

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

---

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.б.н., доцент Д.О. Виноходов

к.х.н., доцент Е.Г. Влах

Санкт-Петербург - 2015

**Список сокращений**

His – гистидин  
Asp – аспарагиновая кислота  
Ser – серин  
Lys – лизин  
Phe – фенилаланин  
Glu – глутаминовая кислота  
Thr – треонин  
Gln – глутамин  
КДИ – 1,1'-карбонилдиимидазол  
ДСК – N,N'-дисукцинимидил карбонат  
ДСС – N,N'- дисукцинимидил суберат  
ДНК – натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
РНКаза – рибонуклеаза А  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ВЭМДХ – высокоэффективная монолитная дисковая хроматография  
ДЭАЭ – диэтиламиноэтил  
QA – четвертичный амин  
АО ВЭЖХ – анионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография  
ЭДМА – этиленгликольдиметакрилат  
ДЭГДМА – диэтиленгликольдиметакрилат  
ТЭГДМА – триэтиленгликольдиметакрилат  
ПЭГДМА – полиэтиленгликольдиметакрилат  
ТРИМ – триметилпропантриметакрилат  
ГДМА – глицерин-1,3-диметакрилат  
ГМА – глицидилметакрилат  
БМА – бутилметакрилат  
ОМА – октилметакрилат  
ДМА – додецилметакрилат  
МК – метакриловая кислота  
ГЭМА – 2-гидроксиэтилметакрилат  
ЦЭМА – 2-цианоэтилметакрилат  
АЭМА – 2-аминоэтилметакрилат  
ГПМА – 3-гидроксипропилметакрилат

ЭМА – этилметакрилат

СЭМА – сульфэтилметакрилат

ВДМА – 2-винил-4,4-диметилазлактон

ТМПТМА – триметилопропантриметакрилат

ЛМА – лаурилметакрилат

СЭМ – сканирующая (растровая) электронная микроскопия

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ИПР – интрузионная ртутная порометрия

БЭТ – метод Брунауэра-Эммета-Теллера

ПМК – поли(молочная кислота)

ПГК – поли(гликолевая кислота)

ПКЛ – поликапролактон

АИБН – азо-бис-изобутиронитрил

ЭДТА – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

пМАГ – поли(2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкоза)

ок.-пМАГ – окисленная поли(2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкоза)

ЦЦФ – цитидин-2',3'-циклофосфат

ЦМФ – цитидин-3'-монофосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

$V$  – проницаемость твердого носителя

$\varepsilon$  – пористость носителя

$d$  – средний размер пор носителя

$U$  – активность фермента

$A$  – удельная активность фермента

$K_M$  – константа Михаэлиса

$V$  – скорость каталитической реакции

$V_{max}$  – максимальная скорость каталитической реакции

$k_{cat}$  – каталитическая константа (число оборотов фермента)

$k_{cat}/K_M$  – эффективность действия биокатализатора

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Ферменты – природные биокатализаторы .....	13
1.1.1. Общие представления о ферментах .....	13
1.1.2. Механизм действия ферментов .....	17
1.1.3. Кинетика ферментативных реакций. Определение параметров .....	20
эффективности ферментативного катализа	
1.2. Гетерогенный биокатализ .....	25
1.2.1. Иммобилизация ферментов и особенности гетерогенного биокатализа .....	25
1.2.2. Влияние иммобилизации ферментов на их свойства .....	26
1.2.3. Способы создания гетерогенных биокатализаторов .....	28
1.2.3.1. Физические методы иммобилизации .....	28
1.2.3.2. Химическая иммобилизация .....	30
1.2.4. Носители для иммобилизации ферментов .....	37
1.3. Монолитные макропористые материалы как носители .....	41
для иммобилизации ферментов и стационарные фазы для ВЭЖХ	
1.3.1. Синтез макропористых монолитных материалов .....	42
1.3.2. Влияние параметров синтеза на поровую структуру монолитов .....	43
1.3.3. Методы исследования поровой структуры макропористых монолитов .....	46
1.3.4. Применение макропористых монолитных материалов .....	49
1.4. Хроматографические реакторы: комбинирование биокатализа и сепарации .....	51
1.5. Применение гетерогенных биокатализаторов .....	56
1.5.1. Рибонуклеаза А .....	57
1.5.1.1. Характеристика фермента .....	57
1.5.1.2. Гетерогенные биокатализаторы на основе рибонуклеазы А .....	60
1.5.2. Ксиланолитические ферменты .....	61
1.5.2.1. $\beta$ -ксиланаза .....	63
1.5.2.2. $\beta$ -ксилозидаза .....	65
1.5.2.3. Гетерогенные биокатализаторы на основе .....	66
ксиланолитических ферментов	
1.5.3. Эстераза .....	68
1.5.3.1. Характеристика фермента .....	69
1.5.3.2. Гетерогенные биокатализаторы на основе эстеразы .....	70

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	74
2.1. Материалы .....	74
2.2. Оборудование .....	75
2.3. Методы .....	76
2.3.1. Получение макропористых монолитных материалов .....	76
2.3.1.1. Синтез макропористых монолитных носителей .....	76
для иммобилизации ферментов	
2.3.1.2. Синтез макропористых монолитных колонок для хроматографии .....	78
2.3.1.3. Изучение свойств монолитных матриц .....	79
2.3.2. Иммобилизация ферментов на поверхности полимерного носителя .....	80
2.3.2.1. Прямая иммобилизация .....	80
2.3.2.2. Иммобилизация через полимерный спейсер .....	80
2.3.2.3. Определение количества иммобилизованного фермента .....	83
2.3.3. Определение кинетических параметров биокаталитических реакций .....	83
2.3.3.1. Рибонкулеаза А .....	84
2.3.3.2. $\beta$ -ксилозидаза .....	85
2.3.3.3. $\beta$ -ксиланаза .....	86
2.3.3.4. Эстераза .....	87
2.3.4. <i>Off-line</i> мониторинг образования продуктов деградации .....	87
высокомолекулярных субстратов	
2.3.4.1. Деградация высокомолекулярных субстратов .....	88
2.3.4.1.1. Деградация полицитидиловой кислоты .....	88
2.3.4.1.2. Деградация РНК .....	88
2.3.4.1.3. Деградация РНК в многокомпонентной смеси .....	89
2.3.4.1.4. Деградация ксилана $\beta$ -ксиланазой .....	89
2.3.4.1.5. Деградация ксилана $\beta$ -ксилозидазой .....	90
2.3.4.1.6. Деградация ксилана с помощью биферментной системы .....	90
2.3.4.1.7. Деградация поли(молочной кислоты) .....	90
2.3.4.1.8. Деградация наночастиц на основе поли(молочной кислоты) .....	91
2.3.4.2. ВЭЖХ мониторинг .....	91
2.3.5. <i>On-line</i> мониторинг образования продуктов деградации .....	93
высокомолекулярных субстратов	
2.3.5.1. Хроматографический реактор на основе рибонуклеазы А .....	93
2.3.5.2. Хроматографический реактор на основе комплекса .....	94
ксилолитических ферментов	

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	95
3.1. Получение макропористых монолитных носителей для иммобилизации ферментов .....	95
3.2. Получение макропористых монолитных стационарных фаз..... для хроматографического анализа	106
3.3. Иммобилизация ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей .....	109
3.4. Изучение влияния различных факторов на эффективность..... гетерогенного биокатализа	116
3.4.1. Влияние природы поверхности материала-носителя .....	117
3.4.2. Влияние метода иммобилизации фермента .....	118
3.4.3. Влияние геометрии стационарной фазы .....	122
3.4.4. Влияние скорости потока раствора субстрата сквозь..... гетерогенный биокатализатор	124
3.4.5. Влияние количества иммобилизованного фермента .....	128
3.5. Изучение деградации природных и синтетических полимеров .....	131
с использованием разработанных гетерогенных биокатализаторов	
3.5.1. Разработка метода хроматографического мониторинга .....	131
поли- и олигонуклеотидов	
3.5.2. Изучение ферментативной деградации полицитидиловой кислоты.....	135
3.5.3. Изучение ферментативной деградации РНК .....	140
3.5.4. Изучение ферментативной деградации ксилана .....	143
3.5.5. Изучение ферментативной деградации поли(молочной кислоты).....	148
3.6. Разработка хроматографических биокаталитических реакторов и изучение.....	152
возможности их применения в процессах биотехнологии	
3.6.1. Разработка хроматографического биокаталитического реактора .....	152
на основе рибонуклеазы А	
3.6.2. Разработка хроматографического биокаталитического реактора.....	158
на основе ксиланолитических ферментов	
3.6.3. Использование гетерогенных биореакторов для изучения процессов .....	160
деградации медицинских материалов на основе биodeградируемых полимеров	
ВЫВОДЫ .....	162
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	164
БЛАГОДАРНОСТИ .....	182

## ВВЕДЕНИЕ

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 степенью субстратной специфичности, 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 свободных 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 технологический 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 сопротив-

ление потоку, 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, подобные 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 получение 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 реализации, надежность, воспроизводимость и возможность применения для анализа и очистки практически всех существующих стабильных химических соединений.

В последнее время создание методических тандемов, совмещающих химической 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 биокаталитических 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 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 выразилось в формировании материалов с различными поровыми характеристиками;
- макропористые монолитные материалы на основе синтезированных полимеров являются перспективными для создания гетерогенных биокатализаторов, при этом гидрофиллизация 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); 5<sup>th</sup> и 6<sup>th</sup> Monolith Summer School and Symposium (Портоторж, 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 (Лауласмаа, 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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Ферменты – природные биокатализаторы

*Ферменты* являются биокатализаторами белковой природы. Уникальные свойства ферментов, способных катализировать химические превращения в мягких условиях с высокой степенью субстратной специфичности, дали возможность их широкого применения как в научной, так и в практической деятельности. В настоящее время ферменты нашли широкое применение в пищевой промышленности [1], [2], медицине и фармацевтической промышленности [3], сельском хозяйстве [4], тонком органическом синтезе [5] и т.д. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении и применении ферментов, интенсивный поиск новых источников ферментов и подробное изучение их каталитических свойств продолжается. Повышенный интерес к ферментам обусловлен перспективами развития технологий эффективного и рационального использования природных биокатализаторов в современных биотехнологических процессах.

#### 1.1.1. Общие представления о ферментах

Как и все белки, ферменты представляют собой полипептиды, упакованные строго определенным образом. На основе изучения химического строения различных ферментов, а также механизмов их действия на *субстрат*, то есть исходное вещество, преобразуемое под действием фермента в продукт, было выявлено, что в контакт с субстратом вступает лишь небольшой участок фермента, называемый *активным центром*, и состоящий, как правило, из 5 – 10 аминокислотных остатков [6].

В активном центре фермента выделяют два участка, а именно, *каталитический участок*, который ответственен за непосредственную функцию фермента, и *контактный* или «*якорный*» *участок*, который обеспечивает специфическое сродство и образование комплекса фермент-субстрат. Известно, что наиболее часто в состав активных центров входят такие аминокислоты, как серин, гистидин, треанин, цистеин, аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Аминокислоты, образующие активный центр, в первичной структуре белка, как правило, расположены далеко друг от друга и оказываются сближенными при формировании пространственной (третичной) структуры [7]. Например, в активный центр протеолитического фермента химотрипсина, состоящего из 246 аминокислотных остатков, входят аминокислоты: His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup> и Ser<sup>195</sup>.

Аминокислоты в составе молекулы фермента, непосредственно не участвующие в процессе катализа, однако связанные с аминокислотами активного центра и образующие его стабильный каркас, называют *вспомогательными*. Также, существует группа *инертных* ами-

нокислот, которые не принимают в катализе даже косвенного участия, и при их удалении не изменяется ни реакционная способность, ни специфичность фермента.

Ферменты, выполняя функцию катализаторов химических реакций, подчиняются общим законам катализа и обладают всеми свойствами, характерными для небиологических катализаторов, а именно катализируют энергетически возможные реакции и не расходуются в процессе реакции [8]. Однако белковая природа ферментов обуславливает появление у них ряда специфических качеств. К ним относятся высокая избирательность по отношению к субстрату и типу катализируемой реакции, а также высокая чувствительность к неспецифическим физико-химическим факторам среды и химическим реагентам [6].

Главной отличительной особенностью ферментов по сравнению с небелковыми катализаторами является их высокая специфичность, в силу которой каждый фермент действует строго только на одно вещество или очень небольшое число близкородственных веществ, катализируя, однако, всякий раз одну и ту же реакцию. Это достигается частичной конформационной и электростатической комплементарностью структуры активного центра фермента и молекулы субстрата.

Чувствительность ферментов к факторам среды выражается в сильной зависимости от температуры и значения pH реакционной смеси. Зависимость скорости реакции от температуры, при которой протекает реакция, имеет сложный характер. С одной стороны повышение температуры оказывает влияние на скорость ферментативной реакции, подобно влиянию на любую химическую реакцию. То есть при нагревании реакционной смеси повышается кинетическая энергия молекул, ускоряется их движение, что приводит к росту вероятности взаимодействия реагирующих веществ. С другой стороны повышение температуры способствует разрыву связей, поддерживающих вторичную и третичную структуры молекулы фермента, приводя к денатурации белка и, как следствие, к снижению или полной потере каталитической функции. В среднем при повышении температуры до 40°C каталитическая активность растет. Дальнейшее повышение температуры способствует резкому ускорению процесса денатурации белка и, хотя скорость реакции преобразования субстрата продолжает расти, активность фермента, выражающаяся количеством превращенного субстрата в единицу времени, снижается (Рисунок 1).

Таким образом, температурный оптимум, то есть значение температуры, при котором скорость каталитической реакции максимальна, для большинства ферментов находится в пределах 30–40°C. В то же время, большинство ферментов практически мгновенно инактивируются при значениях температур в области от 70 до 100°C. Тем не менее, существует ряд бактериальных ферментов, устойчивых в области повышенных температур, например, кри-

сталлическая амилаза, выделенная из *Bacillus stearotherophilus*, сохраняющая 90% своей активности после инкубации при 90°C в течение 1 часа [9].

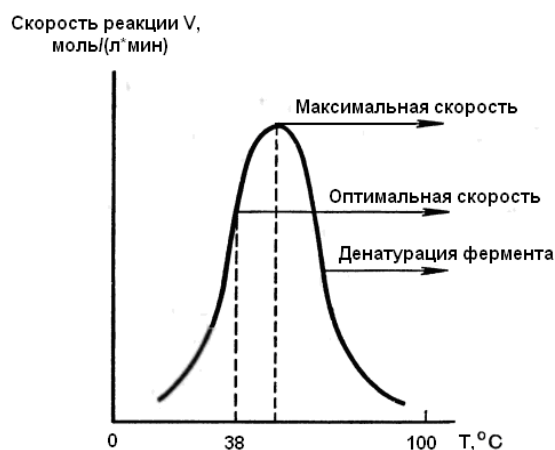


Рисунок 1 – Зависимость скорости каталитической реакции от температуры.

Влияние pH среды на активность фермента связано с ионизацией функциональных групп его аминокислотных остатков. Например, закисление среды приводит к протонированию свободных аминогрупп ( $-\text{NH}_3^+$ ), а защелачивание – к отщеплению протона от карбоксильных групп ( $-\text{COO}^-$ ). Это влечет за собой изменение конформации молекулы фермента и, соответственно, изменение конформации активного центра. Как следствие, нарушается присоединение субстрата, кофакторов и коферментов к активному центру. Кроме того, при экстремальных значениях pH может происходить денатурация фермента и его инактивация.

При постоянной температуре фермент работает наиболее эффективно в узком интервале pH. Значение pH, при котором скорость реакции максимальна, представляет собой pH оптимум фермента (Рисунок 2). У большинства ферментов организма человека оптимум pH находится в пределах pH 6 – 8, но есть биокатализаторы, которые активны при значениях pH, лежащих за пределами этого интервала. Например, протеолитический фермент пепсин наиболее активен при pH 1.5 – 2.5.

Известно, что ферменты очень чувствительны к содержанию в реакционной среде дополнительных химических соединений, которые могут воздействовать на них как в качестве активаторов, так и в качестве ингибиторов каталитической активности. Среди активаторов часто встречаются двухвалентные ионы металлов. Также небольшой активирующий эффект могут вносить анионы галогенов в растворе. Ряд ингибирующих веществ более широк. Сюда относятся любые вещества, вызывающие денатурацию белковой части молекулы фермента (кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов), а также соединения, способные реагировать с функциональными группами фермента или образовывать с ним трудно диссоциирующие

комплексы (йодацетат, его амид и этиловый эфир, пара-хлормеркурибензоат и т.д.). Также существует ряд ингибиторов белковой природы (например, ингибитор трипсина).



Рисунок 2 – Зависимость скорости каталитической реакции от pH среды.

