

На правах рукописи



ВОЛОКИТИНА
Мария Владимировна

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАКТОРЫ
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ МАКРОПОРИСТЫХ СОРБЕНТОВ
МОНОЛИТНОГО ТИПА**

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)
02.00.06 – высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург – 2015

Работа выполнена в лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высокомолекулярных соединений Российской академии наук и на кафедре молекулярной биотехнологии факультета химической и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)» (Минобрнауки России)

Научные руководители: доктор биологических наук, доцент
Виноходов Дмитрий Олегович

кандидат химических наук, доцент
Влах Евгения Георгиевна

Официальные оппоненты: **Марквичева Елена Арнольдовна**
доктор химических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ведущий научный сотрудник

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич
доктор химических наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «1» марта 2016 года в 15 часов 00 минут на заседании Диссертационного совета Д. 501.001.59 по защите кандидатских и докторских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ (www.chem.msu.ru).

Автореферат разослан «___» января 2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.59
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время процессы *ферментативного катализа* представляют большой интерес для решения ряда научных и практических задач. Уникальные свойства ферментов, способных катализировать химические превращения в мягких условиях с высокой субстратной специфичностью, определили их применение во многих технологических и аналитических процессах, например в пищевой промышленности, фармацевтике, медицине, при создании биосенсоров, в процессах тонкого органического синтеза и т.д. Однако использование нативных ферментов имеет ряд ограничений, связанных как с высокой стоимостью и лабильностью структуры, так и с трудностями удаления ферментов из реакционной среды. С этой точки зрения более экономичным и технологичным способом проведения биокатализа является применение *гетерогенных биокатализаторов*, то есть ферментов, иммобилизованных на поверхности твердой фазы. Преимущества использования гетерогенных биокатализаторов очевидны: локализация белка на поверхности носителя способствует стабилизации его конформации, препятствуя, таким образом, денатурации и снижению каталитической активности, облегчает процесс отделения продуктов реакции, позволяет многократно использовать биокатализатор, а также автоматизировать биотехнологический процесс.

Одной из традиционных форм проточных систем для реализации гетерогенного биокатализа являются колонки, упакованные пористыми микрочастицами носителя, содержащими иммобилизованный фермент. Недостатки применения подобных систем, в первую очередь, связаны с особенностями массопереноса вещества внутри системы упакованных частиц. Так, массоперенос вещества контролируется диффузией субстрата в поры частиц стационарной фазы, что, как следствие, делает процесс медленным и малоэффективным. Увеличение скорости подачи раствора субстрата приводит к тому, что большая его часть протекает в межчастичном пространстве. Кроме того, упакованные колонки имеют тенденцию к деформации и усадке частиц сорбента при использовании высоких скоростей потока, что, в свою очередь, также крайне негативно сказывается на эффективности биокатализа. Таким образом, количество преобразованного в продукт субстрата существенно зависит от ряда факторов, таких как молекулярная диффузия, размеры пор и частиц, а также скорость потока субстрата.

Упомянутые недостатки упакованных систем могут быть преодолены при использовании нового поколения стационарных фаз, а именно, *макропористых полимерных материалов монолитного типа*. Данные материалы представляют собой полимерные монолиты (стержень, диск или трубку), пронизанные сетью капиллярных каналов, или *макропор*. Открытая структура проточных каналов этих материалов обеспечивает минимальное сопротивление потоку подвижной фазы, что способствует преобладанию конвективного механизма массопереноса над диффузионным. С увеличением скорости подачи раствора вещества становится возможным осуществление процессов с практически полным отсутствием диффузионных ограничений нормальному межфазовому переносу вещества. При этом вследствие резкого увеличения проницаемости сорбента существенно возрастает число возможных контактов вещества, находящегося в подвижной фазе, с поверхностью стационарной фазы.

Методология получения макропористых полимерных материалов была разработана и предложена в начале 90-х годов прошлого века. Однако исследования в области синтеза и практического применения полимерных монолитов не теряют своей актуальности и в настоящее время. В частности, эти системы широко используются в качестве стационарных фаз для проведения ряда аналитических и сепарационных процессов, а также активно исследуются как носители для реализации различных твердофазных реакций.

При выборе материала для иммобилизации ферментов использование гидрофильных полимерных матриц является преимущественным. Гидрофилизация поверхности способствует закреплению белка на поверхности в его активной конформации, а также приводит к уменьшению неспецифических гидрофобных взаимодействий веществ с поверхностью. В связи с этим получение гидрофильных макропористых полимерных материалов монолитного типа, несомненно, является актуальной задачей. Кроме того, одной из наиболее важных задач является разработка методов получения полимерных монолитных материалов с прогнозируемой поровой структурой, а также решение проблемы управления процессом порообразования. Оптимизация условий синтеза обсуждаемых

материалов обеспечивает возможность направленного формирования поровой структуры в зависимости от поставленной задачи.

Известно, что успешная реализация преимуществ иммобилизованных ферментов существенно зависит не только от природы и свойств твердой матрицы, но также от способа иммобилизации. Ковалентное связывание считается наиболее предпочтительным с точки зрения обеспечения стабильности гетерогенного биокатализатора. Однако проведение процедуры иммобилизации имеет смысл лишь при условии сохранения биологической активности молекулы фермента. С целью уменьшения влияния стационарной фазы на локализованный фермент часто используют метод иммобилизации, основанный на введении спейсера, то есть промежуточной молекулы между поверхностью носителя и иммобилизованным ферментом. Введение спейсера позволяет дистанцировать фермент от поверхности твердой фазы, и, таким образом, обеспечить повышенную доступность активного центра фермента.

Традиционно, самым трудоемким и дорогостоящим этапом получения конечного продукта биокатализа является его выделение и очистка. Особенно это касается использования биокаталитических методов в процессах пищевой и фармацевтической промышленности, требующих получения особо чистых препаратов. На сегодняшний день высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является одним из наиболее используемых методов анализа и очистки соединений различных классов. Причиной такой популярности данного метода является простота в реализации, надежность, воспроизводимость и возможность применения для анализа и очистки практически всех существующих стабильных химических соединений.

В последнее время создание методических тандемов, совмещающих химический и аналитический процессы, вызывает огромный интерес широкого круга исследователей. Очевидно, что объединение хроматографического анализа продуктов с биокаталитическим процессом позволяет проводить *on-line* мониторинг протекания химической реакции, а, в некоторых случаях, позволяет исключить дополнительные операции по очистке и выделению продуктов, что, способствует сокращению времени и упрощению процесса в целом. Более того, для обратимых реакций удаление образующегося продукта из реакционной среды приводит к более высокой конверсии по сравнению с реакцией в состоянии равновесия.

В соответствии со всем вышесказанным, поиск новых и эффективных материалов-носителей для иммобилизации ферментов, разработка оптимальных методов иммобилизации, изучение свойств полученных гетерогенных биокатализаторов и оптимизация условий их использования, а также создание высокоэффективных хроматографических реакторов для одновременной реализации процессов биоконверсии и анализа получаемых продуктов, является, несомненно, **актуальной задачей**.

Таким образом, **цель данной работы** состояла в разработке хроматографических реакторов, состоящих из биокаталитической и аналитической колонок на основе макропористых монолитных носителей.

В связи с этим были поставлены и решались следующие **задачи**:

- получение новых макропористых полиметакрилатных материалов в форме монолитных колонок с контролируемой поровой структурой;
- разработка метода иммобилизации ферментов на поверхности макропористых полимерных монолитных носителей;
- изучение влияния условий проведения гетерогенного биокатализа;
- разработка методов ВЭЖХ-мониторинга продуктов ферментативного гидролиза высокомолекулярных субстратов с использованием в качестве стационарных фаз макропористых монолитных сорбентов;
- оценка перспективности использования полученных гетерогенных биокатализаторов в реакциях деградации природных и синтетических полимеров;
- создание хроматографических реакторов на основе макропористых монолитных носителей и апробация их в биотехнологических процессах.

Объектами представленного исследования являлись гетерогенные биокатализаторы на основе различных гидролаз, иммобилизованных на поверхности макропористых монолитных носителей, и хроматографические реакторы, представляющие собой тандем каталитической и аналитической монолитных колонок.

В качестве **методов исследования** при выполнении работы были использованы: свободнорадикальная полимеризация в массе (получение полиметакрилатных материалов), метод интрузионной ртутной порометрии (определение поровых характеристик), растровая (сканирующая) электронная микроскопия (качественная оценка поровой структуры полученных материалов), метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (определение поровых характеристик монолитных колонок, анализ получаемых продуктов каталитических реакций и реализация метода *on-line* мониторинга продуктов), различные фотометрические методы количественного анализа вещества, графические методы обработки результатов.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- разработаны методы синтеза новых макропористых гидрофильных полимерных материалов на основе сополимеров глицидилметакрилата (ГМА), 2-гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) с этиленгликольдиметакрилатом (ЭДМА), а также глицидилметакрилата (ГМА) с глицериндиметакрилатом (ГДМА) в форме монолитных колонок с контролируемой поровой структурой;
- разработан метод иммобилизации ферментов с использованием окисленного полимера 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы (ок. пМАГ) в качестве макромолекулярного спейсера;
- исследована возможность применения гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных матриц для процессов деградации природных и синтетических полимеров;
- исследовано влияние различных факторов на эффективность проточного биокатализа с использованием разработанных систем;
- разработаны и оптимизированы конкретные хроматографические схемы для анализа различных природных и синтетических полимеров (рибонуклеиновая кислота (РНК), поли(цитидиловая кислота) (поли(С)), поли(молочная кислота) (ПМК), ксилан) и продуктов их деградации при использовании в качестве стационарных фаз макропористых монолитных сорбентов с необходимыми функциональными группами;
- разработаны хроматографические биокаталитические реакторы на основе макропористых монолитов и показана возможность их применения для решения некоторых биотехнологических задач.

Практическая значимость работы определяется тем, что:

- на основе данных по составам полимеризационных смесей и поровых характеристик полученных макропористых полимерных монолитных материалов, предложены рекомендации, позволяющие направленно контролировать характеристики получаемых матриц, необходимые для решения конкретных задач;
- разработанные хроматографические методы могут быть использованы для высокоскоростного анализа и сепарации различных природных и синтетических полимеров (РНК, поли(С), ксилан, ПМК) и продуктов их деградации;
- при исследовании влияния различных факторов на эффективность гетерогенного биокатализа выявлены наиболее перспективные методы создания и условия применения получаемых гетерогенных биокатализаторов;
- показана возможность эффективного использования разработанных хроматографических биокаталитических реакторов на основе макропористых монолитов в процессах биотехнологии.

Положения, выносимые на защиту:

- при прочих равных условиях, введение или замена одного из мономеров на более гидрофильный оказывала влияние на процесс разделения фаз в ходе полимеризации, что выражалось в формировании материалов с различными поровыми характеристиками;
- макропористые монолитные материалы на основе синтезированных полимеров являются перспективными для создания гетерогенных биокатализаторов, при этом гидрофилизация поверхности материала-носителя, а также использование макромолекулярного спейсера для иммобилизации ферментов позволяют повысить эффективность гетерогенного биокатализа;
- количество фермента, иммобилизованного на поверхности макропористого монолитного носителя, оказывает влияние на эффективность гетерогенного биокатализа;

- при увеличении скорости подачи раствора субстрата удельная активность иммобилизованного фермента возрастает;
- использование гетерогенных биокатализаторов и хроматографических сорбентов на основе макропористых монолитных материалов позволяет комбинировать стадии биоконверсии и ВЭЖХ-мониторинга получаемых продуктов в один *on-line* процесс;
- полученные каталитические системы характеризуются высокой стабильностью и эффективностью в процессах деградации как низко-, так и высокомолекулярных субстратов.

