты
1595,22	0,081	-NH деформационные
1632,12	0,087	NH <sub>2</sub> - деформационные амины
2836,55	0,039	-CHO карбонильные группы
3287,87-3338,45	0,059-0,061	NH <sub>2</sub> – валентные первичные амины

Автор выражает глубокую признательность доценту кафедры биотехнологии, д.т.н. Белову Алексею Алексеевичу за помощь в проведении исследований по разработке и оценке эффективности раневых покрытий на основе препаратов протеаз.