Согласно современной классификации IUPAC, введенной в 1961 году, ферменты подразделяют на несколько классов в зависимости от типа реакции, подвергающейся каталитическому воздействию. Выделяют шесть классов ферментов [10]:

- *оксидоредуктазы*, катализирующие реакции окисления – восстановления;
- *трансферазы*, ускоряющие реакции переноса функциональных групп и молекулярных остатков с одной молекулы субстрата на другую;
- *гидролазы*, катализирующие гидролиз химических связей и распад субстрата;
- *лиазы*, которые ускоряют негидролитическое отщепление от субстратов определенных групп атомов с образованием двойной связи (или присоединяют группы атомов по двойной связи);
- *изомеразы*, ускоряющие пространственные или структурные перестройки в пределах одной молекулы;
- *лигазы*, главная особенность которых сопряженность синтеза с распадом веществ, способных поставлять энергию для осуществления биосинтетического процесса.

Каждый класс содержит подклассы, дающие более точное описание типа каталитической реакции. Подклассы в свою очередь состоят из подподклассов, описывающих тип каталитической реакции в совокупности с субстратом. Таким образом, любой фермент в рамках предложенной классификации описывается совокупностью четырех чисел. Первое число описывает класс, второе – подкласс, третье – подподкласс и четвертое, которое отвечает порядковому номеру фермента в подподклассе [11].

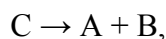


### 1.1.2. Механизм действия ферментов

Главной особенностью ферментативных реакций является то, что они протекают в составе активного комплекса, возникающего в результате связывания субстрата с каталитическим центром молекулы фермента, к которому субстрат обладает специфическим сродством. В результате образования подобного комплекса значительно уменьшается энергия активации химической реакции, что делает возможным более быстрое протекание каталитического превращения. Таким образом, механизм действия ферментов может быть рассмотрен с двух позиций: с точки зрения изменения энергии химических реакций и с точки зрения событий в активном центре ферментной молекулы [12].

В связи с тем, что энергетический уровень реакции является величиной постоянной и неизменной, понижение уровня энергии активации возможно только методом увеличения среднего энергетического уровня молекул реагирующих веществ, что обычно может быть достигнуто повышением температуры, давления и других условий проведения процесса. Одним из наиболее эффективных методов понижения энергии активации является применение катализаторов, в том числе ферментов. Роль ферментов в химических реакциях заключается в том, что они снижают энергию активации, в результате чего возрастает количество реакционно-способных молекул, следовательно, увеличивается скорость реакции [13].

Например, в случае реакции превращения вещества С в вещества А и В, т.е.:



вещество С должно перейти в активное состояние и преодолеть энергетический барьер. Данная реакция будет протекать при обычных условиях, если молекулы вещества С будут иметь энергию, превышающую определенный уровень энергии активации  $E_a$ , то есть достигнут переходного состояния. В итоге произойдет химическое превращение с образованием продуктов А и В.

В случае присутствия в системе биокатализатора, реакция будет осуществляться в два этапа. На первом этапе фермент взаимодействует с субстратом, образуя комплекс фермент-субстрат, который на втором этапе распадается с образованием продуктов реакции и свободной молекулы фермента, готовой к взаимодействию со следующей молекулой субстрата.

В механизме ферментативного катализа решающее значение имеет образование нестойких промежуточных образований, а именно комплексов фермент-субстрат, подвергающихся превращению в нестабильные переходные комплексы, которые почти мгновенно распадаются на свободный фермент и продукты реакции [8]. Образование комплекса фермент-субстрат, как правило, сопровождается определенной деформацией молекулы субстрата, что приводит к ослаблению внутримолекулярных взаимодействий в молекуле субстрата и повышению ее реакционной способности (Рисунок 3).

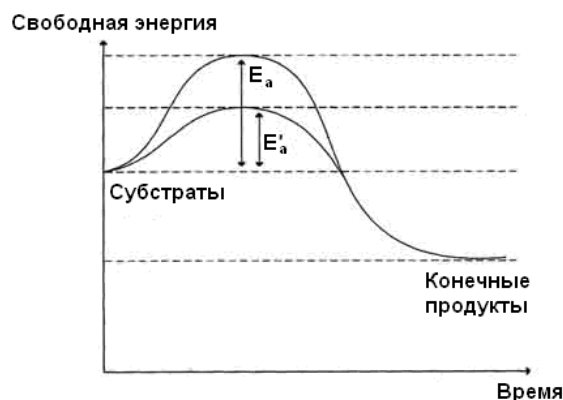


Рисунок 3 – Изменение свободной энергии в ходе некатализуемой и катализуемой ферментами химической реакции:  $E_a$  – энергия активации некатализуемой реакции,  $E'_a$  – энергия активации катализуемой ферментом реакции [14].

С точки зрения процессов, происходящих в активном центре фермента, ферментативный катализ условно можно разделить на следующие этапы: сближение и ориентация субстрата относительно активного центра фермента, формирование фермент-субстратного комплекса, образование комплекса фермент-продукт реакции и отщепление продуктов реакции от фермента (Рисунок 4) [15].

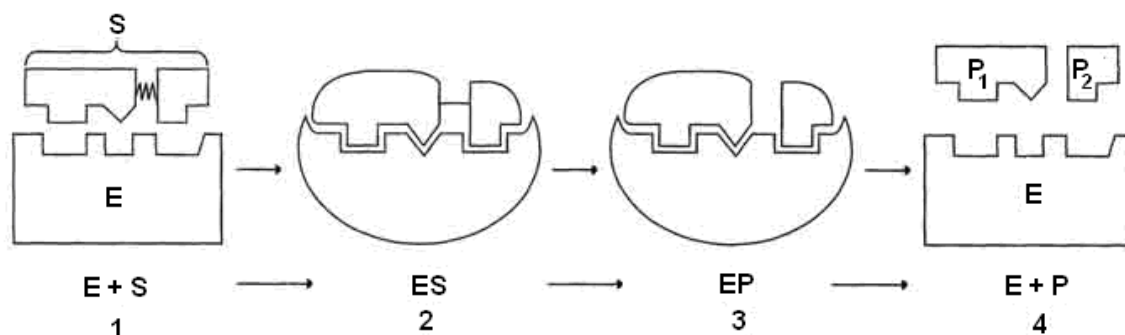


Рисунок 4 – Этапы ферментативного катализа: 1 – этап сближения и ориентации субстрата относительно активного центра фермента; 2 – образование комплекса фермент-субстрат (ES); 3 – деформация субстрата и образование нестабильного комплекса фермент-продукт (EP); 4 – распад комплекса (EP) с высвобождением продуктов реакции из активного центра фермента и освобождением фермента [14].

На первой стадии происходит распознавание субстратом активного центра фермента, сближение и ориентация субстрата относительно молекулы фермента. Далее субстрат, вплотную приближаясь к ферменту, становится на так называемую якорную площадку, образуя комплекс фермент-субстрат. По поводу объяснения взаимодействия фермента с субстратом и образования специфического комплекса было выдвинуто несколько теорий.

Первая теория, а именно теория *стерического соответствия*, в основе которой лежит предположение о том, что специфичность действия фермента определяется строгим соответствием геометрической структуры субстрата и активного центра фермента, была выдвинута Э. Фишером в 1894 году [16]. Согласно данной теории активный центр рассматривался как стабильная, жесткая матрица, комплементарная молекуле субстрата, то есть соответствующая ему как «ключ замку». Теория Фишера хорошо объясняет высокую субстратную специфичность фермента по отношению к одному конкретному субстрату, но не объясняет, почему некоторые ферменты проявляют групповую специфичность в отношении нескольких субстратов.

Приняв во внимание предположения, сделанные Фишером, Д. Кошланд в 1959 году предложил теорию *индуцированного соответствия* субстрата и активного центра фермента [17]. Сущность данной теории сводится к тому, что пространственное соответствие структуры субстрата и активного центра фермента не является заранее определенным, а создается в момент их взаимодействия друг с другом, что может быть выражено формулой «перчатка – рука». То есть активный центр является гибкой структурой по отношению к субстрату. Субстрат, взаимодействуя с активным центром фермента, вызывает изменение его конформации, приводя, таким образом, к формированию комплекса фермент-субстрат, благоприятного для химических превращений субстрата. При этом молекула субстрата также изменяет свою конформацию, что обеспечивает более высокую эффективность ферментативной реакции. Необходимое для взаимодействия с субстратом расположение каталитических групп активного центра при этом не предшествует, а индуцируется при связывании субстрата. После диссоциации продуктов реакции из комплекса с ферментом, молекула последнего возвращается в исходную конформацию.

В настоящее время наиболее полно взаимодействие фермента и субстрата описывает теория *топохимического соответствия*, которая, сохраняя основные положения о взаимноиндуцированной настройке субстрата и фермента, фиксирует внимание на том, что специфичность действия ферментов объясняется в первую очередь узнаванием той части субстрата, которая не изменяется при катализе [8]. Между этой частью субстрата и субстратным центром фермента возникают многочисленные точечные гидрофобные взаимодействия и водородные связи, в результате чего происходит узнавание субстрата активным центром фермента, дальнейшая его ориентация в пространстве относительно молекулы фермента и образование комплекса фермент-субстрат.

На третьей стадии функциональные группы активного центра фермента действуют на субстрат. Связывание субстратов ограничивает их подвижность, сближает и ориентирует их относительно друг друга оптимальным образом для осуществления реакции. В активном

центре фермента субстраты располагаются таким образом, чтобы участвующие в реакции функциональные группы субстратов находились в непосредственной близости друг к другу. Это свойство активного центра называют эффектом сближения и ориентации. Также активный центр фермента способствует дестабилизации межатомных связей в молекуле субстрата, что облегчает протекание химической реакции и образование продуктов. Это свойство активного центра называют эффектом деформации субстрата. Перечисленные эффекты приводят к химическому преобразованию субстрата посредством разрыва связей и образования новых, то есть к протеканию реакции и формированию продуктов, которые некоторое время находятся в связи с ферментом, образуя комплекс фермент-продукт.

На завершающем этапе происходит отделение фермента от продуктов реакции. После чего молекула фермента готова к реализации нового каталитического цикла. Связывание субстрата с активным центром фермента должно быть достаточно легко обратимым, в противном случае активный центр окажется заблокированным первой присоединившейся молекулой субстрата, и каталитический цикл не сможет осуществиться.

### **1.1.3. Кинетика ферментативных реакций. Определение параметров эффективности ферментативного катализа**

Для оценки эффективности каталитических реакций используют такие показатели как скорость реакции и активность фермента. Мерой скорости ферментативных реакций служит количество субстрата, подвергшегося превращению в единицу времени, или количество образовавшегося в единицу времени продукта.

На начальном этапе каталитической реакции скорость прямо пропорциональна времени и имеет линейную зависимость. С течением времени скорость уменьшается. Это может происходить из-за ряда факторов, например, угнетение фермента продуктами реакции, уменьшение степени насыщения фермента субстратом в результате падения концентрации субстрата по мере осуществления реакции, при увеличении концентрации продуктов реакции более существенной может становиться обратная реакция и т.д. Чтобы обойти данные затруднения, при изучении ферментативных реакций измеряют скорость реакции в начальный период времени, когда упомянутые выше факторы еще не успевают проявить своего действия, и условия протекания реакции поддаются точному определению [18].

В 1909 году Л. Михаэлис и М. Ментен описали теорию общего механизма односубстратных ферментативных реакций [19]. Было показано, что при постоянной концентрации фермента скорость катализируемой реакции возрастает с увеличением концентрации субстрата до максимальной величины  $V_{max}$ , после чего в течение довольно длительного периода остаётся постоянной. Это объясняется тем, что при высоких концентрациях субстрата все

активные центры молекул фермента оказываются связанными с молекулами субстрата. Любое избыточное количество субстрата может соединиться с ферментом лишь после того, как образуется продукт реакции и освободится активный центр. Таким образом, дальнейшее повышение концентрации субстрата не приводит к увеличению образования продукта, значит, скорость реакции не возрастает.

График зависимости скорости каталитической реакции от концентрации субстрата имеет вид гиперболы (Рисунок 5). Максимально наблюдаемая скорость есть одна из асимптот к кривой, а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс в области ее отрицательных значений второй асимптотой, соответствует значению константы в уравнении скорости и равен концентрации субстрата, необходимой для достижения половины максимальной скорости [13].

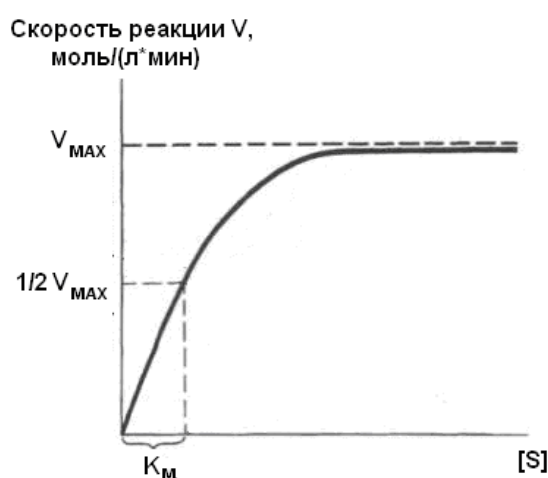


Рисунок 5 – Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Ферментативно катализируемый процесс можно описать следующим уравнением [13]:



где  $k_1$  – константа скорости образования комплекса фермент-субстрат;  $k_2$  – константа скорости обратной реакции, распада комплекса фермент-субстрат;  $k_3$  – константа скорости образования продукта реакции.

В равновесии скорость образования комплекса фермент-субстрат и скорость его распада равны, т.е.:

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3)[ES]. \quad (2)$$

Далее преобразовывают уравнение (2) в (3):

$$[E][S] = [ES] [(k_2 + k_3)/k_1], \quad (3)$$

где соотношение констант скоростей отдельных реакций представляет собой константу, характеризующую каталитический процесс в целом, и называемую *константой Михаэлиса* ( $K_M$ ), т.е.:

$$K_M = (k_2 + k_3)/k_1. \quad (4)$$

Подставляя уравнение (4) в уравнение (2) получают:

$$[ES] = [E][S] / K_M \quad (5)$$

Согласно теории Михаэлиса-Ментен скорость каталитической реакции определяется распадом комплекса ES, образованием продукта реакции и высвобождением биокатализатора:

$$V = k_3 [ES]. \quad (6)$$

При этом максимальная скорость достигается в условиях, когда каталитические сайты фермента насыщены субстратом, т.е.:

$$V_{max} = k_3 [E]_t, \quad (7)$$

где  $[E]_t$  – общая концентрация фермента в реакционной смеси.

Учитывая, что общая концентрация фермента в реакционной смеси определяется формулой:

$$[E]_t = [E] + [ES], \quad (8)$$

подставив уравнения (6)-(8) в уравнение (5), получают уравнение для расчета скорости каталитической реакции, или *уравнение Михаэлиса-Ментен*:

$$V = V_{max} [S] / (K_M + [S]). \quad (9)$$

Анализируя уравнение Михаэлиса-Ментен, видно, что при малых  $[S]$  сумма  $(K_M + [S])$  примерно равна  $K_M$ , следовательно:

$$V = V_{max}[S]/K_M, \quad (10)$$

т.е. скорость реакции возрастает пропорционально концентрации субстрата.

Однако если концентрация субстрата значительно увеличивается, эта пропорциональность исчезает. В данном случае величина  $K_M$  практически не влияет на сумму  $(K_M + [S])$  в уравнении (9), и её можно считать приблизительно равной концентрации субстрата. Скорость реакции при этом перестает зависеть от  $[S]$ , наступает насыщение, когда все молекулы фермента оказываются занятыми субстратом. В этих условиях скорость реакции становится равной максимальной скорости:  $V = V_{max}$ . Таким образом,  $V_{max}$  величина постоянная для данной концентрации фермента, не зависящая от концентрации субстрата, а константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости.

$V_{max}$  дает характеристику каталитической активности фермента и имеет размерность скорости ферментативной реакции [моль/л·мин], то есть определяет максимальную возможность образования продукта при данной концентрации фермента и в условиях избытка субстрата.  $K_M$  характеризует сродство данного фермента к данному субстрату и является вели-

чиной постоянной, не зависящей от концентрации фермента. Чем меньше  $K_M$ , тем выше сродство фермента к данному субстрату, и наоборот, чем больше  $K_M$ , тем ниже сродство фермента к субстрату. Величина  $K_M$  не имеет строго фиксированного значения и может меняться в зависимости от структуры субстрата, а также от условий проведения каталитической реакции (значения pH и температуры среды) [20].

Для расчетов кинетических параметров фермента уравнение Михаэлиса-Ментен алгебраически преобразовывают в другие, более удобные для обработки формы [19]. Наиболее удобными формами преобразования являются уравнения, графически описываемые прямой линией. В настоящее время существует несколько способов преобразования, названные именами их авторов, а именно методы *Лайнуивера-Берка*, *Эди-Хофсти* и *Хейнса-Вольфа* (Рисунок 6).