Обоснованность и достоверность данных и выводов настоящей работы подтверждается хорошей воспроизводимостью всех полученных результатов, их согласованностью при использовании различных методов исследования.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались в виде устных и стендовых сообщений на следующих международных и российских симпозиумах и конференциях: 6-я и 8-я Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев» (Санкт-Петербург, Россия, 2012, 2014); 5th и 6th Monolith Summer School and Symposium (Порторож, Словения, 2012, 2015); 8-я и 9-я Санкт-Петербургская конференция молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, Россия, 2012, 2013); международная конференция «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (Москва, Россия, 2013, 2015); 15-я Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2013); 2-я Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2013); Baltic Polymer Symposium (Лаулазмаа, Эстония, 2014); 2-я Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, Россия, 2014); 1-я Конференция молодых ученых и специалистов ПИЯФ (Гатчина, Россия, 2014); научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в международных и отечественных журналах. Все журналы входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ. Также опубликованы тезисы 17 докладов и получен 1 патент.

Личный вклад автора состоял в осуществлении всех представленных в работе экспериментов, активном участии в интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций и докладов.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), выводов и списка использованной литературы. Материалы диссертации изложены на 182 страницах, проиллюстрированы 21 таблицей и 69 рисунками. Список цитируемой литературы включает 223 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **ВВЕДЕНИИ** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи работы, определена научная новизна, охарактеризована практическая значимость полученных результатов, изложены основные положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ состоит из 5 разделов. Раздел 1 посвящен общим представлениям о ферментах и методам определения параметров эффективности ферментативного катализа. В разделе 2 рассмотрены особенности гетерогенного биокатализа, способы иммобилизации и возможные носители для иммобилизации белков. Раздел 3 посвящен аналитическому рассмотрению макропористых монолитных материалов как носителей для иммобилизации ферментов и стационарных фаз для ВЭЖХ, а также описанию основных методов синтеза и исследования материалов данного типа. Раздел 4 посвящен анализу основных видов хроматографических реакторов, а раздел 5 – анализу текущей литературы по созданию и применению гетерогенных биокатализаторов на основе ферментов, используемых в работе.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ содержит описание методов синтеза макропористых полимерных монолитных материалов различного состава с варьируемыми поровыми характеристиками, а также способов иммобилизации белковых молекул на поверхности монолитных носителей. Описаны методы определения и расчета кинетических параметров биокаталитических реакций гидролиза низко- и высокомолекулярных субстратов. Представлены методики ВЭЖХ анализа продуктов деструкции природных и

синтетических полимеров с помощью гетерогенных биокатализаторов и нативных ферментов, а также описаны условия использования полученных хроматографических биокаталитических реакторов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание высокоэффективных динамических биоконверсионных систем является одним из активно разрабатываемых направлений современной биотехнологии. Развитие данного направления тесно связано с внедрением новых типов носителей, разработкой методов иммобилизации ферментов и оптимизацией режимов эксплуатации гетерогенных биокатализаторов. В представляемой работе разработаны методы синтеза новых гидрофильных макропористых материалов в форме монолитных колонок, содержащих на поверхности функциональные группы, пригодные для ковалентной иммобилизации белков. Путем различных методов ковалентной иммобилизации нескольких ферментов класса гидролаз (рибонуклеаза А (РНКаза), ксиланолитические ферменты и эстераза) на поверхности синтезированных полимерных материалов получена серия гетерогенных биокатализаторов.

Изучено влияние различных факторов, таких как природа поверхности материала-носителя, метод иммобилизации фермента, геометрия стационарной фазы, количество иммобилизованного фермента и скорость сквозного потока раствора субстрата на эффективность гетерогенного биокатализа. Изучены процессы деградации природных и синтетических полимеров с использованием гетерогенных биокатализаторов и нативных ферментов с последующим мониторингом получаемых продуктов методами ВЭЖХ, а также разработаны хроматографические биореакторы, позволяющие объединять стадии биокатализа и мониторинга продуктов в один *on-line* процесс. Проведена оценка возможности использования хроматографических биокаталитических реакторов в различных процессах биотехнологии.

3.1. Получение макропористых монолитных носителей для иммобилизации ферментов

Повышенный интерес к макропористым полимерным монолитным носителям обусловлен их высокой проницаемостью в сочетании с химической реакционной способностью, позволяющей легко вводить в структуру матрицы белковые молекулы. При этом одной из наиболее важных задач является получение материалов с прогнозируемой поровой структурой.

Синтез сополимеров на основе ГМА, ГЭМА, ЭДМА и ГДМА проводили методом свободнорадикальной полимеризации *in situ* в колонках-картриджах из нержавеющей стали диаметром 4.6 мм и длиной 50 мм при температуре 70°C. Структурные формулы мономеров представлены на Рисунке 1.

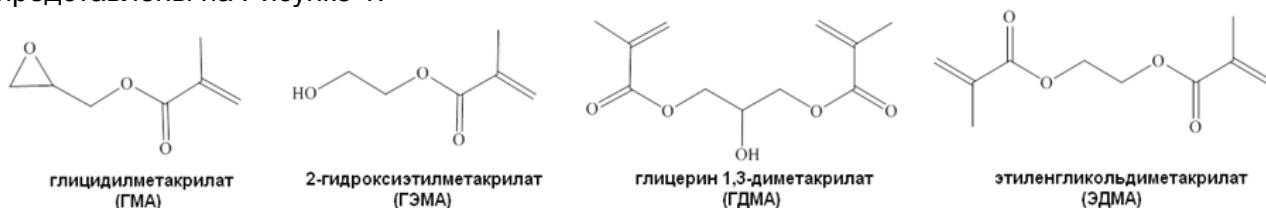


Рисунок 1 – Структурные формулы мономеров, используемых для синтеза полимерных носителей.

Объемное соотношение мономеры:порогены во всех экспериментах было постоянным и равным 60:40. Объемное соотношение функциональный мономер:сшивающий агент составляло 60:40 для сополимеров ГМА-ЭДМА и ГМА-ГДМА и 35:25:40 для тройного сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА. В качестве инициатора процесса полимеризации был использован 2,2-азо-*бис*-изобутиронитрил (АИБН) (1 масс% от массы мономеров). Было исследовано влияние времени полимеризации (8 и 12 часов) и соотношения порогенов (додеканол, циклогенсанол, толуол) в реакционной смеси на поровые характеристики получаемых полимерных матриц.

Для каждого вида сополимера были получены серии образцов, поровые характеристики которых были рассчитаны на основании данных гидродинамической проницаемости (Таблица 1).

Таблица 1 – Пороговые характеристики образцов макропористых монолитных материалов
 Обозначения: Д – додеканол, Ц – циклогексанол, Т – толуол

Образец	Порогоны (об%:об%)	Время полимеризации	Проницаемость, м ²	Общ. пористость, %	Ср.размер пор*, нм
ГМА-ЭДМА					
М _{Э1}	Д = 100	8	0.8×10^{-14}	65	630 ± 20
М _{Э2}	Д:Ц = 60:40	8	1.5×10^{-14}	64	880 ± 30
М _{Э3}	Д:Ц = 60:40	12	1.1×10^{-14}	55	780 ± 20
ГМА-ГЭМА-ЭДМА					
М _{ГЭ1}	Д = 100	8	1.3×10^{-14}	66	800 ± 35
М _{ГЭ2}	Д:Ц = 60:40	8	1.5×10^{-14}	58	920 ± 30
М _{ГЭ3}	Д:Ц = 60:40	12	1.8×10^{-14}	60	710 ± 15
М _{ГЭ4}	Д:Ц:Т = 65:5:30	8	3.7×10^{-14}	77	1240 ± 20
М _{ГЭ5}	Д:Ц:Т = 65:10:25	8	4.6×10^{-14}	86	1310 ± 20
М _{ГЭ6}	Д:Ц:Т = 60:20:20	8	3.7×10^{-14}	60	1410 ± 35
М _{ГЭ7}	Д:Ц:Т = 70:20:10	8	3.1×10^{-14}	59	1290 ± 30
М _{ГЭ8}	Д:Ц:Т = 70:10:20	8	4.6×10^{-14}	65	1510 ± 20
М _{ГЭ9}	Д:Ц:Т = 75:5:20	8	4.6×10^{-14}	51	1700 ± 35
М _{ГЭ10}	Д:Ц:Т = 80:10:10	8	2.1×10^{-14}	72	960 ± 20
М _{ГЭ11}	Д:Ц:Т = 85:5:10	8	2.6×10^{-14}	63	1160 ± 30
М _{ГЭ12}	Д:Ц:Т = 80:5:15	8	3.7×10^{-14}	56	1450 ± 30
М _{ГЭ13}	Д:Т = 90:10	8	2.7×10^{-14}	57	1220 ± 35
ГМА-ГДМА					
М _{Г1}	Д = 100	8	0.4×10^{-14}	57	490 ± 20
М _{Г2}	Д:Ц = 60:40	8	0.4×10^{-14}	47	550 ± 20
М _{Г3}	Д:Ц = 60:40	12	0.3×10^{-14}	77	340 ± 20
М _{Г4}	Д:Ц = 70:30	8	0.5×10^{-14}	58	520 ± 25
М _{Г5}	Д:Ц = 70:30	12	0.7×10^{-14}	65	570 ± 20
М _{Г6}	Д:Ц:Т = 60:30:10	8	1.2×10^{-14}	67	660 ± 30
М _{Г7}	Д:Ц:Т = 60:20:20	8	1.5×10^{-14}	69	840 ± 30

*Значение рассчитано по данным трех измерений.

При получении сополимера ГМА-ЭДМА было установлено, что использование стандартной системы порогаев (циклогексанол и додеканол) позволяло получить образцы материала со средним размером пор от 600 до 880 нм.

Использование только додеканола в качестве порогаев при получении материалов на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА приводило к образованию носителя со средним размером пор 800 нм (образец М_{ГЭ1}). При этом введение циклогексанола в полимеризационную смесь практически не оказывало влияния на величину среднего размера пор (образцы М_{ГЭ2} и М_{ГЭ3}). Использование толуола в качестве сопорогаев приводило к значительному увеличению среднего размера пор получаемых макропористых материалов. При этом увеличение доли толуола как за счет уменьшения доли додеканола при постоянном количестве циклогексанола (образцы М_{ГЭ6} и М_{ГЭ7}), так и за счет уменьшения доли циклогексанола при постоянном количестве додеканола в смеси (образцы М_{ГЭ7} и М_{ГЭ8}) способствовало увеличению значения среднего размера пор.

Для формирования макропористой структуры синтезируемых полимерных матриц на основе сополимера ГМА-ГДМА в качестве порообразующих веществ использовали те же, что и в синтезе предыдущего материала. Влияние этих веществ, взятых в различном соотношении, на характеристики полученных полимерных образцов имело такую же тенденцию, как и в случае сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА.

Для всех материалов была выявлена тенденция к уменьшению среднего размера пор и пористости при увеличении времени полимеризации (образцы М_{Э2}, М_{ГЭ2} и М_{Г2} – полимеризация в течение 8 часов, образцы М_{Э3}, М_{ГЭ3} и М_{Г3} – полимеризация в течение 12 часов), что являлось следствием увеличения степени сшивки микроглобул сополимеров.

Из числа синтезированных сополимеров были выбраны несколько образцов для оценки поровых характеристик методом интрузионной ртутной порометрии. В частности, исследовались образцы МЭ1, МГЭ3 и МГ6, МГЭ7 и МГЭ9 (Рисунок 2). Было установлено, что все образцы характеризовались узким распределением пор по размерам. Более того, характеристики, полученные по данным двух разных методов, практически полностью совпадали, что подтверждает высокую точность определения поровых характеристик для монолитов в форме колонок по данным гидродинамической проницаемости. Пример порограмм представлен на Рисунке 2.

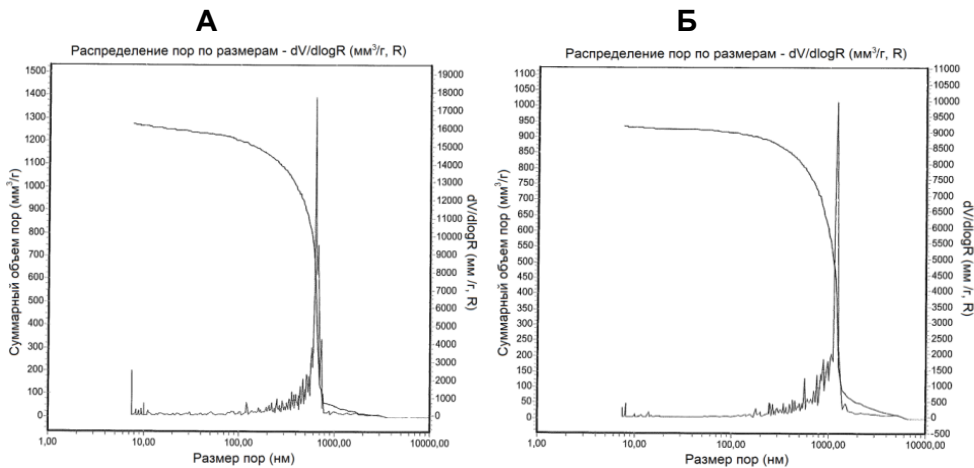


Рисунок 2 - Порограммы, полученные методом интрузионной ртутной порометрии, для монолитных материалов на основе сополимеров: А – ГМА-ЭДМА (образец МЭ1), Б – ГМА-ГЭМА-ЭДМА (образец МГЭ7).

Анализ морфологии и однородности поверхности проводили методом растровой электронной микроскопии (Рисунок 3). Было показано, что все материалы имели одинаковую морфологию поверхности и однородную структуру.

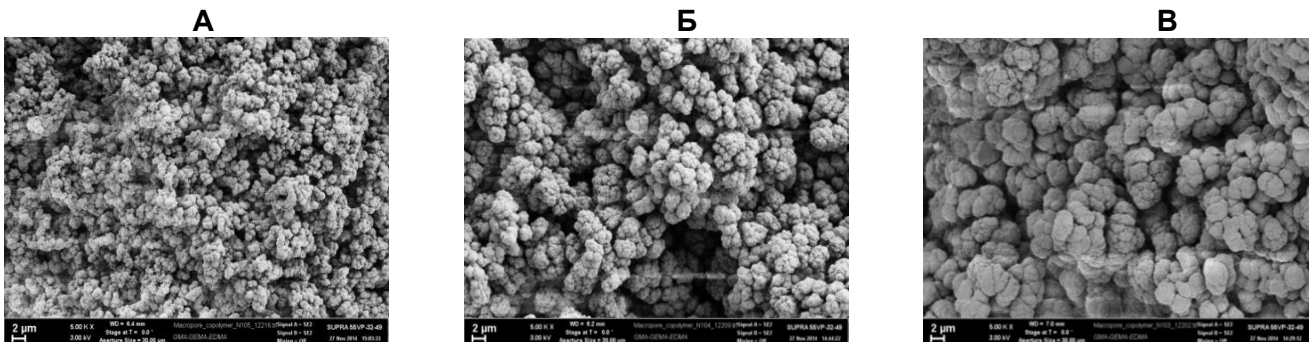


Рисунок 3 – Микрофотографии образцов макропористых монолитных материалов на основе сополимеров ГМА-ГЭМА-ЭДМА: А – МГЭ3; Б – МГЭ7 и В – МГЭ9.

3.2. Получение макропористых монолитных стационарных фаз для хроматографического анализа

В данной работе для ВЭЖХ анализа ПМК была получена колонка на основе сополимера лаурилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом (ЛМА-ЭДМА), содержащая гидрофобные функциональные группы С12. Синтез данного материала осуществляли методом свободнорадикальной полимеризации в колонках-картриджах из нержавеющей стали размером 4.6 мм × 50 мм. Сополимеризацию мономеров ЛМА:ЭДМА в соотношении 50:50 об.% проводили при температуре 70°C. В качестве инициатора использовали АИБН в количестве равном 1 масс.% от массы мономеров. С целью оптимизации поровой структуры варьировали соотношение порогенов (1,4-бутандиол и 1-пропанол) в реакционной смеси и время полимеризации. Было выявлено, что для синтеза хроматографического сорбента на основе сополимера ЛМА-ЭДМА оптимальное соотношение порообразующих растворителей 1,4-бутандиол:1-пропанол равняется 4:6 и время полимеризации - 10 часов. Полученный материал характеризовался средним размером пор 2500 ± 140 нм и удельной площадью поверхности $50 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$.

С учетом того, что полученный сорбент планировалось использовать в ВЭЖХ, были исследованы зависимости давления в хроматографической системе от скорости потока подвижных фаз с различной вязкостью (изопропанола и тетрагидрофурана), а также проведено сравнение с результатами, полученными при использовании коммерческого монолитного диска (С1М Диск С4, диаметром 5 мм и длиной 5 мм) (Рисунок 4). Все полученные зависимости оказались линейными в широком диапазоне используемых скоростей потока подвижных фаз, что в свою очередь доказывает оптимальные механические характеристики получаемых макропористых монолитных стационарных фаз.

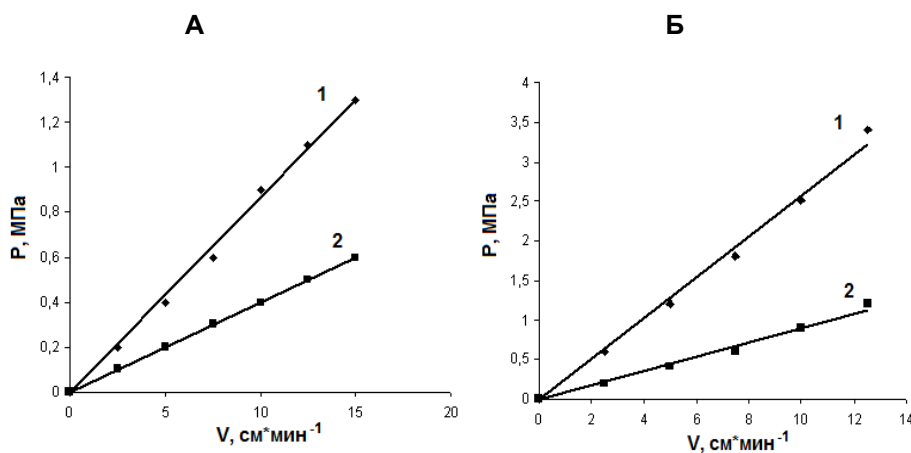


Рисунок 4 – Зависимости давления от скорости потока подвижной фазы: А – тетрагидрофуран, Б – изопропанол для колонок на основе сополимера ЛМА-ЭДМА (образец М₁б) (1) и коммерческого С1М С4 диска (2).

3.3. Имобилизация ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей

Данный этап работы был посвящен созданию гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных материалов, несущих на своей поверхности различные гидролитические ферменты, такие как рибонуклеаза А, β -ксиланаза, β -ксилозидаза и эстераза. Имобилизацию ферментов на поверхности макропористых монолитных матриц проводили двумя способами: (1) прямой реакцией аминогрупп фермента с поверхностными эпоксидными группами носителя; (2) многостадийным методом, заключающимся во введении промежуточного высокомолекулярного спейсера между поверхностью носителя и молекулой фермента (Рисунок 5). В отличие от прямого метода иммобилизации, метод иммобилизации через спейсер включал несколько стадий, а именно, аминирование эпоксидных групп носителя, ковалентное присоединение альдегид-содержащего полимерного спейсера, иммобилизацию фермента и, наконец, восстановление остаточных альдегидных групп и образовавшихся иминных связей (оснований Шиффа) боргидридом натрия.

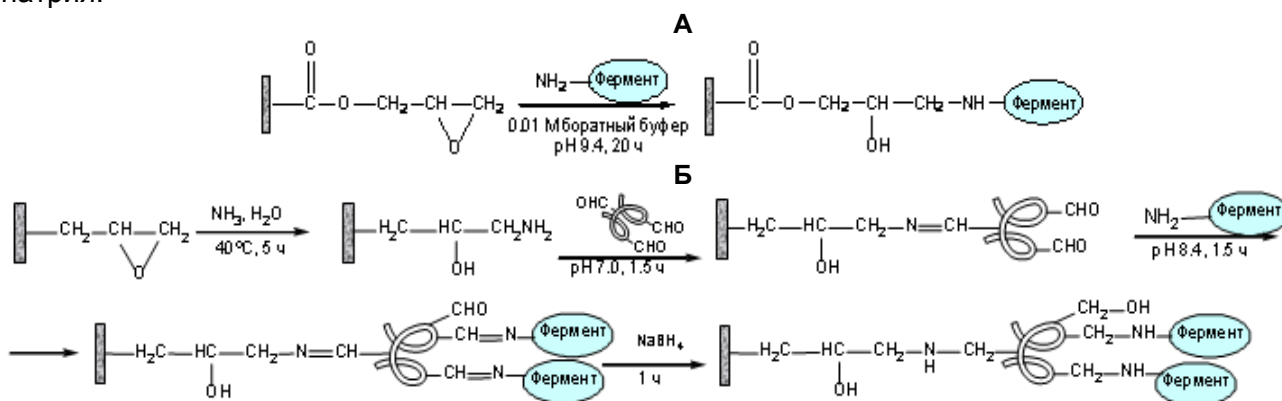


Рисунок 5 – Схематическое изображение реакций иммобилизации ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей: А – прямая ковалентная иммобилизация фермента на поверхности монолитного носителя; Б – иммобилизация через промежуточный полимерный спейсер.

В качестве высокомолекулярного спейсера был выбран синтетический полимер, а именно окисленный полимер 2-деокси-*N*-метакрилоиламидо-*D*-глюкозы (ок.-пМАГ) с молекулярной массой M_w 25000. Выбранный спейсер представляет собой водорастворимый и

биосовместимый полимер, альдегидные группы в структуре которого получали путем частичного окисления боковых звеньев глюкозы периодатом натрия (Рисунок 6).