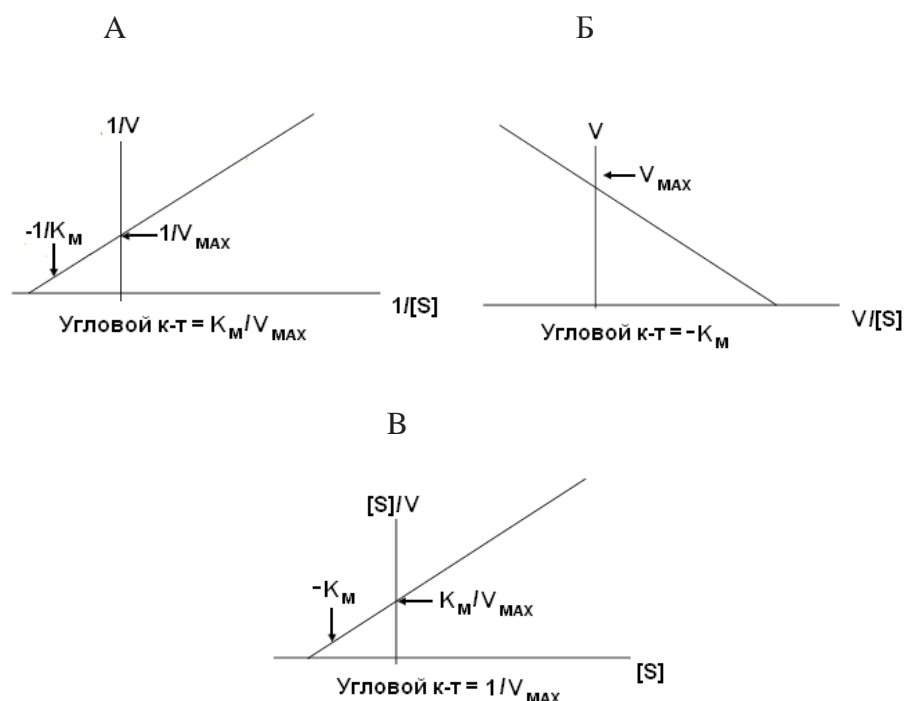


Рисунок 6 – Линейаризация уравнения Михаэлиса-Ментен по методу Лайнуивера-Берка (А), Эди-Хофсти (Б) и Хейнса-Вольфа (В).

При использовании метода Лайнуивера-Берка уравнение Михаэлиса-Ментен представляют в обратных величинах и преобразуют как показано в (11, 12, 13) :

$$1/V = (K_M + [S]) / V_{max} [S] \quad (11)$$

$$1/V = K_M/V_{max} [S] + [S] / V_{max}[S] \quad (12)$$

$$1/V = 1/V_{max} + K_M/V_{max} [S] \quad (13)$$

Согласно уравнению Лайнуивера–Берка график, построенный в координатах  $1/[S]$  и  $1/V$ , представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен  $K_M/V_{max}$ . При этом от-

резок, отсекаемый на оси ординат, принимает значение  $1/V_{max}$ , а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен  $(-1/K_M)$ . Однако следует отметить, что при использовании графика Лайнуивера–Берка наклон прямой линии во многом зависит от точек, лежащих в области низких концентраций субстрата, где определение количества продукта реакции, а, следовательно, и скорости реакции, наименее надежно.

Преобразование уравнения Михаэлиса-Ментен по методу Эди-Хофсти состоит в том, что обе части уравнения Лайнуивера-Берка умножают на  $V_{max}V$  и после некоторых дополнительных преобразований получают:

$$V_{max} / V = 1 + K_M / [S] \quad \text{или} \quad (14)$$

$$V_{max} = V + K_M V / [S] \quad \text{или} \quad (15)$$

$$V = V_{max} - K_M V / [S] \quad (16)$$

Соответствующий график в координатах  $V$  и  $V/[S]$ , называемый графиком Эди-Хофсти, даёт возможность очень просто определить величины  $V_{max}$  и  $K_M$ .

При использовании метода Хейнса-Вольфа линеаризацию уравнения Михаэлиса-Ментен производят в форме:

$$[S] / V = K_M / V_{MAX} + [S] / V_{MAX} \quad (17)$$

В этом случае следует строить зависимость  $[S]/V$  от  $[S]$ . При этом наклон получаемой прямой равен  $1/V_{max}$ , а отрезки, отсекаемые на осях ординат и абсцисс, равны  $(K_M/V_{max})$  и  $(-K_M)$ , соответственно.

Статистический анализ показал, что методы Эди-Хофсти и Хейнса-Вольфа дают более точные результаты, чем метод Лайнуивера-Берка. Причиной этого является то, что в графиках Эди-Хофсти и Хейнса и зависимые, и независимые переменные входят в величины, откладываемые на обеих осях координат [19].

Таким образом, используя уравнение Михаэлиса-Ментен и различные пути его преобразования, можно рассчитать  $K_M$  и скорость каталитического процесса, узнать удельную активность фермента (число микромолей субстрата, превращаемых за 1 минуту 1 мг фермента) и число оборотов фермента  $k_3$ , или  $k_{cat}$  (число молекул субстрата, подвергающихся превращению в единицу времени в расчете на одну молекулу фермента), а также эффективность действия биокатализатора, описываемое соотношением  $k_{cat}/K_M$ .



## 1.2. Гетерогенный биокатализ

### 1.2.1. Иммобилизация ферментов и особенности гетерогенного биокатализа

Несмотря на перечисленные выше достоинства ферментов как эффективных и специфичных катализаторов, известно, что использование биомолекул в свободном виде в растворе имеет ряд ограничений, связанных с высокой стоимостью и малой стабильностью их структуры, а также с трудностями в удалении их из реакционной среды по окончании каталитической реакции. Преодолеть эти недостатки можно при использовании подхода гетерогенного биокатализа, то есть биокатализа, осуществляемого ферментами, локализованными на поверхности твердой фазы [21].

Процесс иммобилизации ферментов заключается в их прикреплении в активной форме к нерастворимой основе [22]. Локализация фермента на поверхности носителя может осуществляться за счет физической адсорбции или хемосорбции. Впервые идея гетерогенного биокатализа была реализована еще в 1916 году. Дж. Нельсон и Е. Гриффин провели адсорбцию инвертазы на угле и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность [23].

На примере большого количества проведенных исследований было показано, что иммобилизация ферментов является весьма ценным и эффективным методом, так как позволяет получить гетерогенные формы биокатализаторов, обладающие целым спектром преимуществ по сравнению с нативными биомолекулами [24]. В первую очередь, применение иммобилизованных ферментов значительно упрощает процесс отделения продуктов каталитической реакции от биокатализатора. Во-вторых, иммобилизация ферментов позволяет использовать биокатализатор многократно, автоматизировать процесс биокатализа и обеспечивать непрерывность его проведения, а также более тонко регулировать параметры проведения катализируемой реакции. Особенная ценность иммобилизации ферментов заключается в стабилизации конформации биокатализатора, препятствующей, таким образом, денатурации фермента и падению его активности, что позволяет успешно работать в области повышенных температур и высоких значений pH.

Таким образом, применение гетерогенных биокатализаторов получило широкое распространение в различных областях промышленности и науки благодаря обеспечению высокой стабильности фермента, наряду с отсутствием его загрязнения продуктами реакции, что позволило использовать одну и ту же порцию фермента несколько раз и во много раз снизить экономические затраты на проведение биокаталитических процессов.

### 1.2.2. Влияние иммобилизации ферментов на их свойства

Так как ферменты являются достаточно лабильными структурами, очевидно, что метод иммобилизации и природа твердого носителя не могут не оказывать влияния на такие свойства биокатализаторов, как биологическая активность и стабильность. Причем иммобилизация может приводить в разных случаях, как к сохранению, так и к резкому падению активности и стабильности биокатализатора. Различие в кинетических свойствах свободного и иммобилизованного фермента может быть обусловлено рядом факторов [25], среди которых:

- Влияние диффузионных ограничений. Диффузионные ограничения часто проявляются в том, что полимерная матрица, к которой прикреплен фермент, может препятствовать проникновению субстрата к ферменту или выходу в среду продуктов реакции.
- Влияние эффекта распределения. Определенную роль в создании эффекта распределения играют различные взаимодействия растворенных веществ с полимерной матрицей. Вследствие этого полимерный материал матрицы может либо притягивать, либо отталкивать от своей поверхности субстрат, продукт реакции, ингибитор/активатор и различные ионы, тем самым, повышая или понижая их концентрацию в растворе, в результате чего их состав вокруг фермента и во всей системе будет отличаться.
- Влияние пространственных эффектов. Из-за того что, иммобилизация белков носит статистический характер активный центр фермента может быть ориентирован к поверхности матрицы и, как следствие, недоступен для молекул субстрата.
- Влияние модификации ферментов. Инактивация фермента в результате иммобилизации может возникать вследствие затрагивания остатков аминокислот, входящих в активный центр фермента, а также при проведении процесса иммобилизации в жестких условиях (высокое значение pH или температуры, присутствие свободных радикалов или окисляющих агентов и др.). Также иммобилизация фермента может сопровождаться какими-либо внутримолекулярными взаимодействиями в структуре белка, приводящими к снижению его активности. С другой стороны, локализация молекул фермента может способствовать увеличению его активности в результате закрепления активной конформации иммобилизованной молекулой.
- Влияние микроокружения. На активность иммобилизованных ферментов, как и в случае свободных, могут оказывать влияние низко- и высокомолекулярные вещества, субстраты и продукты реакции, находящиеся в растворе. Любая полимерная матрица, затрудняющая свободную диффузию субстрата, ограничивает и свободную диффузию продукта, в результате чего концентрация продукта в микроокружении фермента будет выше, чем при проведении реакции в растворе, что может приводить к ингибированию каталитической реакции.

- Влияние количества иммобилизованного фермента. Как правило, для преобразования субстрата в продукт часто требуется небольшое количество фермента. При слишком большой емкости фермента на поверхности твердой фазы могут иметь место стерические затруднения, снижающие эффективность биокатализа. С другой стороны, слишком малое количество фермента может не справляться с подаваемым количеством субстрата особенно при использовании высоких концентраций. Таким образом, для реализации эффективного биокаталитического процесса необходимо найти оптимальное содержание фермента на поверхности твердого носителя.

- Влияние эффекта удаления продуктов. В многочисленных работах было продемонстрировано, что иммобилизованные ферменты могут быть более активными, чем нативные при снижении ингибирующего эффекта продуктов реакции при их постоянном отводе из реактора.

- Влияние способа связывания. Влияние данного фактора на активность фермента обусловлено количеством связей, образованных между носителем и молекулами фермента, а также их положением относительно активного центра фермента. Чем больше количество связей, образованных между ферментом и носителем, тем ниже активность получаемого гетерогенного биокатализатора. Тот же эффект наблюдается при использовании для формирования ковалентной связи функциональных групп фермента, лежащих в непосредственной близости к его активному центру или входящих в его состав.

Как и активность гетерогенных биокатализаторов, их стабильность также в значительной степени зависит не только от свойств самого фермента, но и от природы носителя и типа связи между ферментом и матрицей [26]. В основе технологичности иммобилизованных ферментов лежит, прежде всего, их высокая стабильность, выраженная в повышении термостабильности, устойчивости при кислотных и щелочных рН среды, а также устойчивости к денатурирующим агентам [25]. Если активность и стабильность нативного фермента главным образом определяются его внутренней структурой, то для иммобилизованного фермента данные параметры в значительной степени зависят от ряда дополнительных факторов [21]. Например, благоприятное микроокружение иммобилизованного фермента достигается за счет выбора соответствующих носителей или инженерии микросреды; стабилизация конформации в результате многоточечного крепления и т.д. Таким образом, правильный выбор оптимального материала твердого носителя и метода иммобилизации позволяет управлять свойствами получаемого гетерогенного биокатализатора.

### 1.2.3. Способы создания гетерогенных биокатализаторов

Существует большое количество различных методик и способов иммобилизации ферментов на поверхности твердых носителей. В целом, в зависимости от природы связи фермента с поверхностью стационарной фазы выделяют два способа иммобилизации, а именно физическую (нековалентную) и химическую (ковалентную) иммобилизацию.

#### 1.2.3.1. Физические методы иммобилизации

Физическая иммобилизация фермента представляет собой вариант локализации без образования ковалентных связей между материалом матрицы и иммобилизованной молекулой. Она может быть осуществлена посредством различных методик, среди которых адсорбция фермента, включение в гель или мембранные структуры, а также иммобилизация с образованием хелатной связи. Из-за типа закрепления фермента физические методы в основном являются обратимыми, то есть такими при которых иммобилизованные ферменты при определенных условиях могут быть отделены от материала носителя.

Среди различных методов физической иммобилизации ферментов адсорбция на поверхности носителя является одним их ранних методов, не потерявшим своего значения и в наши дни. На сегодняшний день в литературе широко описано получение иммобилизованных ферментов путем их физической адсорбции на поверхности различных носителей, например, кремнезема, активированного угля, графитовой сажи, различных глин, пористого стекла, материалов на основе синтетических полимеров, оксидов алюминия, титана и других металлов, полисахаридных гелей и т.д. [27], [28], [29]. Процесс адсорбции ферментов на поверхности нерастворимых носителей отличается крайней простотой. В данном случае подложку либо помещают в водный раствор фермента, либо смешивают с частицами носителя, либо пропускают через заполненные носителем колонки. После удаления неадсорбированного фермента гетерогенный биокатализатор готов к использованию [30].

Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет нескольких видов неспецифических взаимодействий между носителем и поверхностными группами фермента, например, за счет ван-дер-ваальсовых сил, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий.

Вклад каждого типа взаимодействий зависит от химической природы носителя и функциональных групп, содержащихся на поверхности молекулы фермента. Иммобилизация путем адсорбции является мягким процессом, и обычно позволяет хорошо сохранить каталитическую активность биомолекулы, так как вызывает лишь незначительные изменения в ее структуре. Обратной стороной этого является непрочное удерживание фермента на поверхности матрицы, и, как следствие, возможность его постепенной десорбции. К утечке фермен-

та с поверхности могут приводить случайные изменения в составе подвижной фазы или температуры. В результате, во-первых, происходит потеря биологической активности гетерогенного биокатализатора, а, во-вторых, продукты реакции загрязняются ферментом. Однако помимо кажущегося негативного эффекта процесса десорбции существует и позитивный аспект. В частности, одним из плюсов физической иммобилизации является возможность регенерации носителя и, затем, проведения повторной иммобилизации свежей порции биокатализатора [25].

Не менее распространенным методом физической иммобилизации является метод включения фермента в полимерный гель. Этот способ отличается от адсорбционных методов тем, что фермент не связан с поверхностью матрицы. Суть метода состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель [31]. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор. Как правило, такой метод позволяет свести к минимуму возможность высвобождения биокатализатора, но часто приводит к ограничениям в транспорте субстрата к активному центру фермента, что, в целом, не позволяет достичь высокой эффективности гетерогенного биокатализа.

Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами. В первом случае фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента. Для такого процесса часто используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона и силикагеля. Во втором случае фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние. В качестве носителей в данном подходе используются гели крахмала, агар-агара, агарозы, фосфата кальция и др.

Другой разновидностью захватывания фермента является иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры [32]. Общий принцип данного метода заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой, которая легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой (микрокапсулирование или заключение в липосомы).

Следующей разновидностью физических методов иммобилизации является так называемое присоединение через хелатную связь. Было установлено, что соли и гидроксиды переходных металлов, осажденные на поверхности органических носителей, взаимодействуют

с нуклеофильными группами на поверхности матрицы с образованием координационных связей [33]. Данный способ иммобилизации довольно прост в исполнении и позволяет сохранить активность иммобилизованных ферментов, однако стабильность гетерогенного биокатализатора в целом невысока вследствие постепенной утечки ионов металла с поверхности носителя в ходе эксплуатации.

### 1.2.3.2. Химическая иммобилизация

В отличие от физической иммобилизации химическая основана на образовании ковалентной связи между молекулой белка и материалом матрицы [23]. Гетерогенные биокатализаторы, полученные путем ковалентной иммобилизации, обладают, по крайней мере, двумя важными преимуществами. Во-первых, ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность связывания биомолекулы с поверхностью. При широком варьировании условий каталитической реакции фермент не десорбируется с поверхности носителя и не загрязняет целевых продуктов катализируемой им реакции. Это особенно важно при реализации процессов медицинского и пищевого назначения, а также для обеспечения устойчивых, воспроизводимых результатов в аналитических системах. Во-вторых, химическая иммобилизация ферментов способна приводить к существенному повышению стабильности биокатализатора, а зачастую, и к росту его каталитической активности вследствие закрепления активной конформации белка [21].

Ковалентная иммобилизация осуществляется в результате химической реакции между реакционноспособными функциональными группами фермента и твердой матрицы. В то время как функциональные группы для иммобилизации на поверхности носителя могут быть выбраны относительно свободно, химическая модификация фермента, как правило, приводит к снижению его биологической активности. В связи с этим, одним из главных условий при выборе способа прикрепления фермента к поверхности носителя является максимальное сохранение биологической активности биокатализатора. Для этого реакцию необходимо проводить в как можно более мягких условиях, чтобы не допустить денатурацию белковой молекулы. Кроме того, во избежание потери биологической активности реакционные группы, участвующие в связывании биомолекулы, должны быть по возможности удалены от ее активного центра. Сформированная ковалентная связь должна быть стабильной в широком диапазоне экспериментальных условий, а остаточные после реакции иммобилизации функциональные группы сорбента должны быть дезактивированы.