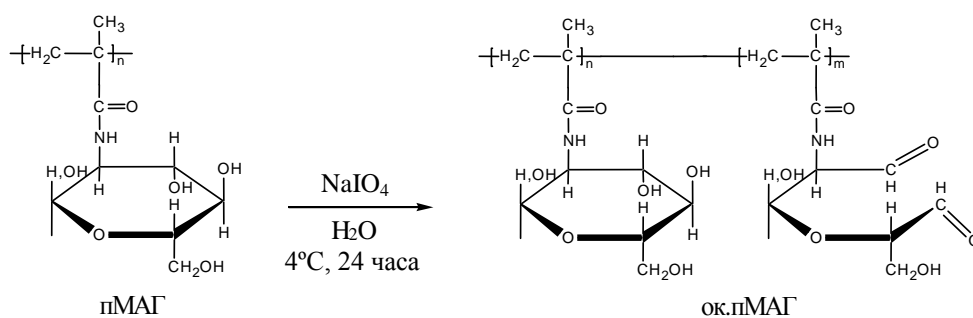


Рисунок 6 –
Схема окисления и
структура окисленной
поли(2-деокси-N-
метакрилоил-амидо-
D-глюкозы).

В случае иммобилизации фермента многостадийным методом через спейсер предварительно были оптимизированы условия проведения модификации поверхности макропористых монолитных материалов. В результате реакции аминирования удалось достичь степени конверсии эпоксидных групп равной 26%. Количество иммобилизованного спейсера в оптимальных условиях составляло около 60%.

Для корректного сравнения биокаталитических систем была проведена оптимизация содержания фермента на поверхности твердого носителя с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве модельного белка. Количество связавшегося с полимерной матрицей белка рассчитывали на основе разности масс белка, определяемых в исходных и промывных растворах с использованием метода Лоури-Фолина. Было показано, что увеличение времени реакции с 90 до 180 минут и температуры с 22 до 35°C способствовало увеличению количества белка, иммобилизованного на поверхности носителя в интервале от 0.1 мг (1.5 нмоль) до 2.4 мг (36.4 нмоль) белка на грамм сорбента.

Использование данных, полученных для модельного белка, позволило выбрать условия для иммобилизации целевых ферментов. Получено несколько видов гетерогенных биокатализаторов, различающихся природой и геометрией стационарной фазы, методом иммобилизации фермента и его количественным содержанием (Таблица 2).

Таблица 2 – Характеристики полученных гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных носителей

Биокатализатор	Материал носителя	Средний размер пор, нм	Пористость, %	Метод иммобилизации фермента	$Q_{\text{иммоб. ферм.}}$, нмоль/колонка (диск)
Рибонуклеаза А					
КР ₁	ГМА-ЭДМА	630	65	Прямой	175
КР ₂	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	710	60	Прямой	161
КР ₃	ГМА-ГДМА	660	67	Прямой	175
КР ₄	ГМА-ЭДМА	630	65	Через спейсер	153
КР ₅	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1290	59	Прямой	175
КР ₆	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1290	59	Через спейсер	168
ДР ₁	ГМА-ЭДМА	1600	60	Прямой	67
ДР ₂	ГМА-ЭДМА	1600	60	Через спейсер	65
β-ксилозидаза					
КК ₁	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1700	51	Через спейсер	6.9
КК ₂	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1700	51	Через спейсер	1.1
β-ксилаза					
КК ₃	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1700	51	Через спейсер	1.1
ДК ₄	ГМА-ЭДМА	1600	60	Через спейсер	0.6
Эстераза					
ЭД ₁	ГМА-ЭДМА	1600	60	Через спейсер	3.2

3.4. Изучение влияния различных факторов на эффективность гетерогенного биокатализа

Эффективность гетерогенного биокатализа с использованием иммобилизованных ферментов существенно подвержена влиянию различных факторов, таких как природа и свойства материала-носителя, метод иммобилизации фермента, количество иммобилизованного фермента и т.д. Кроме того, в случае использования проточных макропористых монолитных матриц как носителей для иммобилизации ферментов важными параметрами, влияющими на эффективность биокатализа, являются также скорость потока раствора субстрата сквозь колонку, содержащую иммобилизованный фермент, режим подачи раствора субстрата и геометрия носителя. Таким образом, задачей данного этапа работы было исследование влияния перечисленных факторов на активность иммобилизованных ферментов.

Для изучения влияния химической природы стационарной фазы на эффективность гетерогенного биокатализа использовали гетерогенные биокатализаторы КР₁-КР₃, содержащие РНКазу, иммобилизованную на поверхности материалов на основе сополимеров (1) ГМА-ЭДМА, (2) ГМА-ГЭМА-ЭДМА, и (3) ГМА-ГДМА.

Эффективность гидролиза специфического для РНКазы субстрата цитидин-2',3'-циклофосфата (ЦЦФ) при прочих равных условиях возрастала в ряду носителей: ГМА-ЭДМА < ГМА-ГДМА < ГМА-ГЭМА-ЭДМА (Рисунок 7). Как и ожидалось, гидрофилизация поверхности благоприятствовала закреплению наиболее активной конформации фермента в процессе его иммобилизации. Наибольшая эффективность биокатализа достигалась при использовании носителя на основе гидрофильного сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА и увеличивалась в 4 раза по сравнению с использованием фермента, иммобилизованного на поверхности стандартного материала на основе сополимера ГМА-ЭДМА.

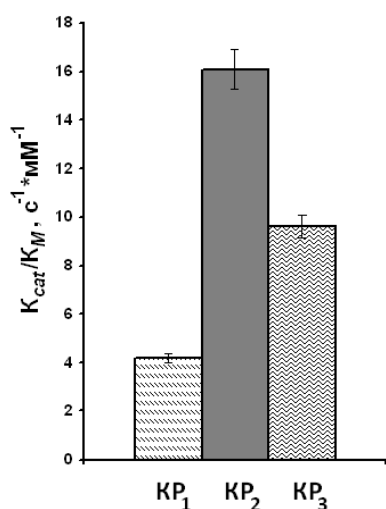


Рисунок 7 – Сравнение эффективности гидролиза ЦЦФ, катализируемого РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок на основе различных сополимеров.

Условия реакции: метод зонального элюирования, температура 22°C, количество вводимого субстрата 0.06-1.70 мг, скорость потока подвижной фазы (20 мМ буфер Трис-НСI, рН 7.5) 1.0 мл·мин⁻¹.

Для исследования влияния способа иммобилизации на эффективность биокатализа сравнивали гетерогенные биокатализаторы, полученные различными методами иммобилизации рибонуклеазы А на поверхности полученных колонок на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА (колонки КР₂ и КР₄).

При проведении гетерогенного биокатализа в режиме зонального элюирования наблюдалось увеличение показателя эффективности биокатализа k_{cat}/K_M почти на 40% для фермента, иммобилизованного через полимерный спейсер (КР₄) (Рисунок 8). Полученные результаты подтверждают положительный эффект ввода промежуточного макромолекулярного спейсера, который позволяет дистанцировать молекулу фермента от поверхности твердой фазы, минимизируя влияние твердой матрицы, и, вместе с тем, обеспечивая дополнительную доступность активного центра биомолекулы.

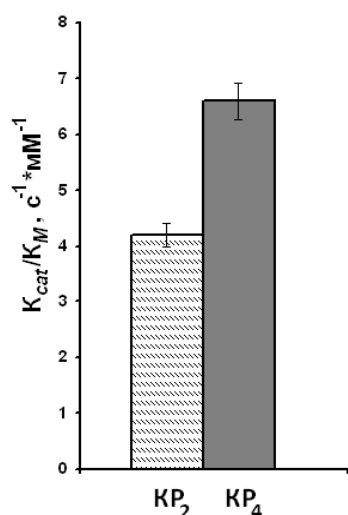


Рисунок 8 – Сравнение эффективности гидролиза ЦЦФ, катализируемого РНКазой А, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок и дисков различными методами.

Условия реакции: см. Рисунок 7.

Для сравнения влияния геометрии стационарной фазы на эффективность гетерогенного биокатализа в работе также были использованы коммерческие макропористые монолитные диски (диаметр > длина) на основе сополимера ГМА-ЭДМА (BIA Separations, Словения). Использованные для сравнения колонки и диски имели сопоставимые поровые характеристики (пористость ~ 60%, $d \sim 1300 - 1600$ нм), но различались по объему стационарной фазы и геометрии носителя. Размеры колонки были равны 4.6×50 мм, диска – 3×12 мм, что соответствовало объемам сорбента 0.84 и 0.34 мл, соответственно.

Значение удельной активности РНКазы, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок было сопоставимо с таковым, определенным для нативного биокатализатора, в то время как для фермента, иммобилизованного на поверхности диска, данный параметр уменьшался примерно в 1.5 раза. Самое высокое значение соотношения k_{cat}/K_M было найдено для РНКазы, иммобилизованной на поверхности

монолитного диска и составляло 55% от данного показателя для нативного фермента, что свидетельствует о высокой каталитической эффективности гетерогенного биокатализатора в формате дисков. При этом эффективность биокатализа с использованием РНКазы, иммобилизованной на поверхности монолитной колонки, составляла всего 28% от таковой для гомогенной реакции (Таблица 3). Более высокая эффективность гетерогенного биокатализа с использованием ферментов, иммобилизованных на поверхности монолитных дисков, может объясняться более быстрым отводом продуктов каталитической реакции из тонкого слоя (диск) по сравнению с более протяженным слоем (колонка), что, в свою очередь, благоприятствует смещению равновесия реакции в сторону образования продуктов реакции.

Таблица 3 – Кинетические параметры гидролиза ЦЦФ, катализируемого РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных дисков и колонок

Условия реакции: метод рециркуляции субстрата, температура 22°C , объем реакционной смеси – 3.0 мл, количество вводимого субстрата 0.06-1.70 мг, скорость потока подвижной фазы (20 мМ буфер Трис-HCl, pH 7.5) $1.0 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$

Ферментативная реакция	K_M , мМ	A , мкмоль \cdot мин $^{-1} \cdot$ мг $^{-1}$	k_{cat} , с $^{-1}$	k_{cat}/K_M , с $^{-1}$ мМ $^{-1}$
В растворе	0.6	16.0	38.1	63.1
KP ₄	0.9	14.4	15.2	17.7
DP ₂	0.7	9.1	22.4	33.8

Влияние скорости потока раствора низкомолекулярного субстрата (ЦЦФ) сквозь стационарную фазу с иммобилизованной рибонуклеазой А рассматривали в режиме зонального элюирования при использовании гетерогенных биокатализаторов KP₁ – KP₃. Скорость подвижной фазы увеличивали от 0.3 до $1.0 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$, что соответствовало значениям линейной скорости, равным 3 – $10 \text{ см} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Наблюдалось значительное увеличение показателя эффективности биокатализа при переходе к высоким скоростям потока (при $1.0 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$), в то время как для скоростей потока в пределах $0.3 - 0.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ значение k_{cat}/K_M для всех используемых гетерогенных биокатализаторов сохранялось постоянным (Рисунок 9). Данный результат может быть отнесен к особенностям динамического поведения молекул при высоких скоростях потока, когда в условиях незатрудненного диффузией массопереноса, число контактов молекул растворенного субстрата с закрепленными на поверхности молекулами фермента

возрастает. Как следствие, количество продукта в единицу времени также увеличивается. Кроме того, при увеличении скорости потока продукты реакции мгновенно отводятся от активного центра фермента, освобождая место для следующих молекул субстрата и, таким образом, равновесие реакции сдвигается в сторону образования целевого продукта.

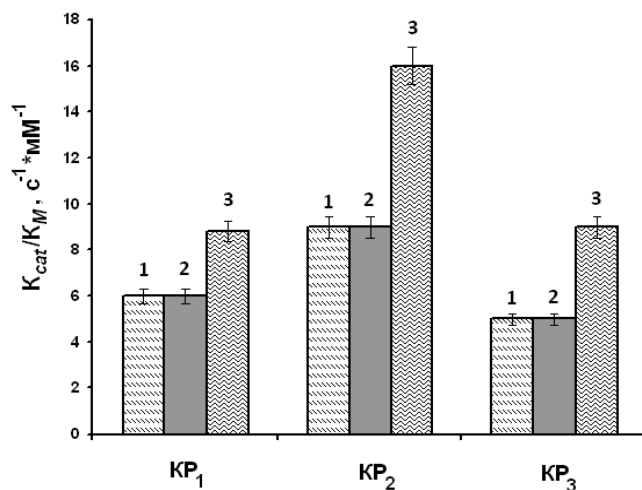


Рисунок 9 – Влияние скорости подачи раствора субстрата на эффективность гидролиза ЦЦФ в условиях зонального элюирования.

Обозначения: 1 – скорость потока раствора субстрата 0.3 мл·мин⁻¹, 2 – 0.5 мл·мин⁻¹, 3 – 1.0 мл·мин⁻¹.
Условия реакции: см. Рисунок 7.

Для оценки влияния количества иммобилизованного фермента на эффективность биокаталитического процесса было получено два гетерогенных биокатализатора с различной иммобилизационной емкостью β-ксилозидазы.

При сравнении двух гетерогенных биокатализаторов с различным содержанием фермента в реакции гидролиза ксилана было установлено, что удельная активность биокатализатора КК₂ (низкозагруженная колонка) была примерно в 4 раза выше, чем для фермента в растворе и в 6 раз выше, чем для колонки КК₁ с высокой иммобилизационной емкостью (Таблица 4). Это может означать, что процесс взаимодействия фермента с субстратом лимитирован стерической доступностью активного центра биокатализатора вследствие его высокой плотности на поверхности носителя.

Таблица 4 – Кинетические параметры гидролиза ксилана нативной и иммобилизованной β-ксилозидазой

Условия реакции: метод рециркуляции субстрата, температура 22°C, объем реакционной смеси – 3.0 мл, количество вводимого субстрата 0.6-7.8 мг, скорость потока подвижной фазы (10 mM Na-ацетатный буфер, pH 5.0) 1.0 мл·мин⁻¹

Биокатализатор	K_M , мМ	A , мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	k_{cat}/K_M , мин ⁻¹ ·мМ ⁻¹
В растворе	3.6	0.12	8.6
КК ₁	4.1	0.52	32.0
КК ₂	4.2	0.08	5.0

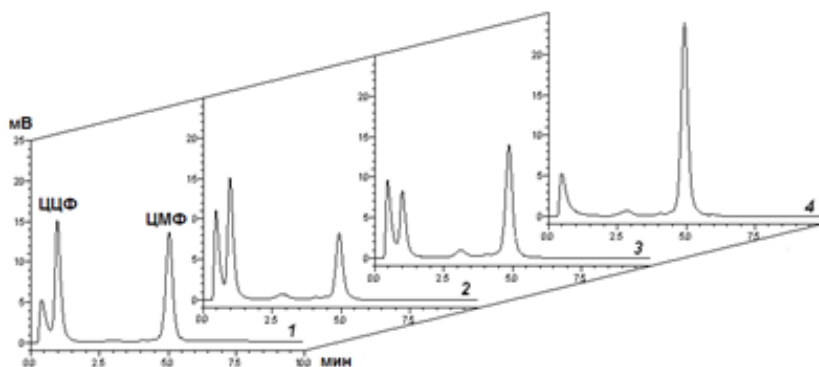
3.5. Изучение деградации природных и синтетических полимеров с использованием разработанных гетерогенных биокатализаторов

Изучение процесса деградации высокомолекулярных субстратов с помощью гетерогенных биокатализаторов, содержащих рибонуклеазу, ксилозидазу, ксиланазу или эстеразу, проводили на примере гидролиза поли(С), РНК, ксилана и ПМК. С целью оценки эффективности применения полученных гетерогенных биокаталитических систем для деградации высокомолекулярных субстратов специально были разработаны методы хроматографического мониторинга продуктов каталитических реакций с использованием в качестве стационарных фаз макропористых монолитных сорбентов.

Изучение процесса деполимеризации полицитидиловой кислоты

Первоначально было проведено исследование процесса деполимеризации поли(С) РНКазой в растворе. Мониторинг процесса осуществляли методом анионообменной (АО) ВЭЖХ. Цитидин-3'-монофосфат (ЦМФ) и цитидин-2',3'-циклофосфат (ЦЦФ), являющиеся продуктами данной реакции, использовали в качестве хроматографических стандартов. Можно видеть, что уже спустя 5 минут после начала реакции данные вещества являются единственными продуктами каталитической реакции. Кроме того, заметно накопление во

времени мономерного продукта реакции (ЦМФ), а также исчезновение в реакционной смеси промежуточного соединения ЦЦФ. Полная деградация поли(С) ферментом в растворе завершалась спустя 30 минут (Рисунок 10).



Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный диск CIM DEAE (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 20 mM Трис-НСl, pH 7.5, элюент Б – 1 M NaCl в элюенте А; скорость потока подвижной фазы – 0.5 мл·мин⁻¹; концентрация поли(С) – 0.125 мг·мл⁻¹; объем вводимой пробы – 10 мкл; программа анализа – линейный градиент 0 – 100% элюента Б за 30 минут.

Рисунок 10 – Мониторинг процесса гидролиза поли(С) РНКазой в растворе.

Обозначения: 1 – смесь стандартов ЦЦФ и ЦМФ, 2 – гидролиз в течение 5 минут, 3 – гидролиз в течение 15 минут, 4 – гидролиз в течение 30 минут.

Процесс деградации поли(С) с использованием полученных гетерогенных биокатализаторов рассматривали при использовании метода зонального элюирования. При этом был изучен эффект различных экспериментальных факторов, таких как скорость потока субстрата, метод иммобилизации фермента и др. на процесс ферментативного гидролиза.

На Рисунке 11 представлены хроматограммы, иллюстрирующие образование продуктов реакции в зависимости от скорости потока раствора субстрата сквозь монолитные колонки, содержащие иммобилизованную РНКазу (КР₅ и КР₆). Каталитическая реакция деградации поли(С) при использовании гетерогенных биокатализаторов в отличие от реакции в растворе помимо ЦМФ и ЦЦФ сопровождается образованием смеси олигонуклеотидов, что может объясняться коротким временем пребывания субстрата внутри колонки.

При выбранных скоростях потока 0.1, 0.5 и 1.0 мл·мин⁻¹, время контакта фермента с субстратом составляло 5.0, 1.0 и 0.5 минут, соответственно. Однако сравнение полученных хроматограмм позволяет сделать вывод об отсутствии значительных качественных отличий в протекании реакций гидролиза при увеличении скорости потока.

При сравнении эффективности двух гетерогенных биокатализаторов КР₅ и КР₆, отличающихся способом ковалентного прикрепления фермента, можно констатировать уменьшение числа пиков на хроматограмме, полученной при использовании гетерогенного биокатализатора КР₆ (иммобилизация через макромолекулярный спейсер), что свидетельствует о более высокой глубине биоконверсии.

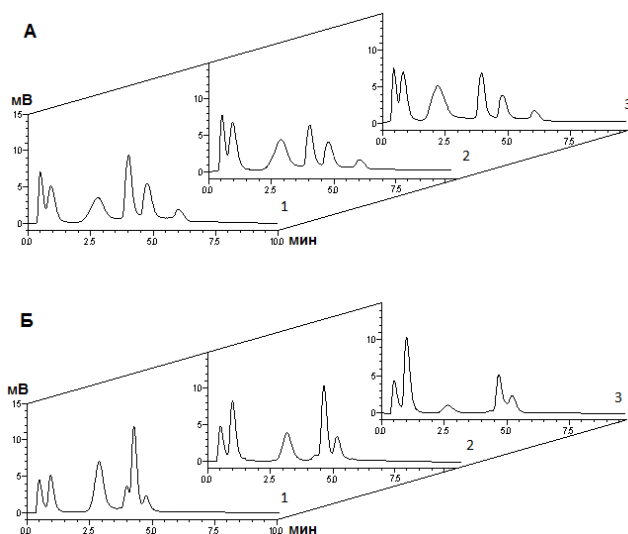


Рисунок 11 – Влияние скорости потока раствора субстрата на эффективность гидролиза поли(С) под действием РНКазы, иммобилизованной прямым методом (А) и через спейсер (Б).

Обозначения: 1 – скорость потока субстрата 0.1 мл·мин⁻¹, 2 – скорость потока 0.5 мл·мин⁻¹, 3 – скорость потока 1.0 мл·мин⁻¹.

Условия биокатализа: зональное элюирование, гетерогенные биокатализаторы КР₅ (А) и КР₆ (Б), объем раствора поли(С) – 0.5 мл, концентрация раствора поли(С) – 0.25 мг·мл⁻¹, температура – 22°C.

Условия ВЭЖХ: условия см. Рисунок 10.

Поскольку обсуждаемый ранее метод зонального введения субстрата в колонку с иммобилизованным ферментом не позволял достичь полного гидролиза поли(С), была проведена серия экспериментов по исследованию того же процесса, но в режиме рециркуляции раствора субстрата. Видно, что и в одном, и в другом случае вначале происходит образование набора олигомерных производных поли(С), а затем их преобразование в ЦМФ и его накопление в реакционной среде. На начальном этапе реакции (3 минуты) в случае иммобилизации фермента через спейсер реакция идет более интенсивно, однако спустя 18 минут субстрат полностью переходит в ЦМФ при использовании обоих типов гетерогенных биокатализаторов (Рисунок 12).

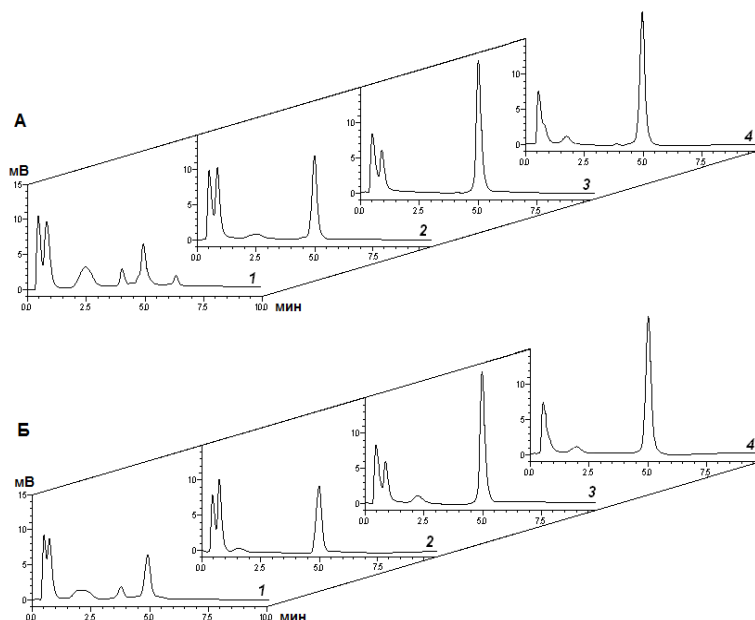


Рисунок 12 – Влияние времени рециркуляции на глубину конверсии поли(С), катализируемой РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок прямым методом (А) и через спейсер (Б).