Как правило, макромолекулы белка связываются с поверхностью сорбента статистически, за счет формирования нескольких ковалентных связей. С одной стороны, такое многоточечное присоединение уменьшает риск отщепления связанной биомолекулы и способ-

ствует стабилизации ее структуры, но с другой может приводить к деформации нативной конформации биомолекулы, что, в свою очередь, способно отразиться на биологической активности фермента.

Ковалентная иммобилизация белков осуществляется за счет боковых функциональных групп аминокислот. Из 20 природных аминокислот, реакционноспособные боковые группы содержат лишь несколько: это  $\gamma$ - и  $\beta$ -карбокисильные группы глутаминовой и аспарагиновой кислот, сульфгидрильная группа цистеина, имидазольная группа гистидина,  $\varepsilon$ -аминогруппа лизина, тиоэфирная составляющая метионина, индольная группа триптофана и, наконец, фенольная группа тирозина. Однако известно, что в результате складывания молекулы фермента в третичную структуру в большинстве случаев, более гидрофобные аминокислоты, такие как аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин, фенилаланин и триптофан находятся внутри компактной глобулы белка, и их остатки мало или совсем недоступны для химических реакций с функциональными группами на поверхности матрицы [34]. Таким образом, основными функциональными группами, позволяющими проводить иммобилизацию белков в водных средах, являются  $\gamma$ - и  $\beta$ -карбокисильные группы глутаминовой и аспарагиновой кислот, сульфгидрильная группа цистеина и  $\varepsilon$ -аминогруппа лизина.

Химическая иммобилизация ферментов зачастую является достаточно простым процессом, однако при выборе стратегии иммобилизации необходимо учитывать имеющиеся активные группы на поверхности носителя. Сорбенты, содержащие на поверхности собственные реакционноспособные функциональные группы (эпоксидные, альдегидные, активированные эфирные или винилазлактонные), могут быть модифицированы непосредственно за счет реакции с аминогруппами биомолекул (Рисунок 7 (А)).

Один из самых распространенных и простых подходов – это иммобилизация ферментов на поверхности материалов, несущих эпоксидные группы, посредством их прямой реакции с аминогруппами фермента (Рисунок 8 (А)). Недостатком данного подхода является длительность твердофазной реакции (16-20 часов при pH 9.0). Не менее популярным методом является ковалентное связывание ферментов с носителями, содержащими на поверхности альдегидные группы. Реакция альдегидных групп с аминокислотными лигандами протекает достаточно быстро (2-4 часа при pH 8.5) в мягких условиях и без выделения токсичных побочных продуктов. Недостатком данного подхода является необходимость проведения дополнительной стадии восстановления образовавшихся нестабильных иминных связей, или оснований Шиффа (Рисунок 8 (Б)). Реакция иммобилизации белков и пептидов на поверхности полимерных материалов, содержащих активированные сложноэфирные группы, например, N-сукцинимидные или N-гидроксифталимидные, протекает достаточно быстро (1-2 часа при pH 8.5) и сопровождается образованием стабильной амидной связи между мо-

лекулой фермента и поверхностью носителя (Рисунок 8 (Г)). Также, одним из удобных методов прямой ковалентной иммобилизации ферментов на поверхности полимерных носителей является реакция аминогрупп белков с винилазлактонными группами матрицы, ведущая к образованию стабильной ковалентной связи (Рисунок 8 (В)).

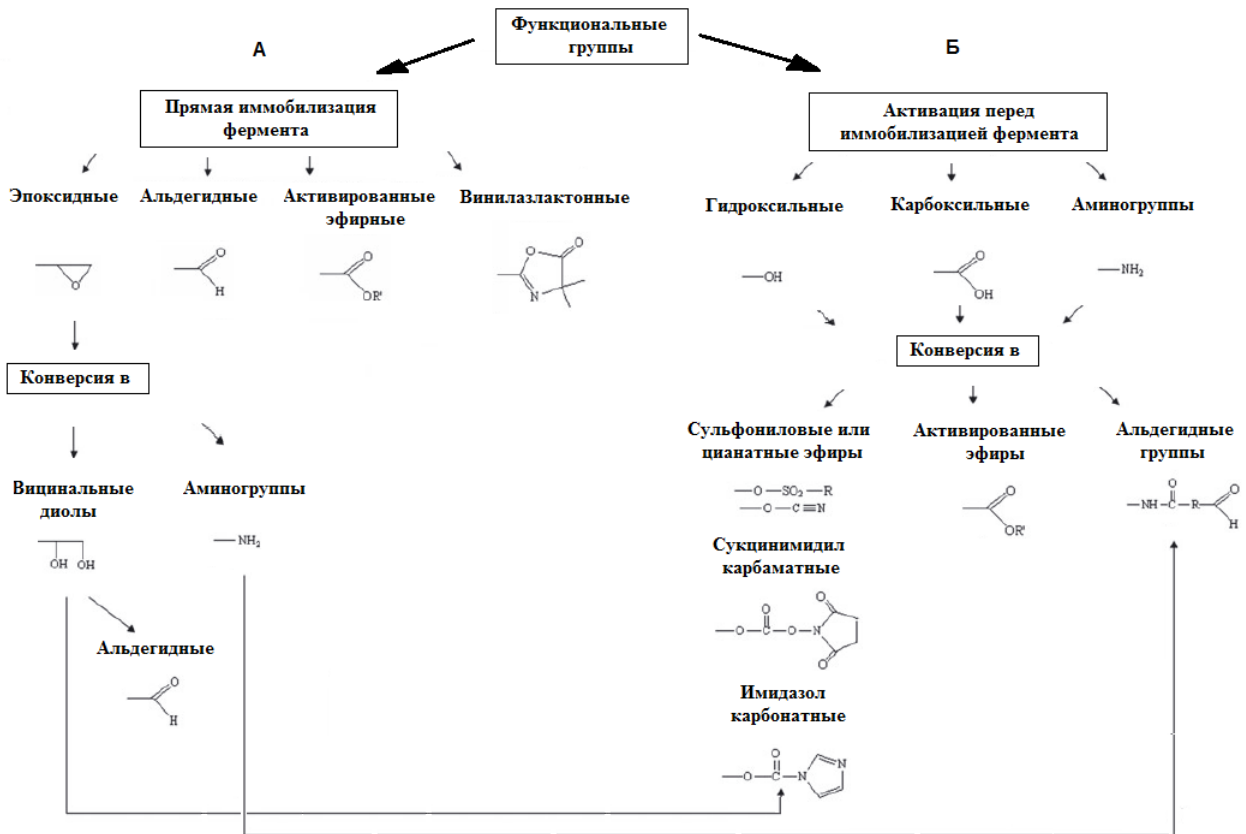


Рисунок 7 – Функциональные группы поверхности, наиболее часто используемые для ковалентной иммобилизации биомолекул. Рисунок адаптирован из [35].

При отсутствии необходимых групп для непосредственного проведения процесса иммобилизации приходится включать дополнительные стадии. В частности, кроме прямого прикрепления фермента к поверхности носителя можно выделить еще три способа ковалентной иммобилизации, в основе которых лежит: (1) активация функциональных групп носителя, (2) активация функциональных групп фермента, и (3) использование би- или полифункциональных агентов [21].



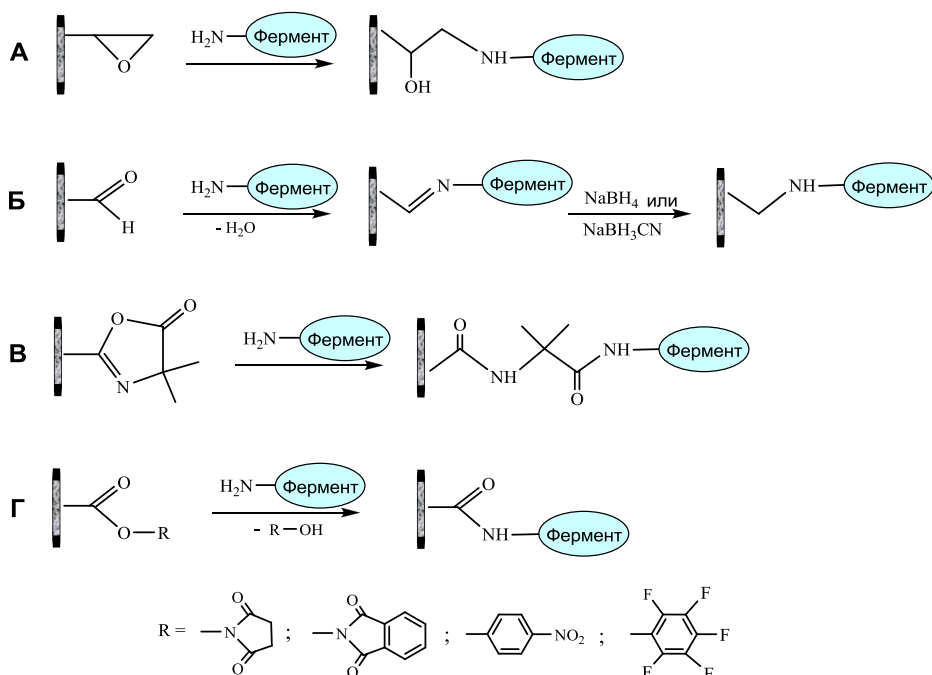


Рисунок 8 – Методы иммобилизации ферментов на поверхности материалов, несущих различные реакционноспособные группы: *А* – эпоксидные, *Б* – альдегидные, *В* – винилазлактонные, *Г* – активированные сложноэфирные группы. Рисунок адаптирован из [35].

- Активация функциональных групп носителя.

В данном случае модификации подвергаются функциональные группы, расположенные на поверхности матрицы. Методы, используемые для активации того или иного носителя, напрямую связаны с его химической природой и обусловлены наличием в составе носителя тех или иных групп, способных к модификации. Наиболее распространенными являются методы модификации поверхности, содержащей карбоксильные, гидроксильные и аминогруппы. При необходимости также может проводиться конверсия эпоксидных групп носителя в более реакционноспособные альдегидные или аминогруппы.

Среди методов модификации гидроксильных групп, расположенных на поверхности носителей, в первую очередь применяют окисление вицинальных диолов до альдегидных групп, активацию цианоборгидридом, различными хлорсульфоновыми кислотами и др. (Рисунок 9 (А, Б, В,)).

Активация карбоксильных групп на поверхности носителей может достигаться за счет проведения различных реакций ацилирования (Рисунок 9 (Д, Е)). Среди наиболее распространенных методик активации можно упомянуть получение ангидридов, галогенидов фосфора или серы, сукцинимидов и др. Часто для активации также используют карбодиимидный метод или метод активированных эфиров.

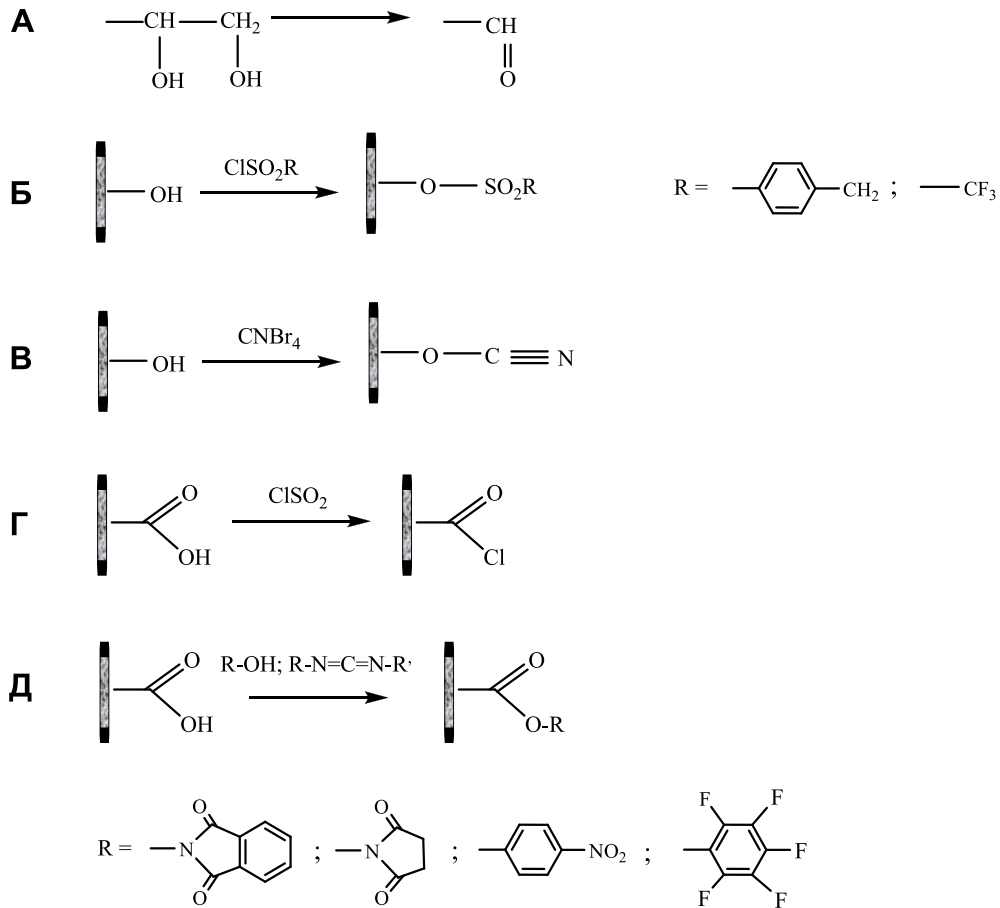


Рисунок 9 – Методы модификации материалов, содержащих гидроксильные (А, Б, С) и карбоксильные группы (Д, Е).

- Активация фермента.

Хотя молекулы ферментов содержат ряд функциональных групп, их наличия не всегда бывает достаточно для проведения того или иного процесса иммобилизации. Наиболее часто процесс иммобилизации белков проводят за счет реакции с их аминогруппами. Однако для некоторых ферментов, содержащих в активном центре остатки лизина, данный метод может быть не оптимальным, вследствие вероятности их участия в реакции иммобилизации, а, следовательно, потери активности иммобилизованного фермента. В этом случае иммобилизацию проводят за счет предварительной модификации карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот для последующей реакции с аминогруппами, локализованными на поверхности носителя [36], [37] (Рисунок 9 (Д, Е)). Недостатком данного подхода является возможность сшивания глобул белка, содержащих помимо карбоксильных также и аминогруппы. Данный побочный эффект может быть минимизирован путем проведения реакции активации в разбавленных растворах, при пониженных температурах и в областях рН, не способствующих протеканию реакции с участием аминогрупп.

- Использование би- или полифункциональных агентов.

Часто для проведения ковалентной иммобилизации с использованием матриц, содержащих функциональные группы непригодные для прямой реакции с аминогруппами ферментов, используют промежуточные полифункциональные агенты. Данные соединения должны содержать, как минимум, две реакционноспособные группы, из которых одна нужна для прикрепления к матрице, а вторая – для связывания с молекулой фермента. Наиболее широко используемыми бифункциональными соединениями являются глутаровый альдегид, 1,1-карбонилдиимидазол (КДИ),  $N,N'$ -дисукцинимидил карбонат (ДСК) или  $N,N'$ -дисукцинимидил суберат (ДСС) [38]. Схемы соответствующих реакций приведены на Рисунке 10.

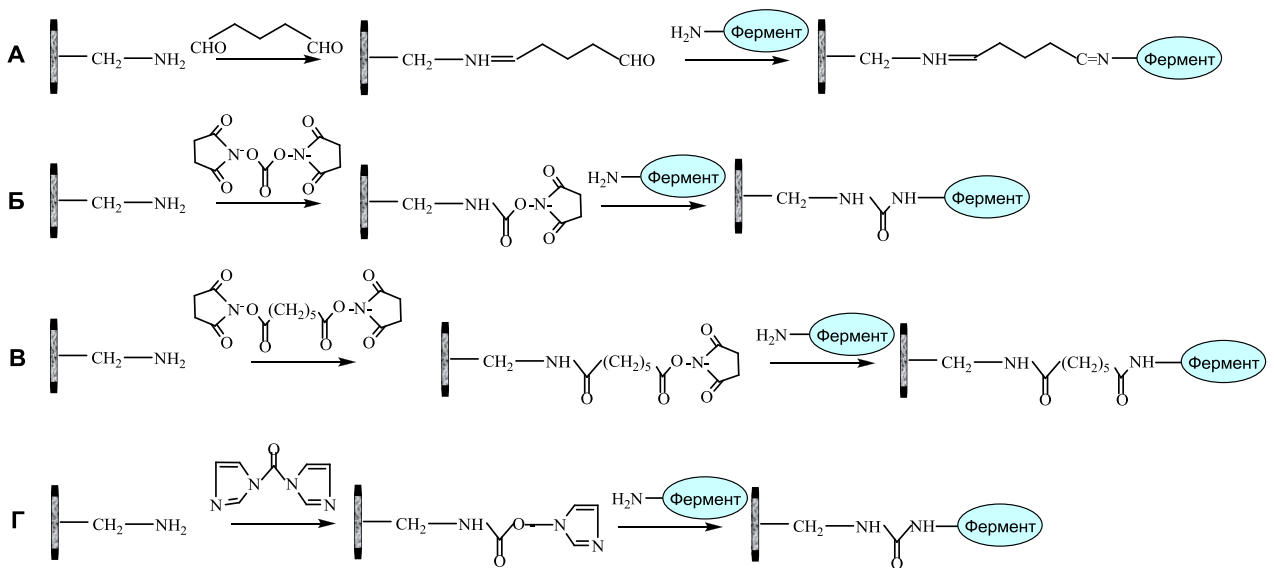


Рисунок 10 – Схемы реакций иммобилизации ферментов на поверхности матриц, несущих аминогруппы, посредством использования бифункциональных агентов: *A* – глутарового альдегида, *B* –  $N,N'$ -дисукцинимидил карбоната, *V* –  $N,N'$ -дисукцинимидил суберата и *Г* – 1,1'-карбонилдиимидазола.