Обозначения: 1 – время гидролиза 3 минуты, 2 – время гидролиза 6 минут, 3 – время гидролиза 12 минут, 4 – время гидролиза 18 минут.

Условия биокатализа: режим рециркуляции, гетерогенные биокатализаторы КР₅ (А) и КР₆ (Б), объем раствора поли(С) – 3.0 мл, концентрация раствора поли(С) – 0.25 мг·мл⁻¹, скорость подачи раствора субстрата 1.0 мл·мин⁻¹.

Условия ВЭЖХ: условия см. Рисунок 10.

Изучение процесса деградации РНК

В отличие от деструкции поли(С), расщепление РНК РНКазой ведет к образованию фиксированного набора олигонуклеотидов различного состава, что обусловлено возможностью данного фермента расщеплять селективно связи только между нуклеотидами, образованных с участием пиримидиновых оснований.

Для оценки эффективности полученных гетерогенных биокатализаторов в качестве реакции сравнения использовали процесс ферментативной деградации РНК в растворе. Результаты показали, что полный гидролиз РНК с помощью нативного фермента протекал в течение 7 минут, что выражалось в идентичности хроматограмм для гидролизатов, полученных в результате более длительного времени (Рисунок 13).

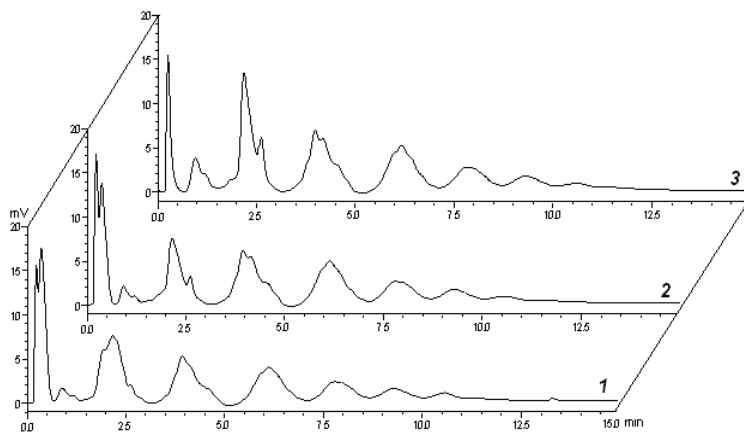


Рисунок 13 – Ферментативный гидролиз РНК в растворе.

Обозначения: 1 – время гидролиза 1 минута, 2 – время гидролиза 3 минуты, 3 – время гидролиза 7 минут.

Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный диск CIM DEAE (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5 + 7 М мочевины, элюент Б – 1 М NaCl в элюенте А; скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл·мин⁻¹; концентрация РНК – 0.1 мг·мл⁻¹; объем вводимой пробы – 10 мкл; линейный градиент 0 – 100% элюента Б за 15 минут).

Аналогичным образом проводили мониторинг продуктов гидролиза РНК, полученных с помощью иммобилизованной РНКазы. В отличие от поли(С), при деградации РНК РНКазой,

иммобилизованной на поверхности макропористых монолитных фаз, увеличение скорости не сопровождалось изменением состава получаемых продуктов. Более того, при использовании гетерогенных биокатализаторов (KP_5 и KP_6), содержащих РНКазу, иммобилизованную различными способами, эффективность гидролиза РНК была практически идентична. При этом набор продуктов, полученный при гидролизе РНК свободным ферментом в течение 7 минут, совпадал с набором продуктов, полученным при деструкции РНК с помощью гетерогенных биокатализаторов даже в режиме зонального введения раствора субстрата.

Изучение процесса деградации ксилана

Так же, как и в случае рибонуклеазы А для оценки эффективности полученных гетерогенных биокатализаторов проводили мониторинг образующихся в ходе реакции продуктов методом АО ВЭЖХ. В качестве стандартов были использованы высокомолекулярный субстрат (ксилан) и конечный продукт его деструкции (ксилоза).

При анализе хроматограмм, полученных для реакции деполимеризации ксилана с помощью как гетерогенных биокатализаторов, так и нативных форм ферментов, на основании обсчета площадей пиков, отвечающих ксилозе, были построены графики, отражающие накопление ксилозы в реакционной смеси в ходе реакций (Рисунки 14 и 15).

Хроматографический анализ показал, что полная конверсия ксилана в ксилозу при использовании растворенной ксилозидазы протекает более чем за 120 минут. В то же время, при аналогичном соотношении фермент/субстрат полная деструкция ксилана с помощью гетерогенного биокатализатора KK_2 (с низкой загрузкой фермента) протекает за 90 минут. В течение этого времени степень конверсии ксилана в растворе составляет только 70%. При использовании гетерогенного биокатализатора KK_1 (с высоким содержанием фермента) время полной деполимеризации составило 150 минут (Рисунок 14).

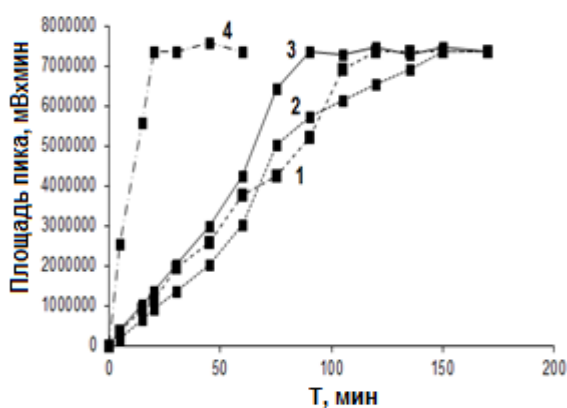


Рисунок 14 – Зависимость площади пика, отвечающего ксилозе, от времени каталитической деградации ксилана β -ксилозидазой.

Условия биокатализа: 1 – деградация в растворе: объем реакционной смеси – 1 мл, количество ксилана в реакционной смеси – 1 мг, количество β -ксилозидазы в реакционной смеси – 0.025 мг, температура – 37°C; 2, 3, 4 – деградация с помощью гетерогенных биокатализаторов KK_1 (2), KK_2 (3), $DK_4 + KK_2$ (4), режим рециркуляции, объем раствора ксилана – 3.0 мл, концентрация раствора ксилана – 1.0 мг·мл⁻¹, скорость подачи раствора субстрата 1.0 мл·мин⁻¹, температура - 37°C.

Аналогичный анализ был проведен для обоих гетерогенных биокатализаторов на основе ксиланазы (KK_3 и DK_4), а также для реакции в растворе. В обоих случаях гетерогенного биокатализа эффективность каталитической реакции возрастала, как и было показано на основе кинетических данных, и процесс полной деградации ксилана завершился спустя 30 минут для диска и 40 минут для колонки с иммобилизованным ферментом (Рисунок 15).

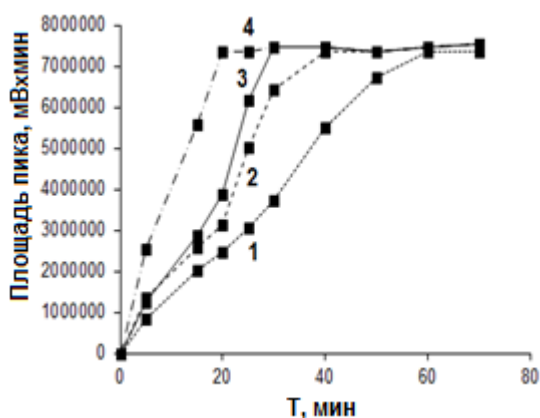


Рисунок 15 – Зависимость площади пика, отвечающего ксилозе, от времени каталитической деградации ксилана β -ксиланазой.

Условия биокатализа: 1 – деградация в растворе: объем реакционной смеси – 1 мл, количество ксилана в реакционной смеси – 1 мг, количество β -ксиланазы в реакционной смеси – 0.025 мг, температура – 22°C; 2, 3, 4 – деградация с помощью гетерогенных биокатализаторов KK_3 (2), DK_4 (3), $DK_4 + KK_2$ (4), режим рециркуляции, объем раствора ксилана – 3.0 мл, концентрация раствора ксилана – 1.0 мг·мл⁻¹, скорость подачи раствора субстрата 1.0 мл·мин⁻¹, температура - 22°C.

Так как процесс деградации высокомолекулярных соединений занимает довольно длительное время, совместное действие экзо- и эндогидролаз является предпочтительным для более эффективной деструкции. Субстрат пропускали через последовательно соединенные колонки в режиме рециркуляции в течение определенного времени для достижения полной конверсии ксилана. Полный процесс деградации ксилана при использовании комбинированной системы гетерогенных биокатализаторов ($DK_4 + KK_2$), завершается в течение 20 минут, что в 2 раза быстрее реакции, катализируемой иммобилизованной ксиланазой (DK_4), и в 4.5 раза быстрее деструкции, осуществляемой с помощью иммобилизованной ксилозидазы (KK_2).

Изучение ферментативной деградации поли(молочной кислоты)

Исследование свойств гетерогенного биокатализатора на основе эстеразы и сравнение с нативным ферментом проводили в реакции гидролиза ПМК. Анализ продуктов деградации ПМК проводили разработанным методом ВЭЖХ анализа с использованием синтезированной макропористой монолитной колонки на основе сополимера ЛМА-ЭДМА (ML_6). При изучении кинетических характеристик иммобилизованного и свободного фермента практически не наблюдалось изменения в значении K_M , что свидетельствует об отсутствии значительных изменений в структуре фермента в процессе ковалентного связывания с поверхностью носителя. При этом отмечалось падение активности иммобилизованного фермента и значения k_{cat} на 37%, а соотношения k_{cat}/K_M на 17%. (Таблица 5).

Таблица 5 – Кинетические параметры гидролиза ПМК, катализируемого нативной и иммобилизованной эстеразой

Условия реакции: метод рециркуляции субстрата, концентрация субстрата 0.1–1.60 мг·мл⁻¹, температура 37°C, объем реакционной смеси – 3 мл, скорость потока подвижной фазы (10 мМ Na-фосфатный, pH 7.5) 1.0 мл·мин⁻¹

Биокатализатор	K_M , мМ	$A_{уд}$, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_M , мин ⁻¹ ·мМ ⁻¹
Эстераза в растворе	0.15	940	152	1013
Иммобилизованная эстераза ($ЭД_1$)	0.11	596	96	878

3.6. Разработка хроматографических биокаталитических реакторов и изучение возможности их применения в различных процессах биотехнологии

Разработка хроматографического биокаталитического реактора на основе рибонуклеазы А

В данной работе для создания системы, позволяющей объединить процессы биоконверсии и биосепарации в единый *on-line* процесс, использовали разработанные гетерогенные биокатализаторы и коммерчески доступную анионообменную монолитную фазу, а именно, CIM DEAE диск. Оптимальные условия деградации полирибонуклеотидов, а также методы хроматографического анализа позволили комбинировать данные индивидуальные стадии в один процесс. С этой целью гетерогенный биокатализатор и хроматографический анализатор (анионообменный диск) соединяли последовательно, после чего полученный тандем встраивали в стандартную систему ВЭЖХ. Подачу субстрата в колонку с иммобилизованным ферментом осуществляли через инжектор, а образующиеся в процессе биокаталитической реакции продукты сразу же поступали в аналитическую колонку (Рисунок 16).

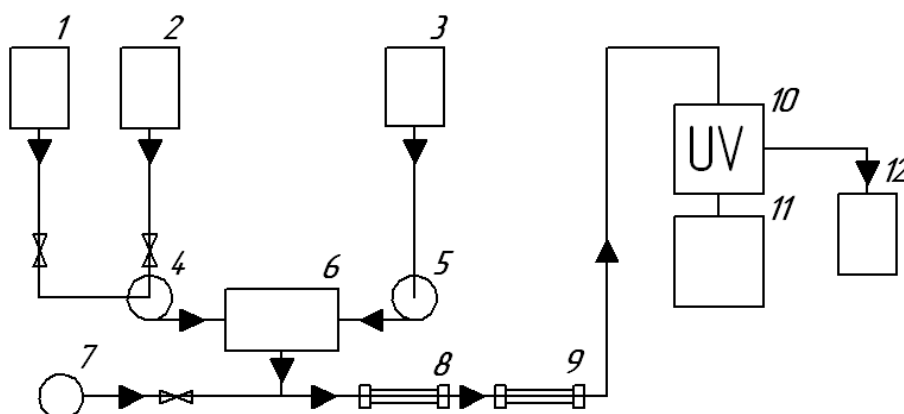


Рисунок 16 – Схема хроматографического биокаталитического реактора для биокатализа и *on-line* мониторинга продуктов реакции.

Обозначения: 1, 2, 3 – емкости для буферных растворов, 4, 5 – насосы, 6 – смеситель, 7 – инжектор, 8 – биореактор, 9 – аналитическая колонка, 10 – УФ-детектор, 11 – коллектор данных (персональный компьютер), 12 – емкость для отработанного раствора.

На примере ферментативной деградации поли(С) была подтверждена высокая эффективность разработанного метода. Выход целевого продукта, цитидин-3'-монофосфата, составлял 91 и 95% для фермента, присоединенного методом прямой иммобилизации (КР₅) и иммобилизации через спейсер (КР₆), соответственно.

Для оценки эффективности гетерогенных биокатализаторов в процессах очистки биологических смесей от примесей РНК была проведена серия экспериментов по изучению деструкции РНК в многокомпонентной модельной смеси биологических макромолекул, содержащей белок (БСА), РНК и ДНК (Рисунок 17).

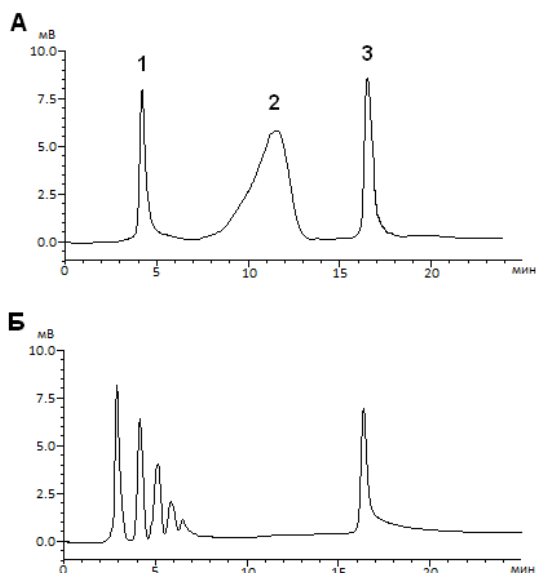
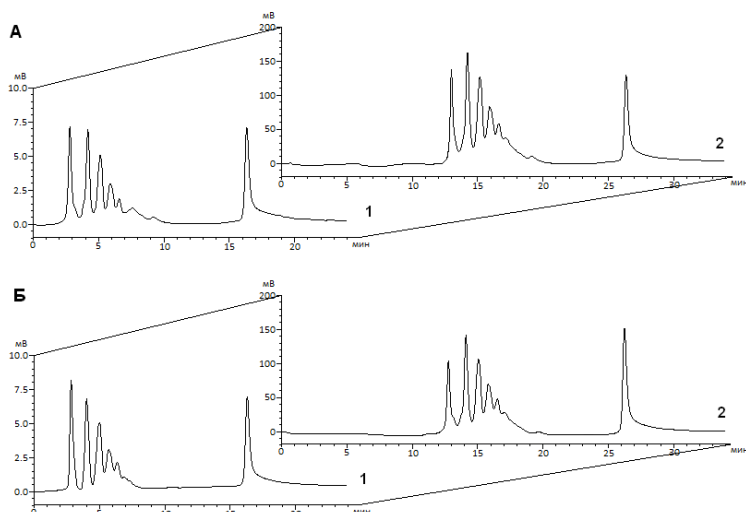


Рисунок 17 – Хроматограммы компонентов модельной биологической смеси (А) и продуктов деструкции РНК, полученных в ходе реакции в растворе (Б).

Обозначения: 1 – БСА, 2 – РНК, 3 – ДНК.

Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный диск CIM DEAE (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Трис-НСI, рН 7.5 + 7 М раствор мочевины в элюенте А, рН 7.5, элюент Б – 1 М NaCl в элюенте А; градиент: 0–20 минут – линейный градиент 0 - 100% элюент Б, концентрация компонентов смеси – по 1.0 мг·мл⁻¹; объем вводимой пробы – 100 мкл; скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл·мин⁻¹.

Показано, что полученные гетерогенные биокатализаторы оказались эффективны для деструкции РНК в многокомпонентной смеси, причем посторонние компоненты не оказывали влияния на процесс конверсии целевого вещества. Анализируя полученные хроматограммы, во всех случаях можно констатировать исчезновение пика, отвечающего нативной РНК, и появление серии пиков, отвечающих набору образующихся после деградации РНК олигонуклеотидов (Рисунок 18).



Обозначения: А – гетерогенный биокатализатор КР₅, Б – гетерогенный биокатализатор КР₆; 1 – *off-line* анализ, 2 – *on-line* анализ.

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Трис-НСI, рН 7.5, элюент Б – элюент А + 7 М мочеви́на, элюент В – 1 М NaCl в элюенте Б; градиент для А и Б (2): 0–5 минут – элюент А (каталитическая реакция), 5–10 минут – элюент Б (уравновешивание сепарационной колонки), 10–25 минут – линейный градиент 0-100% элюент В (анализ продуктов); градиент для А и В (1): см. Рисунок 17.

Рисунок 18 – Off- и on-line мониторинг процесса деструкции РНК, катализируемого иммобилизованной РНКазой

Разработка хроматографического биокаталитического реактора на основе ксиланолитических ферментов

Для проведения процесса деградации ксилана с последующим *on-line* анализом продуктов биокаталитической реакции была получена система, состоящая из комбинации двух гетерогенных биокатализаторов ДК₄ и КК₂ в совокупности с аналитическим диском. Разработанные ранее оптимальные условия проведения хроматографического анализа продуктов каталитической реакции были успешно адаптированы для *on-line* процесса.

On-line мониторинг проводился в условиях зонального элюирования субстрата. 20 минутный процесс, реализованный согласно представленной на Рисунке 19 схеме, позволил достичь 47%-го выхода ксилозы, а также получить смесь ксилоолигосахаридов.

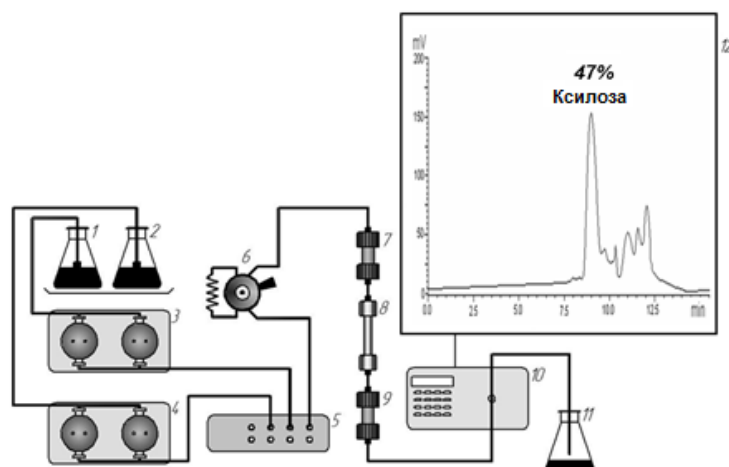


Рисунок 19 – Схема установки для *on-line* проведения процесса деградации ксилана с помощью системы гетерогенных биокатализаторов.

Обозначения: 1, 2 – элюенты; 3, 4 – насосы; 5 – смеситель; 6 – инжектор; 7 – ДК₄; 8 – КК₂; 9 – аналитический CIM DEAE диск; 10 – УФ-детектор; 11 – сток; 12 – хроматограмма *on-line* процесса.

Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный диск CIMDEAE (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Na-ацетатный буфер, рН 5.0, элюент Б – 2 М NaCl в элюенте А, градиент – 0–5 минут – элюент А (каталитическая реакция), 5–20 минут – линейный градиент 0-100% элюент Б (анализ продуктов); скорость потока подвижной фазы – 1.5 мл·мин⁻¹.

Использование гетерогенных биореакторов для изучения процессов деградации медицинских материалов на основе биodeградируемых полимеров

В качестве таких материалов были выбраны наночастицы на основе ПМК ($d \sim 380$ нм), используемые как наноконтейнеры в системах доставки лекарств. Деградацию наночастиц проводили в искусственной среде с помощью нативных и иммобилизованных форм ферментов, а также в плазме крови человека.

Степень деградации наночастиц оценивали посредством расчета выделившейся в ходе реакции молочной кислоты, которую отделяли из реакционной среды методом ультрафильтрации. В противоположность ПМК, полная деградация которой происходит в течение 2-3 дней, процесс биodeградации наночастиц на основе ПМК как с использованием ферментов, так и в плазме крови занимает около 50 дней, что связано с плотной упаковкой полимерных молекул в составе частиц, а также с использованием стабилизаторов в процессе получения частиц, создающих дополнительный барьер для фермента.

На основе анализа полученных графиков было показано, что эффективность нативной и иммобилизованной эстеразы сопоставимы и хорошо коррелируют с процессом естественной деградации наночастиц в плазме крови человека (Рисунок 20).