В данных случаях бифункциональные агенты помимо основной функции также играют роль коротких *спейсеров*, дистанцирующих фермент от поверхности носителя, и, таким образом, позволяющих минимизировать стерические затруднения в осуществлении каталитического процесса, накладываемые присутствием фермента на поверхности твердого носителя (Рисунок 11). Кроме того, спейсеры увеличивают подвижность иммобилизованной молекулы, что также способствует незатрудненному взаимодействию фермента с субстратом.

Правильный выбор природы и длины промежуточного спейсера может уменьшать вероятность нежелательного или неспецифического взаимодействия биомолекул с поверхностью твердой матрицы. Обычно для удаления от поверхности небольших лигандов или белков, взаимодействующих с низкомолекулярными соединениями, используют спейсеры длиной 6-12 атомов. Важно подчеркнуть, что выбранный спейсер не должен вносить дополни-

тельных зарядов и должен быть гидрофильным, чтобы исключить возможность любых неспецифических взаимодействий. Этим требованиям удовлетворяет относительно небольшой ряд соединений. Большинство из них содержат концевые амино-, карбоксильные или гидроксильные группы. Например, помимо вышеуказанных бифункциональных агентов, играющих роль коротких спейсеров, можно упомянуть 6-аминокапроновую кислоту, 1,6-диаминогексан, этилендиамин, 1,3-диамино-2-пропанол, янтарную кислоту, 1,4-бутандиол диглицидиловый эфир и др. [38].



Рисунок 11 – Схема ковалентной иммобилизации фермента посредством введения промежуточного спейсера [39].

Однако короткие спейсеры могут быть неподходящими при реализации взаимодействия больших белковых молекул с высокомолекулярными субстратами. В случае применения таких спейсеров большая часть поверхности белка (20-30%) все же остается ориентированной к поверхности носителя на очень близком расстоянии. Поскольку процесс иммобилизации фермента носит статистический характер, для некоторых молекул биокатализатора активный центр может быть ориентирован к поверхности и, как следствие, быть недоступным для макромолекул субстратов.

Контраргументом против применения более длинных спейсеров, в качестве которых могут выступать не только бифункциональные, но и полифункциональные агенты, долгое время считалась возможность возникновения стерических затруднений, связанных с их пространственной укладкой. Тем не менее, в качестве положительного примера можно привести использование инертных декстранов в качестве длинных гидрофильных спейсеров. Так, в работе [40] для иммобилизации ренина на поверхности агарозного геля авторы использовали спейсеры различной длины, а именно низкомолекулярные – длиной С2 и С12, и декстраны с молекулярной массой 6000 и 20000.

Было показано, что в реакции с низкомолекулярным субстратом активность ренина во всех случаях была сопоставимой. Однако, при гидролизе высокомолекулярного субстрата (κ-казеина) активность фермента существенно зависела от способа иммобилизации. Так, при использовании коротких спейсеров, а именно С2 и С12, она составляла всего 3 и 6%, соответственно, от активности нативного фермента. Увеличение активности ренина до 25% от уровня гомогенной реакции наблюдалось при использовании в качестве спейсера декстрана с

молекулярной массой 6000. При этом применение спейсера с молекулярной массой 20000 способствовало снижению активности иммобилизованного фермента. Авторы предположили, что в данном случае спейсер укладывается вокруг иммобилизованной молекулы фермента, создавая, таким образом, дополнительные ограничения для проникновения субстрата к активному центру фермента (Рисунок 12).

Кроме того, было показано, что эффективность биокатализа заметно снижается при использовании высокой загрузки спейсера оптимального размера. Из-за наличия очень большого количества полимерных молекул спейсера, на поверхности носителя создается слой, обеспечивающий возможность многоточечного связывания спейсера с ферментом, вследствие чего активный центр иммобилизованного белка может оказаться заблокированным.

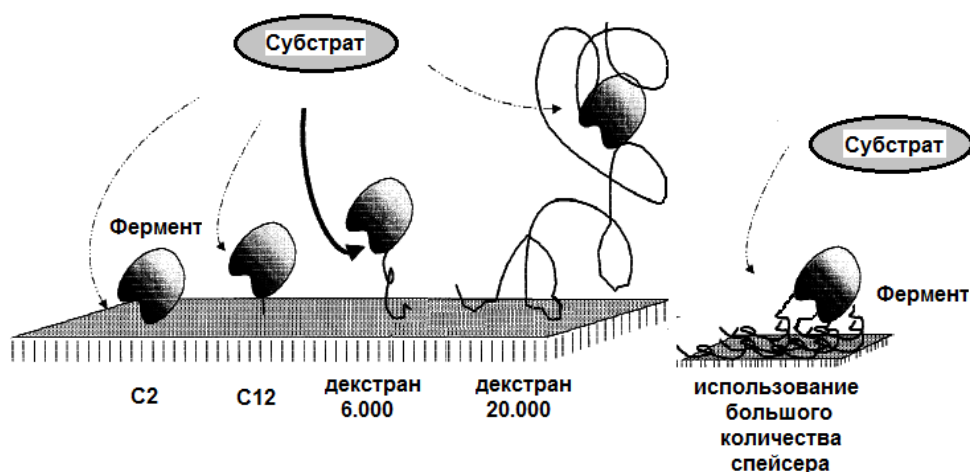


Рисунок 12 – Схема, иллюстрирующая расположение фермента на поверхности, при иммобилизации через спейсеры различной длины. Рисунок адаптирован из [40].

#### 1.2.4. Носители для иммобилизации ферментов

В процессе развития технологии иммобилизованных ферментов было предложено большое количество носителей различной природы. Было показано, что характеристики носителя оказывают сильное влияние на эффективность гетерогенного биокатализа. Идеальная матрица должна обладать высокой химической и биологической устойчивостью, достаточной проницаемостью для фермента и субстратов (при создании проточных форм), возможностью получения в виде удобных в технологическом отношении форм, должна быть достаточно гидрофильной, иметь невысокую стоимость, а также обеспечивать возможность получения стабильной связи между ферментом и поверхностью носителя [21].

В настоящее время на мировом рынке представлен широкий спектр носителей, пригодных для иммобилизации биомолекул. Среди них можно выделить природные и синтетические полимеры, а также неорганические носители [23].

Из числа природных полимерных носителей наибольшей популярностью пользуются полисахариды, например, агароза, целлюлоза, декстран, и их производные, а также хитозан и агар [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47], [48]. Большое значение полисахаридов в качестве носителей для иммобилизации ферментов объясняется их доступностью, наличием реакционноспособных функциональных групп, высокой гидрофильностью, обеспечивающей желаемое микроокружение для многих ферментов. Основными недостатками являются неустойчивость к воздействию микроорганизмов и довольно высокая стоимость.

Этого недостатка лишены синтетические органические полимерные матрицы. Условно по химическому строению основной цепи макромолекул их можно разделить на несколько групп: полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные. В литературе описаны примеры использования в качестве носителей материалов на основе широкого спектра сополимеров, например, полистирола, полиакрилатов, полиметакрилатов, полиамидов, полиолефинов, сополимеров на основе малеинового ангидрида и этилена или стирола, полиальдегидов, полипептидов и т.д. [49], [50].

Синтетические носители могут быть адаптированы к требованиям практически любого процесса иммобилизации. Реакционные группы могут быть как введены в процессе полимеризации путем отбора подходящих мономеров, так и получены посредством полимераналогичных превращений функциональных групп полимера. Таким образом, синтетические полимерные носители могут применяться как для ковалентной, так и для физической иммобилизации ферментов [21].

В качестве неорганических носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также металлы и оксиды металлов [51], [52], [53]. Неорганические носители часто демонстрируют хорошие механические свойства, термостойкость и устойчивость к воздействию микробов и органических растворителей. Существенным недостатком многих неорганических носителей является отсутствие или присутствие неактивных функциональных групп. Как следствие, иммобилизация ферментов на поверхности таких материалов может ограничиваться либо только физической адсорбцией, либо требует дополнительных стадий активации. Недостатком использования силикагелей, как носителей для иммобилизации ферментов, является их нестабильность в щелочных средах, что ограничивает их применение для работы с ферментами, имеющими рН оптимумы в этой области.

В зависимости от целей создания гетерогенных биокатализаторов носители могут быть пористые или непористые [54], планарные или трехмерные [55], [56], проточные или непроточные [55], [35], полимерные сильно-сшитые или слабо-сшитые (как следствие, жесткие или гелевого типа) [57], [58].

Одной из традиционных форм гетерогенных биокатализаторов являются проточные системы, полученные путем упаковки в колонку частиц носителя, несущего иммобилизованный фермент. Мелкочастичные стационарные фазы существуют в виде набухающих пористых [59], [57], непористых [60], [61], микропелликулярных [62], [63], перфузионных и макропористых [64], [65] и гигапористых структур [66].

В случае набухающих пористых частиц пористость достигается за счет помещения в термодинамически хороший растворитель, а поры обеспечиваются полимерной сеткой слабо-сшитого сополимера. Внутренняя структура таких частиц, как правило, содержит тупиковые поры, в результате чего жидкость внутри них застаивается, и молекулы вещества могут проникнуть в них и обратно только посредством диффузии. В таких системах массоперенос вещества контролируется скоростью его проникновения в поры частиц стационарной фазы [67]. Внутри пор имеют место существенные диффузионные ограничения нормальному массопереносу вещества между жидкой и твердой фазами. Таким образом, количество преобразованного субстрата в продукт зависит в основном от молекулярной диффузии, размеров пор и частиц, а также от скорости потока субстрата. В связи с этим для колонок, упакованных частицами сорбента, возможность использования высоких скоростей потока подвижной фазы существенно ограничена. Во-первых, это связано с тем, что при увеличении данного параметра большая часть раствора субстрата протекает в межчастичном пространстве, что неизбежно приводит к ухудшению эффективности биокатализа. Во-вторых, увеличение скорости потока часто приводит к сжатию слоя сорбента, и, как следствие, увеличению давления в системе. В результате, такие системы проявили себя как достаточно медленные и неэффективные [68].

В случае использования непористых частиц из-за полного отсутствия пор взаимодействия между субстратом и локализованным ферментом происходят только на поверхности частиц. В результате чего совершается очень быстрый обмен молекулами между жидкостью и твердой поверхностью [69]. Чтобы преодолеть проблему низкой удельной площади поверхности и достичь высокой эффективности, такие частицы, как правило, очень малы, их диаметр колеблется в пределах 1.5-3.0 мкм [70].

Схожи с непористыми так называемые микропелликулярные носители, которые представляют собой непористые частицы, поверхность которых покрыта тонким слоем пористого материала, служащего для увеличения площади поверхности. Таким образом, данные струк-

туры не имеют внутренних пор, ограничивающих скорость проникновения субстрата к иммобилизованным биомолекулам, при этом их иммобилизационная емкость существенно выше по сравнению с непористыми частицами.

Перфузионные и макропористые частицы в отличие от обычных пористых содержат сеть больших взаимосвязанных пор, способных к реализации конвективного потока, в результате чего значительно облегчается внутричастичный транспорт вещества потоком подвижной фазы [71].

Гигапористые частицы были разработаны для увеличения емкости стационарных фаз типа перфузионных частиц, так как при увеличении размера пор, она существенно падала. Такие частицы состоят из жесткого скелета, содержащего поры большого размера, заполненные мягким гелем, сквозь которые молекулы транспортируются конвективным потоком подвижной фазы [72]. В этом случае иммобилизационная емкость носителя значительно увеличивалась, однако внутричастичный транспорт немного осложнялся по сравнению с перфузионными частицами в связи с присутствием внутри пор гелевой массы.

Помимо диффузионных ограничений нормальному массопереносу при использовании упакованных частицами колонок существует еще один недостаток. Так как объем колонки заполнен не полностью частицами стационарной фазы, часть потока подвижной фазы, содержащей субстрат, протекает в межчастичном пространстве, не достигая молекул иммобилизованного фермента. Это приводит к уменьшению эффективности массообмена.

В конце 80-х - начале 90-х годов прошлого века был разработан новый класс полимерных материалов, а именно *макропористые материалы монолитного типа*. В отличие от упакованных колонок стационарные фазы нового поколения на основе макропористых полимерных сорбентов монолитного типа представляют собой единый (монолитный) гомогенный слой материала, пронизанный системой взаимосвязанных проточных пор. Благодаря этому, одним из основных преимуществ макропористых монолитных колонок является их высокая проницаемость и, как следствие, доминирование конвективного механизма массопереноса над диффузионным (Рисунок 13). Кроме того, данные стационарные фазы характеризуются низкими значениями рабочего давления в системе, что позволяет проводить динамические процессы при высоких скоростях подвижной фазы. Среди прочих достоинств макропористых монолитов следует отметить высокую механическую и химическую устойчивость, возможность вариации реакционных групп поверхности и, что немаловажно, простоту синтеза. Данные материалы можно получать практически любой формы и размеров, что актуально для использования, как в аналитических лабораториях, так и в промышленных процессах.





Рисунок 13 – Схема, иллюстрирующая движение вещества в упакованных частицами колонках (А) и в монолитных матрицах (Б).

### 1.3. Монолитные макропористые материалы как носители для иммобилизации ферментов и стационарные фазы для ВЭЖХ

Как правило, монолитные макропористые материалы характеризуются не однородной, а так называемой «мультипористой» структурой, образующейся в процессе свободно-радикальной сополимеризации мономеров. Электронные микрофотографии получаемых монолитов показывают, что они состоят из сшитых друг с другом микроглобул, состоящих из множества мелких полимерных ядер. Расстояния между непористыми ядрами, составляющие менее 2 нм, классифицируются как *микропоры*. Агломераты ядер образуют микроглобулы, расстояния между которыми составляют 20-50 нм и рассматриваются как *мезопоры*. Кроме того, при синтезе монолитов вокруг пространства, занимаемого порогеном, формируются кластеры микроглобул, образующие *макропоры* размером более 50 нм.

Первые описанные в литературе полимерные материалы монолитного типа были получены на основе акриламида [73], метакрилатов [74] и стирола [75]. Первоначально, макропористые монолитные материалы разрабатывались как стационарные фазы для адсорбционных видов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) биологических макромолекул, в частности белков и ДНК, в которой они показали свою высокую эффективность [76], [77], [74]. Позже было установлено, что данный тип сорбентов оказался эффективным также и в случае адсорбционной хроматографии низкомолекулярных соединений [78], синтетических полимеров [79] и получения проточных гетерогенных биокатализаторов [80], [81].

Первыми монолитными сорбентами, предназначенными для использования в качестве хроматографических стационарных фаз, в ряду полиметакрилатных монолитов выступили мембраны (диски) на основе сополимера глицидилметакрилата с этиленгликольдиметакри-

латом. На сегодняшний день данный сополимер является одним из наиболее изученных и широкоиспользуемых вариантов макропористых монолитных сорбентов и выпускается под коммерческим названием CIM Disk компанией BIA Separation d.o.o. (Айдовщина, Словения).

### 1.3.1. Синтез макропористых монолитных материалов

Макропористые полимерные материалы монолитного типа получают методом свободнорадикальной полимеризации *in situ* непосредственно внутри пустой колонки или другой формы требуемого размера и дизайна, плотной закрытой с двух сторон. В данном случае, помимо мономеров и инициатора полимеризационная смесь также обязательно содержит поробразующие агенты, или *порогены*, представляющие собой термодинамически несовместимые растворители с полимером, образующимся в ходе полимеризации.

Механизм образования макропористой структуры может быть описан следующим образом. До начала процесса полимеризации полимеризационная смесь представляет собой гомогенную систему. В результате распада инициатора на свободные радикалы при достижении необходимой температуры или под действием УФ- или  $\gamma$ -излучения запускается процесс полимеризации.

На начальной стадии происходит образование олигомеров, из которых по мере протекания реакции формируются гелеподобные ядра. Процесс образования гелеподобных ядер сопровождается разделением фаз, которое может протекать в форме *макросинерезиса* или *микросинерезиса* [82].

В первом случае гелевые микророзродыши образуются вследствие коллапса растущих полимерных цепей в критической точке разделения фаз. При этом растворитель сохраняет состояние непрерывной фазы, окружающей ядра-зародыши. По мере протекания процессов полимеризации и сшивания происходит агломерация полимерных ядер и формирование *микрорглобул*. Дальнейшее течение полимеризации приводит к взаимодействию микрорглобул и их сшиванию в кластеры. В свою очередь, контакт кластеров друг с другом приводит к формированию системы, состоящей из двух непрерывных фаз: полимерного каркаса и растворителя, удаление которого сопровождается образованием пор различного размера.

Согласно модели микросинерезиса, в реакционной системе в результате разделения фаз формируется дисперсия, то есть в процессе формирования геля жидкая фаза распределяется в виде маленьких капель внутри геля. В этом случае, объем геля меняется незначительно после разделения фаз, и дальнейшее протекание процессов полимеризации и сшивания просто фиксирует двухфазовую структуру в конечный материал.

Возможность разделения фаз в виде макро- или микросинерезиса определяется, главным образом, количеством сшивающего агента в реакционной смеси. Было показано, что при

низком содержании сшивающего агента разделение фаз протекает в форме микросинерезиса. Причина в том, что при низких концентрациях сшивающего агента длинные цепи сетки медленно релаксируют из состояния набухания в состояние коллапса, в результате чего состояние набухания может фиксироваться дополнительными сшивками, а молекулы растворителя распределяются внутри геля в виде капель. В случае высоких концентраций сшивающего агента капли растворителя, образовавшиеся в результате начавшегося разделения фаз, объединяются друг с другом в непрерывную жидкую фазу, в то время как полимерные цепи быстро притягиваются друг к другу, формируя глобулы.

Условия полимеризации в блоке при синтезе макропористых материалов монолитного типа значительно отличаются от процесса создания макропористых частиц. Во-первых, процесс протекает в одной, органической фазе, вследствие чего отсутствует межфазовое поверхностное натяжение, имеющее место в суспензионной полимеризации. Вторым отличием является отсутствие динамической силы перемешивания при получении монолитных материалов. Отсутствие поверхностного натяжения и перемешивания приводят к некоторым изменениям в механизме формирования поровой структуры при синтезе полимерных монолитов. Так, например, полимеризация продолжается как в растворе над растущими кластерами, так и в порах уже образовавшегося материала, в результате чего уменьшается объем пор, а также величина площади поверхности монолитов за счет потери ядрами индивидуальности.

Оптимальная морфология поровой структуры полимерного материала, представляющего собой единый пористый блок, формируется в процессе синтеза и сохраняется в сухом состоянии. Преимуществами монолитных стационарных фаз является возможность направленного формирования поровой структуры в широком диапазоне размеров пор от 0.1 до 10 мкм. Пористость монолитных фаз достигает 60-80%, то есть полимерный материал занимает не более 40-20% объема сорбента, тогда как на практике гранулированные сорбенты занимают не более 60% объема колонки.

### **1.3.2. Влияние параметров синтеза на поровую структуру монолитов**

Формирование поровой структуры полимера можно регулировать, варьируя состав и соотношение смеси порогенов, соотношение между мономерами и порогенами, а также время процесса полимеризации и скорость распада инициатора (температура, интенсивность облучения).

- Мономеры.

Используемые в синтезе макропористых полимерных монолитов мономеры подразделяются на функциональные мономеры и сшивающие агенты, в качестве которых обычно выступают ди- и тривиниловые соединения. В случае полиметакрилатных монолитов наиболее

популярным сшивающим агентом является этиленгликольдиметакрилат (ЭДМА). В качестве более гидрофильной альтернативы ЭДМА могут быть использованы диэтиленгликольдиметакрилат (ДЭГДМА), триэтиленгликольдиметакрилат (ТЭГДМА), полиэтиленгликольдиметакрилат (ПЭГДМА), триметилпропантриметакрилат (ТРИМ) и глицеролдиметакрилат (ГДМА) [83], [84]. Иногда для получения макропористых монолитных носителей используют смесь сшивающих агентов, например, при получении тройного сополимера ГМА-ТЭГДМА-ТРИМ [85].

Спектр соединений, используемых в качестве функциональных мономеров, весьма широк и включает в себя бутилметакрилат (БМА), октилметакрилат (ОМА), додецилметакрилат (ДМА), метакриловую кислоту (МК), N-сукцинимидный эфир метакриловой и акриловой кислоты, 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА), 2-цианоэтилметакрилат (ЦЭМА), 2-аминоэтилметакрилат (АЭМА), 3-гидроксипропилметакрилат (ГПМА), этилметакрилат (ЭМА), сульфэтилметакрилат (СЭМА) и др., что позволяет получать полимеры с различными физико-химическими свойствами и химическим составом [86]. Одним из наиболее популярных функциональных мономеров является глицидилметакрилат. Причиной этого факта, вероятно, является наличие в его структуре реакционноспособной эпоксидной группы, которая позволяет осуществлять одностадийную модификацию поверхности носителя аминоксодержащими лигандами, а также проводить широкий спектр реакций для получения материалов, обладающих требуемой функциональностью.

Природа сшивающего агента и его количественное соотношение с реакционноспособным мономером определяет химическое строение и гидрофобно-гидрофильные свойства образующегося продукта. При увеличении содержания сшивающего агента в составе смеси мономеров на ранних стадиях процесса полимеризации образуется более сшитый полимер, структура которого представляет собой микроглобулы очень маленького размера с минимальными межчастичными зазорами. Как правило, следствием этого является раннее разделение фаз.

При исследовании влияния количества сшивающего агента на поровую структуру сополимера ГМА-ЭДМА было установлено, что его оптимальное количество в полимеризационной смеси составляет 40–60% [74]. Использование количеств ЭДМА в указанном диапазоне позволяло получать материалы содержащие, с одной стороны, большие транспортные поры, а с другой, имеющие достаточно большую удельную площадь поверхности. Использование сшивающего агента в количестве более 60%, как правило, приводит к более плотной упаковке микроглобул в кластеры и исчезновению мезопор, а, следовательно, сокращению удельной площади поверхности. Уменьшение количества сшивающего агента ниже 30%

приводит к получению набухающего материала с низкими механическими характеристиками.

- Порообразующие агенты.

Необходимым условием формирования поровой структуры является присутствие в полимеризационной смеси инертного растворителя, выполняющего функцию порообразующего агента (порогена). Основными критериями применения тех или иных веществ в качестве пороменов являются их термодинамическая несовместимость с образующимся полимером и, в случае использования термоиницирования, высокая температура кипения.

Для описания сольватирующей способности растворителя в процессе формирования полимерной сетки обычно используют разность между параметрами растворимости растворителя ( $\delta_1$ ) и полимера ( $\delta_2$ ), то есть  $(\delta_1 - \delta_2)$ , или квадрат этой разницы. Согласно теории Гильдебранда, чем меньше значение квадрата разности, тем лучше растворяется полимер в данном растворителе, т.е. тем меньшими порами будет обладать конечный полимерный материал. Например, при получении монолитных материалов на основе сополимера ГМА с ЭДМА часто применяют пороженные смеси спиртов циклогексанола и додеканола [87]. Было показано, что более высокое содержание додеканола приводит к получению материалов с большими порами. Поскольку данный порожен является несольватирующим растворителем для сополимера ГМА-ЭДМА, увеличение его содержания в полимеризационной смеси приводит к увеличению сольватирующей способности мономеров, что выражается в образовании более крупных агломератов и кластеров и, соответственно, пор большего размера.

В качестве пороменов для получения макропористых полиметакрилатных монолитов используются низкомолекулярные соединения (алифатические спирты, толуол, углеводороды и др.) [88], [87], линейные олигомеры и растворы полимеров (полиэтиленгликоли, полистиролы, полидиметилсилоксаны) [85], [89], а также суперкритические жидкости (сжатый углекислый газ и 1,1,1,2-тетрафторэтан) [90], [91].

- Температура.

При термоиницируемых процессах температура оказывает существенное влияние на кинетику процесса, что отражается на морфологии поверхности и характеристиках получаемых монолитных материалов. При повышении температуры скорость распада инициатора возрастает, что способствует росту количества свободных радикалов, что, как правило, приводит к увеличению числа образующихся полимерных ядер, но уменьшению их размеров. При более низкой температуре в реакционной смеси присутствует меньшее количество полимерных ядер большего размера, получаемых за счет проникновения в них большего количества мономеров [92]. Скорость образования полимерного материала ниже, но при этом образующийся материал имеет однородную структуру поверхности. В то же время, при увели-

чении скорости полимеризации возрастает вероятность появления микроглобул разного размера и, как следствие, формирования неоднородной структуры. Кроме того, повышение температуры приводит к увеличению сольватирующей способности порообразующих веществ, и, как следствие, уменьшению размера пор и увеличению площади поверхности. Таким образом, увеличение температуры приводит к образованию сильносшитых сополимеров с порами меньшего размера.

- Время полимеризации.

Важным фактором, также влияющим на формирование поровой структуры синтезируемого материала, является время реакции. Было установлено существование оптимального времени, необходимого для получения максимального выхода полимерного продукта. При этом следует учитывать, что время полимеризации сильно зависит от температуры проведения процесса. Как правило, чем выше температура, тем меньшее время необходимо для получения требуемого продукта. В случае макропористых монолитов, получаемых методом термоинициируемой полимеризации, оно составляет 8-12 часов при температуре 65°C. При дальнейшем протекании реакции обычно наблюдается уменьшение удельной площади поверхности синтезируемых сорбентов за счет более плотной сшивки микроглобул и уменьшения доли мезопор.

Например, в работе [93] для монолитных колонок на основе сополимера *n*-метилстирола и 1,2-бис(*n*-винилфенил)этана время синтеза варьировали от 45 мин до 24 часов при температуре полимеризации 65°C. Было показано, что конверсия исследованного мономера через 45 мин реакции составляет 39%, а после 12 и 24 часов – 98 и 99%, соответственно. При этом, наблюдалось уменьшение удельной площади поверхности монолитных материалов от 75 до 23 м<sup>2</sup>·г<sup>-1</sup>.

### 1.3.3. Методы исследования поровой структуры макропористых монолитов

Наиболее распространенным методом оценки качества поверхности и однородности поровой структуры макропористых полимерных материалов является метод сканирующей (или растровой) электронной микроскопии (СЭМ) [94]. Сущность метода состоит в том, что поверхность образца облучается сфокусированным пучком электронов. Пучок электронов совершает возвратно-поступательное движение по линии или разворачивается в растр, то есть совокупность близко расположенных параллельных линий, вдоль которых пучок обегает исследуемый участок поверхности. Это вызывает эмиссию вторичных электронов, которые собираются электронными оптическими линзами. Однако, применение данного метода возможно при условии, что исследуемый образец является термоустойчивым и проводящим. Монолитные макропористые материалы этим требованиям не удовлетворяют. Проблема от-

сутствия проводящих свойств решается путем покрытия поверхности материала металлом, как правило, в этих целях используют золото или платину. Но довольно низкая термическая стабильность макропористых монолитов ограничивает возможность использования высокого напряжения, необходимого для получения высококачественного изображения.

Вторым методом, позволяющим получить изображение поверхности монолитных носителей, является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [95]. Использование АСМ дает возможность исследовать материалы как в сухом, так и во влажном состоянии, тем самым, предоставляя информацию о структуре образцов в условиях их применения. Суть метода заключается в том, что пучок электронов, взаимодействуя с поверхностью, рассеивается на ней и регистрирует её структуру. Метод АСМ основан на сканировании образца в горизонтальной плоскости с использованием иглы с радиусом кривизны острия порядка десятков-сотен нанометров, укрепленной на консоли, колеблющейся с известной жесткостью. При сканировании измеряется отклонение (сдвиг резонансной частоты колебаний) консоли под действием сил между иглой и поверхностью. Таким образом, АСМ обеспечивает топографическую съемку поверхности и, кроме того, позволяет качественно оценить размер пор.

Количественное представление о среднем размере пор и распределении пор по размерам в макропористых монолитных материалах получают методом интрузионной ртутной порометрии (ИРП), заключающемся в измерении давления, необходимого для проникновения несмачивающей жидкости, в качестве которой используют ртуть, в поры сорбента [96].

Расчет размера пор осуществляется из соотношения:

$$P = -4 \sigma \cos\theta / d, \quad (18)$$

где  $\sigma$  – поверхностное натяжение ртути на границе с поверхностью сорбента,  $\theta$  – угол смачивания полимерного монолита ртутью.

Для каждого определенного образца  $\sigma$  и  $\theta$  являются постоянными величинами, поэтому приложение фиксированного давления позволяет рассчитать диаметр заполняемых пор. Ртуть может проникнуть в поры материала лишь при воздействии внешнего давления, так что, объем жидкости, заполняющей поры, является функцией внешнего давления, что позволяет получить информацию о распределении пор по размерам. Более того, этот метод позволяет рассчитать как полный объем пор, так и объем, соответствующий порам определенного размера. Однако, несмотря на то, что метод ИРП считается применимым для измерения размера пор в диапазоне от 20 до 15000 нм, его точность в отношении размеров микропор и мезопор невелика, поскольку высокое давление, необходимое для заполнения таких пор ртутью, с большей вероятностью может вызвать деформацию полимера, чем интрузию ртути.

Для определения средних размеров микро- и мезопор целесообразно использовать альтернативные методы, такие как метод Брунауэра-Эмметта-Теллера (БЭТ), основанный на

адсорбции азота [97]. Согласно теории БЭТ, при температуре ниже критической каждая молекула, адсорбированная в первом слое с теплотой адсорбции  $Q$ , является центром адсорбции для молекул, образующих второй слой; далее таким же образом возникает третий слой и т.д. При этом считается, что теплота адсорбции во всех случаях кроме первого, равна теплоте конденсации ( $\lambda$ ). В равновесии скорость адсорбции (конденсации) на первом (свободном) слое равна скорости десорбции (испарения) с первого монослоя. Аналогичным образом скорость адсорбции или конденсации на первом слое приравнивается к скорости испарения со второго слоя и т.д. Такая модель приводит к уравнению БЭТ:

$$\frac{P/P_0}{a(1 - P/P_0)} = \frac{1}{a_m \cdot C} + \frac{C-1}{a_m \cdot C} \frac{P}{P_0} \quad (19)$$

где  $P$  – давление паров газа-адсорбата,  $P_0$  – давление насыщенного пара газа-адсорбата,  $a_m$  – ёмкость монослоя адсорбированных молекул,  $C$  – энергетическая константа. Это уравнение и положено в основу определения удельной поверхности дисперсных и пористых материалов методом БЭТ.

Суть метода БЭТ для определения характеристик макропористых материалов заключается в том, что на тщательно очищенной поверхности адсорбируют азот таким образом, чтобы молекулы газа образовывали на доступной для них поверхности монослой. Зная количество газа, адсорбированного на единице массы исследуемого материала, а также размеры молекул газа, можно рассчитать удельную поверхность по уравнению БЭТ.

Характеристики монолитных макропористых колонок, а именно, проницаемость, пористость и средний диаметр пор, можно оценивать из данных по гидродинамической проницаемости. Согласно теории, где монолитная матрица рассматривается как система проточных капилляров, проницаемость ( $B$ ) для монолитов может вычисляться по следующей формуле, выведенной из закона Пуазеля-Дарси [98]:

$$B = \eta FL / (\pi r^2 \Delta P), \quad (20)$$

где  $F$  – скорость потока подвижной фазы через монолит ( $\text{м}^3 \cdot \text{с}^{-1}$ );  $\eta$  – вязкость подвижной фазы (Па·с);  $L$  – эффективная длина монолита (м);  $r$  – внутренний радиус монолита (м),  $\Delta P$  – изменение давления (Па).

Проницаемость монолита с каналами диаметром  $d$  также может быть оценена с помощью уравнения [98]:

$$B = \varepsilon d^2 / 32, \quad (21)$$

где  $\varepsilon$  – пористость сорбента, определяемая как отношение объема элюирования неудерживаемого компонента к объему монолита:

$$\varepsilon = (V_e - V_c) / V_m, \quad (22)$$



где  $V_e$  – это объем элюирования неудерживаемого компонента с колонки ( $\text{м}^3$ );  $V_c$  – объем элюирования неудерживаемого компонента без колонки, то есть объем системы, ( $\text{м}^3$ );  $V_m$  – объем монолита ( $\text{м}^3$ ).

Из выше приведенных уравнений следует, что средний размер пор можно рассчитать следующим образом:

$$d = (32 \eta FL / (\varepsilon SAP))^{1/2}. \quad (23)$$

### 1.3.4. Применение макропористых монолитных материалов

Как упоминалось ранее, данный вид материалов был разработан для применения в качестве твердых фаз при реализации хроматографических процессов. Многочисленными опубликованными работами было доказано, что полимерные монолитные колонки на основе ГМА-ЭДМА сополимера с привитыми функциональными группами обеспечивали высокую селективность разделения в сочетании с коротким временем сепарационного процесса и низкими рабочими давлениями [87].