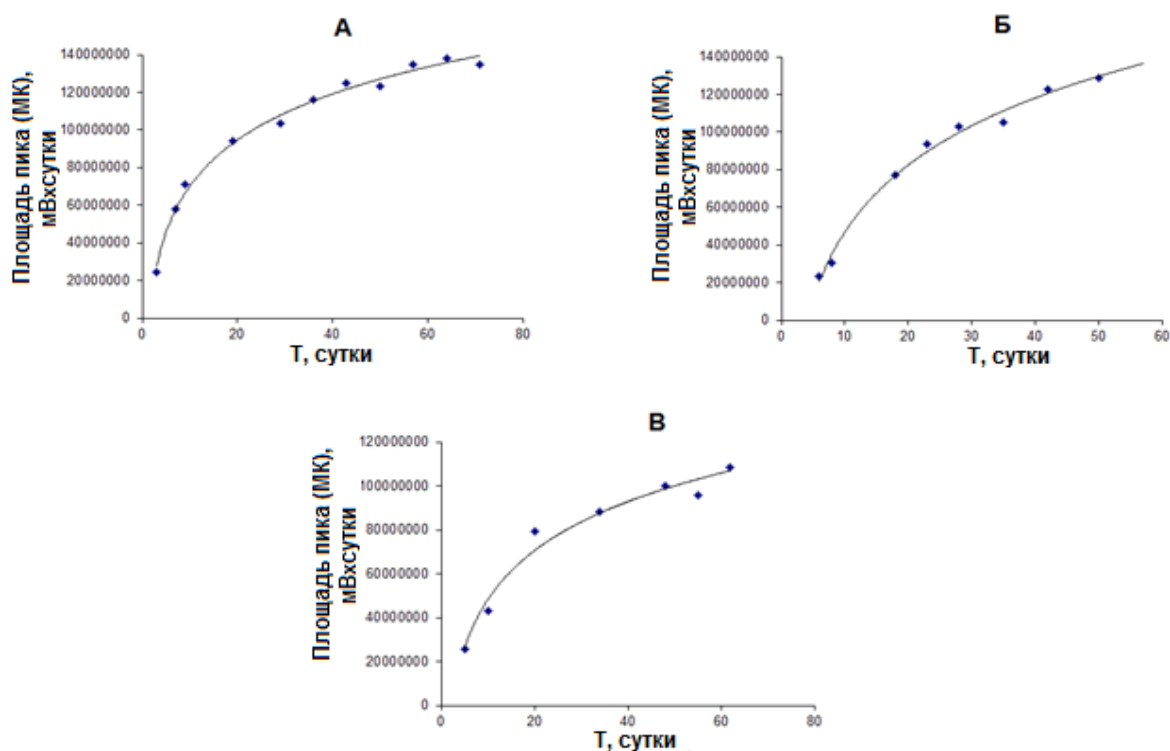


Рисунок 20 – Графики зависимости площади пика, отвечающего молочной кислоте, от времени протекания каталитической реакции: (А) деградация частиц нативной эстеразой, (Б) деградация частиц иммобилизованной эстеразой, (В) деградация частиц в плазме крови

ВЫВОДЫ

1. Получены новые макропористые полиметакрилатные материалы на основе сополимеров глицидилметакрилата, 2-гидроксиэтилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом (ГМА-ГЭМА-ЭДМА), а также глицидилметакрилата с глицерин-1,3-диметакрилатом (ГМА-ГДМА) в форме монолитных колонок с контролируемой поровой структурой. Показано, что максимальная эффективность гетерогенного биокатализа наблюдалась в случае использования в качестве носителя материала на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА.

2. Разработан метод иммобилизации ферментов на поверхности макропористых полимерных монолитных носителей с использованием окисленного полимера 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы в качестве макромолекулярного спейсера. Продемонстрировано увеличение активности фермента, иммобилизованного при использовании разработанного метода, на 20 – 40 % по сравнению с активностью фермента, иммобилизованного стандартным способом.

3. Изучено влияние условий проведения процесса на эффективность гетерогенного биокатализа в разработанных реакторах. Установлено, что исследованные процессы протекали значительно эффективнее при невысокой плотности фермента на поверхности носителя. При увеличении скорости подачи раствора субстрата наблюдался рост удельной активности фермента. В режиме зонального элюирования более эффективными оказались гетерогенные биокатализаторы в форме колонок, тогда как в режиме рециркуляции – гетерогенные биокатализаторы в форме дисков.

4. Разработаны методы ВЭЖХ-мониторинга продуктов ферментативного гидролиза высокомолекулярных субстратов (полицитидиловая кислота, РНК, ксилан, (поли(молочная кислота)) с использованием в качестве стационарных фаз макропористых полиметакрилатных монолитных сорбентов. Продемонстрирована высокая эффективность использования данных методик для хроматографического анализа различных веществ.

5. Исследована перспективность использования полученных гетерогенных биокатализаторов в реакциях деградации природных и синтетических полимеров. На примере деградации полицитидиловой кислоты, РНК, ксилана и поли(молочной кислоты) показана их высокая эффективность, что выражалось как в увеличении скорости каталитических процессов, так и в возможности многократного использования разработанных гетерогенных биокатализаторов за счет повышения стабильности иммобилизованных форм ферментов.

6. Впервые на основе макропористых монолитных носителей созданы хроматографические реакторы, состоящие из биокаталитической и аналитической колонок. На примере практически значимых процессов, а именно очистки многокомпонентной смеси биомолекул от примесей РНК, а также получения ксилозы и ксилоолигосахаридов из древесного ксилана, продемонстрирована перспективность использования разработанных хроматографических реакторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Е.А. Ponomareva, **M.V. Volokitina**, D.O. Vinokhodov, E.G. Vлах, Т.В. Tennikova. Biocatalytic reactors based on ribonuclease A immobilized on macroporous monolithic supports // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. - 2013. - V. 405. P. - 2195–2206.
2. **M.V. Volokitina**, E.G. Vлах, G.A. Platonova, D.O. Vinokhodov, Т.В. Tennikova. Polymer monoliths as efficient solid phases for enzymatic polynucleotide degradation followed by fast HPLC analysis // *Journal of Separation Science*. - 2013. - V. 36. - P. 2793–2805.
3. **M.V. Volokitina**, K.S. Bobrov, K. Piens, E.V. Eneyskaya, Т.В. Tennikova, E.G. Vлах, А.А. Kulminskaya. Xylan degradation improved by a combination of monolithic columns bearing immobilized recombinant β -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100 and Grindamyl H121 β -xylanase // *Biotechnology Journal*. - 2014. - V. 10. - P. 210–221.
4. Е.Г. Влах, **М.В. Волокитина**, Д.О. Виноходов, Т.Б. Тенникова. Деструкция полирибонуклеотидов: сочетание биокатализа и мониторинга продуктов // *Прикладная биохимия и микробиология*. - 2014. - Т. 50. № 6. - С. 600 – 607.
5. Е.Г. Влах, **М.В. Волокитина**, О.В. Назарова, Т.Б. Тенникова / Способ деструкции рибонуклеиновых кислот / *Патент РФ* - № 2551319; Заявл. 08.08.2013; Опубл. 20.05.2015, Бюлл. №14. – 3 с.
6. **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах. Синтез макропористых колонок монолитного типа и создание на их основе гетерогенных биокатализаторов // *6-я Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев – 2012»*. Санкт-Петербург. 3 – 6 апреля, 2012. Сборник тезисов. Ч. 4. - С.202.
7. **M.V. Volokitina**, E.G. Vлах, D.O. Vinokhodov, Т.В. Tennikova. Ribonuclease monolithic-column bioreactors: preparation and properties exploration // *5th Monolith Summer School and Symposium*. Portoroz. June 1 - 6, 2012. Book of abstracts. - P.45.
8. **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах, Д.О. Виноходов, Т.Б. Тенникова. Создание высокоэффективных проточных гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых колонок монолитного типа // *8-я Санкт-Петербургская конференция молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах»*. Санкт-Петербург, 12 – 15 ноября, 2012. Сборник тезисов. - С.116.

9. **M.V. Volokitina**, E.G. Vlakh, D.O. Vinokhodov, T.B. Tennikova. Flow-through monolithic-column immobilized enzyme reactors for RNA destruction // *International Conference «Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications»*. Moscow. July 2 – 5, 2013. Book of abstracts. - P.96.
10. E.G. Vlakh, **M.V. Volokitina**, T.B. Tennikova. Immobilized enzyme reactors based on monoliths // *International Conference «Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications»*. Moscow. July 2 – 5, 2013. Book of abstracts. - P.96.
11. **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах, Д.О. Виноходов, Т.Б. Тенникова. Гетерогенные биокатализаторы нового поколения на основе рибонуклеазы // *15-я Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»*. 11 – 15 февраля, 2013. Москва. Сборник тезисов. - С.45.
12. **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах, Д.О. Виноходов, Т.Б. Тенникова. Исследование свойств гетерогенных биокатализаторов с помощью анионообменной ВЭЖХ. // *2-я Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез»*. 26 – 31 мая, 2013. Краснодар. Сборник тезисов. - С.22.
13. **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах, Д.О. Виноходов, Т.Б. Тенникова. Макропористые монолитные материалы как стационарные фазы для гетерогенного катализа и хроматографического анализа продуктов реакции // *9-я Санкт-Петербургская конференция молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах»*. 11 – 14 ноября, 2013. Санкт-Петербург. Сборник тезисов. - С.90.
14. **М.В. Волокитина**, К.С. Бобров, Е.Г. Влах. Проточные гетерогенные биокатализаторы для получения ксилоолигосахаридов и ксилозы // *8-я Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев – 2014»*. 1 – 4 апреля, 2014. Санкт-Петербург. Сборник тезисов. - С.52.
15. **M.V. Volokitina**, D.O. Vinokhodov, E.G. Vlakh and T.B. Tennikova. Flow-through immobilized enzyme reactors for destruction of biopolymers // *Baltic Polymer Symposium 2014*. September 24 – 26, 2014. Laulasmaa. Book of abstracts. - P.117.
16. **M.V. Volokitina**, K.S. Bobrov , A.A. Kulminskaya , T.B. Tennikova , E.G. Vlakh. Enzymatic degradation of xylan for production of xylooligosaccharides and xylose // *Baltic Polymer Symposium 2014*. September 24 – 26, 2014. Laulasmaa. Book of abstracts. - P.105.
17. К.С. Бобров, **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах, А.А. Кульминская. Гетерологичная экспрессия β -ксилозидазы из *Aspergillus awamori* X-100 в *Pichia pastoris* и иммобилизация рекомбинантного фермента совместно с ксиланазой Grindamyl H121 на полиметакрилатных колоннах для их применения в производстве ксилозы // *2-я Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология»*. 7 - 11 июля, 2014. Саратов. Сборник тезисов. - С.136.
18. К.С. Бобров, **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах, А.А. Кульминская. Иммобилизации ксиланолитических ферментов на полиметакрилатных монолитных колоннах для применения в производстве ксилозы // *1-я Конференция молодых ученых и специалистов ПИЯФ*. 13 – 14 ноября, 2014. Гатчина. Сборник тезисов - С.48.
19. Н.С. Царев, **М.В. Волокитина**, Е.Г. Влах. Создание биореактора на основе иммобилизованной липазы // *Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ»*. 1 – 6 декабря, 2014. Санкт-Петербург. Сборник тезисов. - С.461.
20. E.G. Vlakh, **M.V. Volokitina**, T.B. Tennikova. Macroporous monoliths: efficient heterogeneous biocatalysis followed by fast HPLC monitoring of product // *6-th Monolith Summer School and Symposium*. 30 мая – 4 июня, 2015. Portoroz. Book of abstracts. - P.40.
21. E.G. Vlakh, **M.V. Volokitina** , K.S. Bobrov ,T.B. Tennikova, A.A. Kulminskaya. Recombinant β -Xylosidase from *Aspergillus Awamori* X-100 and Grindamyl H121 Xylanase immobilized on monolithic columns for combined degradation of xylan // *International Conference «Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications»*. Moscow. June 21 – 26, 2015. Book of abstracts. - P.61.
22. **M.V. Volokitina**, E.G. Vlakh, V.A. Korzhikov, T.B. Tennikova. Study of enzymatic degradation of PLA and PLA-nanoparticles // *International Conference «Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications»*. Moscow. June 21 – 26, 2015. Book of abstracts. - P.86.

Бесплатно

Автореферат отпечатан в ИВС РАН. Ризография.

Тираж 100 экз.