В монолитных хроматографических колонках подвижная фаза полностью протекает сквозь монолитный слой сорбента, а акты адсорбции-десорбции имеют место на открытых стенках проточных каналов, вследствие чего все характерные диффузионные процессы, осложняющие сепарацию, здесь практически отсутствуют. Вследствие реализации быстрого и эффективного межфазового переноса вещества использование данных стационарных фаз позволяет достичь эффективного хроматографического разделения смеси аналитов в условиях высоких скоростей подвижной фазы в течение нескольких минут [87].

Монолитные хроматографические колонки существуют в различных формах, таких как диски, колонки различной длины и диаметра, капиллярные колонки и трубки [99], [100], [101]. В последнем случае используется радиальный поток подвижной фазы, при котором жидкость протекает от внешних стенок трубки к внутренним и вытекает в центральную полую часть. Монолиты в форме трубок применяют для реализации полупрепаративных и препаративных процессов.

Известно, что эффективность хроматографической колонки сильно зависит от линейной скорости потока. Для большинства упакованных колонок эффективность колонки линейно падает с увеличением потока. В случае использования макропористых монолитных стационарных фаз как колоночного, так и радиального формата, было показано, что эффективность хроматографической колонки и ее адсорбционные свойства не зависели от скорости потока подвижной фазы [101], [102]. Одним из объяснений данного факта может быть то, что некоторые небольшие по размеру поры, в которых жидкость застаивается при использо-

вании низких скоростей потока, становятся доступными при использовании высоких скоростей.

Спектр использования макропористых монолитных носителей весьма широк и включает практически все виды ВЭЖХ, а именно ионообменную, гидрофобную, нормально- и обращеннофазовую, а также различные виды аффинной хроматографии. В литературе широко представлены работы, описывающие успешное применение макропористых монолитных матриц для сепарации и выделения белков [103], [104], олиго- и полинуклеотидов (РНК, ДНК) [105], [106], различных синтетических полимеров [107] и низкомолекулярных веществ [78], [108].

Одной из разновидностей ВЭЖХ с использованием монолитов является так называемая *высокоэффективная монолитная дисковая хроматография* (ВЭМДХ), которая подразумевает использование в качестве стационарной фазы тонких 2-3 мм высотой макропористых полимерных слоев [109]. Ранее считалось, что очень тонкий слой сорбента с большими транспортными каналами не должен обеспечивать эффективное разделение молекул, особенно высокомолекулярных соединений, имеющих малую диффузионную подвижность. Однако развитие данного направления хроматографии показало высокую эффективность тонких слоев в разделении, прежде всего, биологических макромолекул [74], [110], [111], [112]. Этот факт может объясняться тем, что наложение сквозного внутрислоевого потока жидкости приводит к изменению диффузионного механизма массопереноса на конвективный. При этом, вследствие резкого увеличения проницаемости сорбента, существенно возрастает диффузионная подвижность разделяемых молекул, что, соответственно, приводит к уменьшению времени, необходимого для достижения целевой молекулой локализованного на поверхности адсорбционного центра, и увеличению числа возможных контактов вещества с функциональной поверхностью [113]. Таким образом, разделение может осуществляться с достаточной эффективностью даже при очень малых длинах слоя сорбента, при этом адсорбционный процесс разделения методом ВЭМДХ будет являться одноактным процессом, и параметры разделения не будут усредняться в процессе движения вещества вдоль адсорбционного слоя.

Благодаря высокой эффективности процессов, основанных на использовании монолитных матриц, на сегодняшний день можно говорить о существовании не только полиметакрилатных монолитов, но также и полистирольных [114], силикатных [115], гибридных органо-неорганических [116], полиакриламидных [117] и на основе биополимеров (агарозы и целлюлозы) [118], предлагаемых на международном рынке такими фирмами, как Sepragen (Канада), Merck (Германия), Conchrom (Германия), BioRad (США), ISCO (США) и LC Packings (США).

Положительные свойства макропористых монолитных сорбентов оказались полезными не только в области высокоэффективной жидкостной хроматографии, но также и при реализации других процессов, основанных на переносе вещества в динамических условиях, а именно в электрохроматографии [117], [119], газовой хроматографии [120], [121], твердофазной экстракции [122], [123], планарной хроматографии [124], а также в твердофазном органическом синтезе [125]. Более того, оказалось, что макропористые материалы монолитного типа на основе полиметакрилатных сополимеров представляют собой класс носителей, свойства которых удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к твердым фазам, предназначенным для создания проточных гетерогенных биокатализаторов [126].

Исторически первый гетерогенный биокатализатор на основе углеродной ангидразы, иммобилизованной на поверхности дисков на основе ГМА-ЭДМА сополимера, был получен в 1991 году [127]. Позже на примере трипсина, ковалентно иммобилизованного на поверхности монолитных и упакованных колонок на основе ГМА-ЭДМА сополимера, была показана высокая эффективность применения монолитных матриц [128]. К настоящему моменту различными научными группами были исследованы возможности проведения иммобилизации ферментов на поверхности монолитных материалов различной природы (полимерные, неорганические, органо-неорганические) при использовании большого числа подходов и методик.

Среди опубликованных работ, посвященных созданию гетерогенных биокатализаторов на основе монолитов, доминирующая часть посвящена иммобилизации протеаз и изучению возможности их эффективного применения в протеомике. Наиболее часто используемыми ферментами являются трипсин [129], [130], химотрипсин [131], папаин [132], инвертаза [133], пепсин [134] и др. Помимо этого, описаны примеры использования гетерогенных монолитных биокатализаторов на основе ацетилхолинэстеразы [135], [136] и секретазы [137] для исследования механизмов их ингибирования. Также часть работ посвящена процессам органического синтеза и получения биодизеля с использованием гетерогенных биокатализаторов на основе липаз из различных источников, иммобилизованных на поверхности монолитных матриц [138], [139], [140].

#### **1.4.Хроматографические реакторы: комбинирование биокатализа и сепарации**

В последнее время создание методических тандемов, совмещающих химический и аналитический процессы, вызывает огромный интерес широкого круга исследователей. Объединение химических реакций в один процесс с хроматографическими методами анализа и разделения продуктов позволяет достигать одного из нижеперечисленных положитель-

ных результатов: (1) проводить мониторинг образования продуктов реакции в *on-line* режиме, (2) исключить дополнительные манипуляции по очистке и выделению продуктов и (3) в случае обратимых реакций обеспечить удаление образующегося продукта из реакционной среды для увеличения конверсии целевого продукта (за счет сдвига химического равновесия). Таким образом, объединение хроматографического и химического процессов способствует сокращению времени и упрощению процесса в целом.

Идея первого хроматографического реактора была впервые представлена в начале 1960-х годов одновременно несколькими исследователями [141]. В частности, Лангер и Паттон описывали хроматографический реактор как хроматографическую колонку, в которой вещество или несколько веществ, растворенных в подвижной фазе, преобразуются, частично или полностью, в продукты во время их протекания сквозь колонку, при этом в колонке также происходит разделение образующихся продуктов [142]. Таким образом, полученное устройство представляет собой одновременно как реактор, так и хроматографическую стационарную фазу для анализа получаемых продуктов. Схематически подобный хроматографический реактор представлен на Рисунке 14.

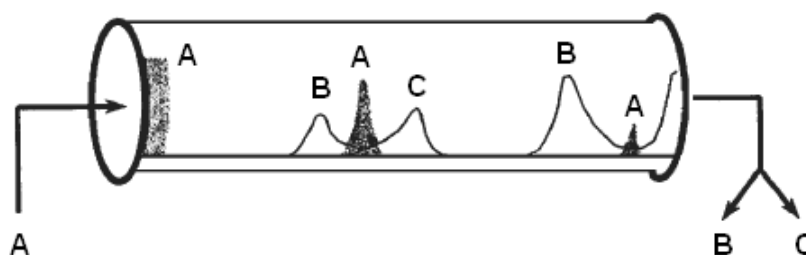


Рисунок 14 – Схема, иллюстрирующая принцип работы хроматографического реактора [143].

В таком устройстве, происходит химическая конверсия соединения *A* в продукты *B* и *C*. Компонент *A* подается в колонку в виде импульса. Во время прохождения через колонку, соединение *A* превращаются в продукты *B* и *C*, и количество компонента *A* снижается. Из-за их разного времени удерживания, продукты *B* и *C* одновременно отделяются друг от друга и от компонента *A*. В связи с удалением продуктов из реакционной зоны, химическое равновесие никогда не достигается, и реакция продолжается до полного преобразования соединения *A* в продукты. Продукты покидают хроматографический реактор уже разделенными и, таким образом, дальнейшие стадии очистки не требуются.

Подобные хроматографические реакторы могут быть реализованы в различных конфигурациях. Основными типами являются так называемый «fixed-bed» хроматографический реактор с неподвижной стационарной фазой, сплошной кольцеобразный хроматографический реактор, хроматографический реактор с обратным движением стационарной фазы и

хроматографический реактор с модельным движением стационарной фазы. Хроматографические реакторы с неподвижной стационарной фазой состоят, как правило, из одной колонки, содержащей твердую фазу, на которой протекает как химическая реакция, так и адсорбция. Обычно подача реакционной смеси в реактор осуществляется одновременно, и в процессе протекания сквозь реактор происходит одновременная конверсия веществ и сепарация (Рисунок 14) [144], [145]. Такой реактор был использован, например, для реализации обратимой реакции этерификации уксусной кислоты в этилацетат. Наблюдалось улучшение конверсии вещества благодаря разделению продуктов в реакционной зоне. При этом разделение может быть реализовано посредством различия в коэффициентах распределения соединений или посредством селективной адсорбции на носителе. Так как в первом случае вещества проходят сквозь реактор с различными скоростями, длительная подача реагентов может стать причиной повторного смешивания разделенных соединений. Во втором случае необходимым дополнительным этапом является регенерация сорбента после определенного периода эксплуатации реактора. В результате, реакторы данного вида могут использоваться только для реализации достаточно непродолжительных химических процессов [146].

В сплошных кольцеобразных хроматографических реакторах стационарная фаза представлена в форме кольца, которое медленно вращается вокруг своей оси. Постоянный поток подвижной фазы с реагентами входит в хроматографический реактор и далее распространяется равномерно сверху по кольцу. При этом имеет место химическая реакция и сепарация получаемых продуктов. Вследствие вращения стационарной фазы компоненты элюируются под разными углами в соответствии с силой их взаимодействия с матрицей [147], [148]. Схема процесса представлена на Рисунке 15.

В данных хроматографических реакторах для получения оптимальной степени превращения скорость реакции должна быть достаточно быстрой, чтобы химическая реакция осуществлялась в основном в верхней части стационарной фазы, в то время как нижняя часть используется в качестве сепаратора. Для реализации таких систем наиболее подходят реакции, в которых один реагент дает два или более продукта реакции, которые при этом значительно различаются по адсорбционным свойствам.

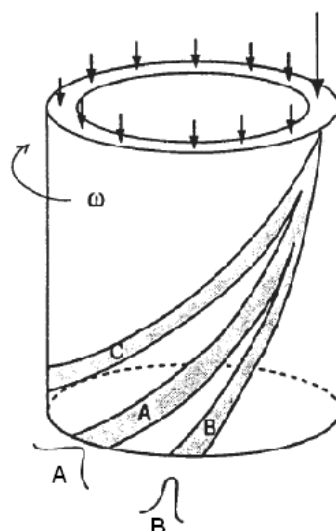


Рисунок 15 – Схема, иллюстрирующая принцип работы сплошного кольцеобразного хроматографического реактора [147].

В случае хроматографического реактора с обратным движением стационарной фазы твердая матрица также не является статичной, а проходит в противоположную сторону текущей жидкости. На практике это реализуется посредством того, что стационарная фаза перемещается вниз под действием силы тяжести, в то время как жидкая фаза подается насосом вверх из нижней части системы. В зависимости от адсорбционных характеристик получаемых продуктов они могут перемещаться в направлении хода как жидкой, так и твердой фазы, в результате чего будет реализовываться процесс сепарации [147], [149], [150]. Хотя данный вид хроматографических реакторов представляет собой интересную модель для изучения, он достаточно сложно реализуем на практике. Схематически процесс изображен на Рисунке 16.

В хроматографических реакторах с модельным движением стационарной фазы, как определяет их название, движение стационарной фазы только предполагается. Этот эффект достигается использованием набора колонок с неподвижной стационарной фазой («fixed-bed»), связанных в серии, и периодическим переключением каналов подачи и отвода подвижной фазы из одной колонки в другую. Такая система делится на четыре секции. Первая секция включает десорбер и экстрактор. Скорость потока здесь выше, чем во всех остальных секциях, так как служит для удаления более сильно адсорбировавшегося компонента (здесь компонент В) с поверхности сорбента. Вторая секция расположена между пунктами экстракции и подачи реагентов. В этой секции происходит формирование продуктов химической реакции (компонентов В и С). Обладающий меньшей адсорбционной способностью продукт С десорбируется с поверхности матрицы и отводится потоком жидкой фазы, в то время как продукт В еще остается связанным с носителем и транспортируется в область экс-

тракции. Поэтому экстракционный поток содержит продукт В. В третьей секции происходит конверсия компонента А. Продукт В удерживается, поэтому продукт С может быть собран в пункте сбора очищенной жидкости. В четвертой секции компонент С адсорбируется и переносится обратно в секцию 3 вместе с адсорбентом, в то время как жидкая фаза очищается и используется повторно [152], [153]. Схематически процесс представлен на Рисунке 17.

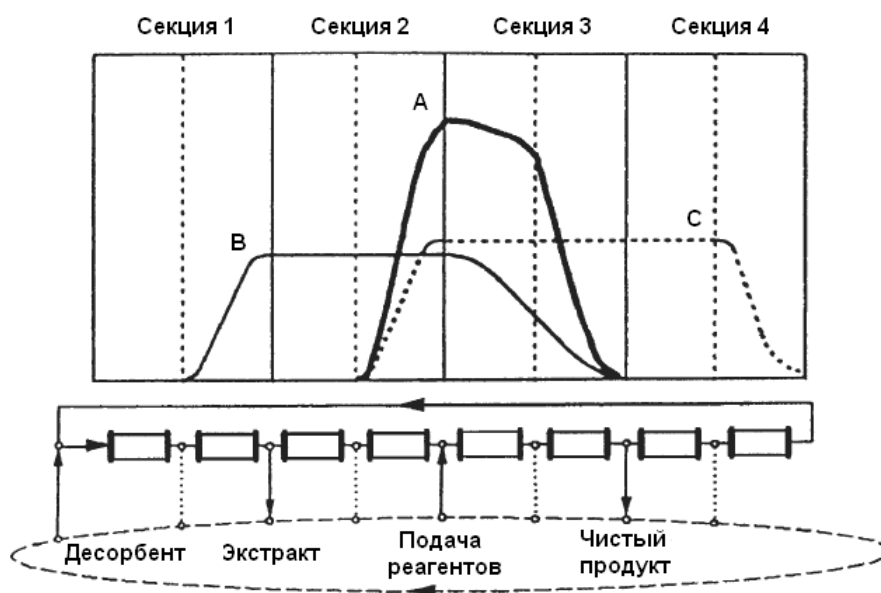


Рисунок 16 – Схема, иллюстрирующая принцип работы хроматографического реактора с обратным движением стационарной фазы. Рисунок адаптирован из [151].

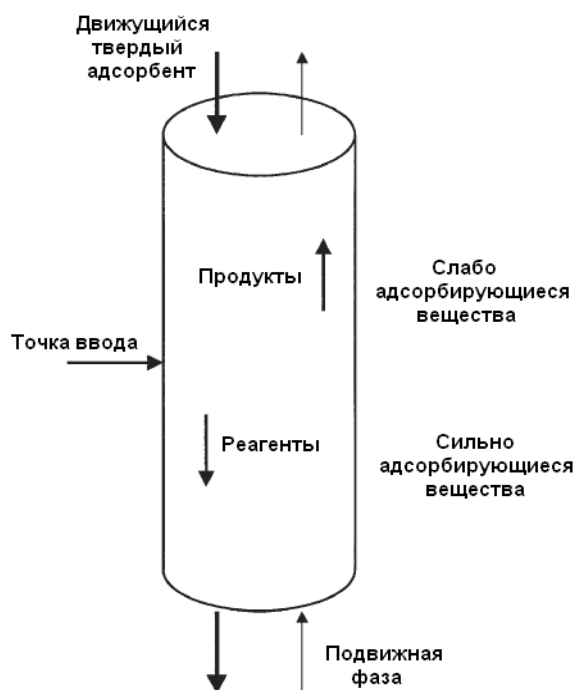


Рисунок 17 – Схема, иллюстрирующая принцип работы хроматографического реактора с модельным движением стационарной фазы. Рисунок адаптирован из [154].

Позже, в 1980-х годах, перечисленные хроматографические реакторы стали популярны также и в биокатализе, где реакция осуществляется при использовании ферментов или ферментных систем. При этом ферменты могут быть как иммобилизованными на поверхности носителя, так и растворенными в подвижной фазе.

Например, при использовании несвязанных с носителем ферментов был реализован процесс инверсии сахарозы в глюкозу и фруктозу [155], а также биосинтеза декстрана из сахарозы [156]. Кроме того, были исследованы реакции изомеризации глюкозы и фруктозы [157], конверсии крахмала в мальтозу [148] и мальтозы в глюкозу [158].

В случае иммобилизованных ферментов рассматривались процессы этерификации пропионовой кислоты с изоамиловым спиртом [159], а также пропионовой кислоты с 2-этил-1,3-гександиолом в присутствии иммобилизованной липазы [160]. Также описан процесс гидролиза пенициллина в 6-аминопеницилиновую кислоту и фенилуксусную кислоту иммобилизованной пенициллинацилазой [161]. В настоящее время хроматографические биореакторы с использованием дисперсионных стационарных фаз разработаны для определения ацетилхолина и холина в жидкостях [162], [163], ацетальдегида [164] и др. в различных видах пищи, напитков и косметики, а также для получения высокочистых веществ, например, L-метионина из рацемической смеси N-ацетилметионина [165].

В случае применения иммобилизованных ферментов во всех перечисленных процессах выбирали реакторы с неподвижной стационарной фазой. Такие системы могли состоять как из одной колонки, которая осуществляла одновременно стадию каталитической реакции и сепарацию продуктов, так и из двух колонок, одна из которых представляла собой гетерогенный биокатализатор, а вторая – сепарационную колонку. Однако, к настоящему времени все описанные случаи применения хроматографических реакторов ограничиваются реализацией процессов биоконверсии небольших молекул, служащих в качестве моделей для изучения подобных систем.

### **1.5. Применение гетерогенных биокатализаторов**

Развитие энзимологии и биотехнологии в течение 20-го века довольно быстро позволило вывести использование ферментов на промышленный уровень, в том числе благодаря применению гетерогенных биокатализаторов [166], [167]. Использование природных биокатализаторов в производственном процессе, например, замена кислотного и щелочного гидролиза на ферментативный, позволяет исключить из технологического цикла вредные с экологической точки зрения химические реагенты и повысить чистоту и выход целевого продукта [168].



Традиционным направлением применения гетерогенных биокатализаторов является получение тех или иных химических веществ. Наряду с этим, ферменты также используют для переработки различных производственных отходов, а также для разрушения вредных или нежелательных соединений, тем самым, обеспечивая дополнительную возможность очистки окружающей среды [169]. Особенно ощутимый вклад гетерогенные биокатализаторы внесли также в развитие медицины [170], [171], [172], фармацевтической [173], [174], [175] и пищевой промышленности [176].

В частности в медицинских целях иммобилизованные ферменты применяются в качестве высокоэффективных аналитических систем и датчиков для идентификации некоторых видов заболеваний. В фармацевтике на основе иммобилизованных ферментов получены лекарственные препараты пролонгированного действия. Также гетерогенные биокатализаторы используют для проведения скрининга ингибиторов клинически значимых ферментов. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения инвертных сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислот, оптически активных *L*-аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др.

Ниже рассмотрены частные случаи использования гетерогенных биокатализаторов на основе ферментов, используемых в данной работе.

### **1.5.1. Рибонуклеаза А**

В настоящее время широкое развитие технологии генетической инженерии и фармацевтической промышленности, в частности производства рекомбинантных белков и ДНК-препаратов, вакцин и сывороток, ставит задачи получения высокоочищенных продуктов, свободных, в частности, от примесей РНК. Обычно, для удаления примесей РНК из получаемых образцов используют метод, основанный на деструкции РНК различными рибонуклеазами. Одним из широко используемых ферментов данной группы является рибонуклеаза (РНКаза). Однако использование данного фермента в растворе подразумевает дальнейшую тонкую очистку целевого продукта, как от продуктов деградации РНК, так и от присутствующего в реакционной смеси фермента. В результате чего время проведения технологического цикла, а также его себестоимость значительно возрастают. Альтернативным методом может являться применение гетерогенных биокатализаторов.

#### **1.5.1.1. Характеристика фермента**

Рибонуклеаза А является небольшим ферментом, состоящим из 124 аминокислотных остатков (молекулярная масса 13 686), и содержит 19 из 20 природных аминокислот, за исключением только триптофана [177]. Данный фермент был обнаружен в 1920 году в подже-

лудочной железе, а в 1940 году выделен М.Кунитцем в кристаллическом состоянии. РНКаза стала первым ферментом и третьим белком (после инсулина и гемоглобина), для которого была определена правильная аминокислотная последовательность, и третьим ферментом и четвертым белком (после миоглобина, лизоцима и карбоксипептидазы А), чья трехмерная структура была определена с помощью дифракционного рентгеновского анализа. Также РНКаза стала первым белком, который был полностью синтезирован методом химического твердофазного синтеза полипептидов [177].

Трехмерная структура рибонуклеазы А полностью кодируется его аминокислотной последовательностью. Форма напоминает почку с остатками активного сайта, лежащими в расщелине. Преобладающие элементы вторичной структуры – длинные переплетенные антипараллельные  $\beta$ -складчатые слои и три коротких  $\alpha$ -спирали. Фермент поперечно связан четырьмя дисульфидными связями, в которые включены все восемь его цистеиновых остатка [178] (Рисунок 18). Эти дисульфидные связи имеют важное значение для стабильности нативного фермента.

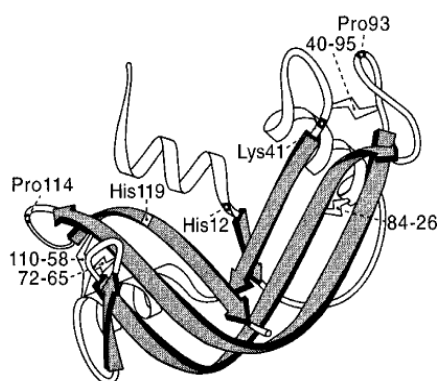


Рисунок 18 – Трехмерная структура рибонуклеазы А [177].

Число лизиновых и аргининовых остатков в рибонуклеазе А превышает число аспаратных и глутаматных остатков, соответственно, изоэлектрическая точка данного фермента лежит в щелочной области ( $pI = 9.3$ ) [179].

Рибонуклеаза А относится к преобладающим формам данного фермента в поджелудочной железе жвачных животных. Обычно ее выделяют из свежей бычьей поджелудочной железы [180]. РНКаза А характеризуется устойчивостью в широких пределах рН и значительной термостабильностью в слабокислых растворах, но легко инактивируется щелочами. Фермент наиболее устойчив в кислой среде: при рН 2-3 он выдерживает кратковременное (5-минутное) кипячение с незначительной потерей активности. Классическая процедура выделения и очистки происходит в жестких условиях. Сначала ткань, содержащую фермент, экстрагируют 0.25 М серной кислотой при температуре 5°C, затем обрабатывают раствором с рН 3.0 при температуре 95 – 100°C и производят последующую кристаллизацию осажденно-

го фермента. При использовании таких условий РНКазы А не теряет свою активность. Подобная стабильность фермента обусловлена наличием в его структуре четырех дисульфидных связей. При этом было показано, что замена любого цистеинового остатка, отвечающего за образование данных связей в молекуле фермента, значительно сокращает его термостабильность [181]. Максимальная активность рибонуклеазы А проявляется в области рН от 7.0 до 8.2 с оптимумом при рН 7.5-7.7.

Фермент относится к группе эндонуклеаз и гидролизует фосфодиэфирные связи в одноцепочечных молекулах РНК. Легко гидролизуются в присутствии рибонуклеазы также синтетические пиримидиновые рибонуклеозид-2',3'-циклофосфаты и полинуклеотиды, образованные пиримидиновыми основаниями, при этом полицитидиловая кислота расщепляется приблизительно в 20 раз быстрее, чем полиуридиловая. Следует отметить, что специфичность рибонуклеазы по отношению к пиримидиновым нуклеотидам не является абсолютной. Она также будет катализировать расщепление полиадениловой кислоты, но со скоростью от  $10^3$  до  $10^4$  раз меньшей, чем скорость расщепления полиуридиловой кислоты [177].

Механизм гидролиза субстратов РНКазой включает два этапа, на первом из которых происходит трансфосфорилирование, сопровождающееся образованием олигонуклеотида, оканчивающегося остатком 2',3'-циклофосфата пиримидинового нуклеотида. На втором этапе осуществляется гидролиз циклофосфатной группы с образованием олигонуклеотида с концевой 3'-фосфатной группой пиримидинового нуклеотида [182] (Рисунок 19).

За протекание каталитической реакции отвечает активный центр фермента, состоящий из остатков His<sup>12</sup>, His<sup>119</sup>, Lys<sup>41</sup>, Asp<sup>121</sup>, Glu<sup>11</sup> и Phe<sup>120</sup>, при этом основную роль в протекании каталитической реакции играют остатки His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup>.

Установлено, что имидазольная группа His<sup>12</sup> действует как основание в реакции трансфосфорилирования и как кислота в реакции гидролиза. В то же время, имидазольная группа His<sup>119</sup> играет противоположную роль, действуя как кислота в реакции трансфосфорилирования и как основание в реакции гидролиза. После участия в реакции трансфосфорилирования, каждый остаток His<sup>12</sup> и His<sup>119</sup> в активном центре РНКазы протонированы соответствующим образом для осуществления реакции гидролиза промежуточного циклического продукта (Рисунок 19). После реакции гидролиза остатки гистидина переходят в первоначальное протонированное состояние. Роль остатков Lys<sup>41</sup> и Phe<sup>120</sup> сводится к стабилизации переходного состояния биокатализатора, тогда как остаток глутаминовой кислоты активного центра фермента служит для снижения энергетического барьера реакции гидролиза [182].

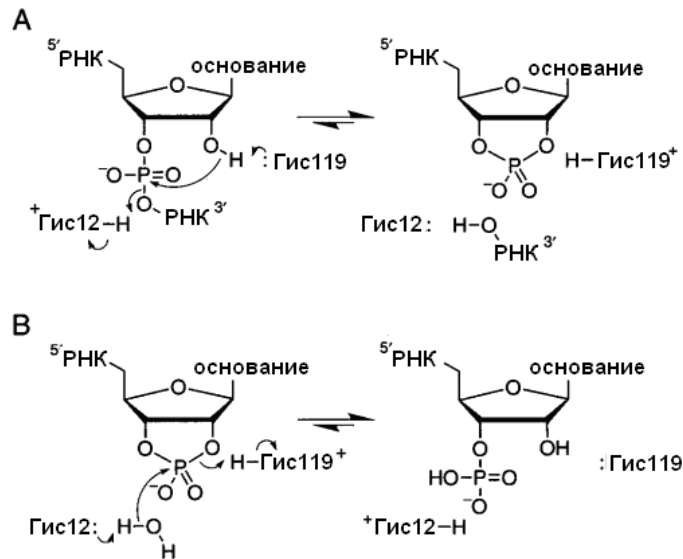


Рисунок 19 – Предполагаемый механизм реакций трансфосфорилирования (А) и гидролиза (В) под действием рибонуклеазы А. Рисунок адаптирован из [182].

Таким образом, рибонуклеаза А представляет собой высокоспецифичную фосфодиэстеразу, катализирующую расщепление диэфиров фосфорной кислоты, в которых одна спиртовая группа предпочтительно должна быть представлена 3'-гидроксилом пиримидинового рибонуклеозида. Кроме использования РНКазы для очистки биологических смесей от примесей РНК данный фермент также выступает в качестве важнейшего инструмента, широко применяемого для определения структуры РНК.

### 1.5.1.2. Гетерогенные биокатализаторы на основе рибонуклеазы А

Согласно литературным данным, наиболее широко используемыми носителями для иммобилизации РНКазы являются магнитные микросферы на основе поли(2-гидроксиэтилметакрилата) [183], а также сефароза [184], [185] или силикатные частицы [186].

Основной целью перечисленных работ являлось изучение свойств РНКазы после иммобилизации на поверхности твердых носителей. Например, в работе [184] авторы исследовали потенциал стабильности иммобилизованного и свободного фермента по отношению к температурной инактивации. В качестве субстрата для определения активности рибонуклеазы использовали РНК из дрожжевых клеток. Было показано, что иммобилизация рибонуклеазы не приводит к изменению температурного оптимума фермента, однако существенно увеличивает его стабильность. В то время как активность свободного фермента при увеличении температуры до 70°C составляла 70% от данного показателя в оптимальных условиях, активность иммобилизованного составила примерно 90%. При последующем увеличении

температуры до 80°C значения активностей соответственно составляли 24 и 49%. Авторы [186] также доказали отсутствие изменений в каталитической активности фермента при его локализации на твердом носителе (силикатные частицы). Кроме того, был показан высокий стабилизирующий эффект иммобилизации по отношению к необратимой температурной денатурации и слабая зависимость активности иммобилизованного белка от значения pH среды. Таким образом, авторы пришли к заключению о высокой эффективности использования иммобилизованных форм фермента при реализации длительных каталитических процессов, требующих сохранения высокой активности фермента в течение больших промежутков времени.

В качестве интересного примера создания проточных гетерогенных биокатализаторов на основе рибонуклеазы А в работе [187] было описано получение гетерогенных биокатализаторов путем ковалентной иммобилизации РНКазы на поверхности монолитных дисков на основе сополимера ГМА-ЭДМА посредством реакции аминогрупп белка с эпоксидными или имидазолкарбаматными группами носителя. Авторами были установлены оптимальные условия для иммобилизации фермента, а также проведено сравнение кинетических параметров каталитического гидролиза низкомолекулярного субстрата, специфичного для рибонуклеазы А, а именно цитидин-2',3'-циклофосфата. Сравнение активности РНКазы, иммобилизованной различными методами, показали, что активность биокатализатора была выше при использовании метода иммобилизации через образование карбаматной связи фермента с носителем. В данном случае рассчитанные значения  $K_M$  и  $k_{cat}$  оказались весьма близки к характеристикам нативного фермента.

### 1.5.2. Ксиланолитические ферменты

Ксилан является одним из основных полисахаридов клеток растений и составляет более 30% сухого веса растительной биомассы. Вследствие широкой распространенности в природе ксилан является главным сырьем для получения ксилозы и ксилоолигосахаридов, которые в свою очередь находят применение в пищевой промышленности в качестве пребиотических продуктов и подсластителей [188].

Так как химический гидролиз ксилана представляет собой достаточно сложный и многоступенчатый процесс, а в пищевой или кормовой промышленности вообще неприемлем, предпочтение отдается ферментативному получению ксилозы и ксилоолигосахаридов. Благодаря широкому потенциалу использования ксилана в пищевом и сельскохозяйственном производстве, а также в ряду отраслей промышленности, ориентированных на переработку растительного сырья, интерес к изучению системы ферментов, участвующих в деструкции этого природного полимера, неуклонно растет.

Ксилан представляет собой полимер, состоящий, в основном, из цепей  $\beta$ -D-ксилопиранозных остатков, соединенных 1,4-гликозидными связями. Поэтому основными ферментами, используемыми для деструкции ксилана, являются эндо-1,4- $\beta$ -ксиланаза, которая гидролизует  $\beta$ -1,4-гликозидные связи в молекуле ксилана с образованием олигосахаридов различной длины цепи, и  $\beta$ -ксилозидаза, расщепляющая ксилан и его олигомерные производные до ксилозы, действуя на концевые остатки с нередуцирующего конца макромолекулы [189]. Оба фермента относятся к подподклассу O-гликозидгидролаз.

Гликозидгидролазы, как правило, высоко специфичны к конфигурации расщепляемой гликозидной связи, размеру и типу моносахаридного остатка, а также структуре отщепляемой части субстрата, что легло в основу традиционной номенклатуры гликозидгидролаз. Согласно данной номенклатуре, различают три типа гликозидгидролаз: гликозидазы, которые катализируют отщепление концевого остатка моносахарида от гликозидов, олигосахаридов, гликопептидов и гликопротеинов; эндогликанызы, катализирующие реакцию гидролиза гликозидной связи в гомо- или гетерополисахаридах, которая удалена от начального и концевого остатков полимера, и экзогликанызы, осуществляющие отщепление концевых остатков моно- или олигосахаридов от гомополисахаридов.

Механизм каталитического гидролиза субстратов, осуществляемого различными представителями данных ферментов, формально может быть представлен как нуклеофильное замещение при аномерном центре гликоновой (неотщепляемой) части субстрата, протекающее с сохранением или обращением конфигурации [190]. Эти механизмы определяются образованием продуктов реакции с различающимися стереохимическими характеристиками. «Обращающие» конфигурацию аномерного углерода ферменты менее распространены и действуют по механизму одностадийного замещения, включающему нуклеофильную атаку молекулой воды непосредственно аномерного центра с замещением уходящей группы, анионидный отрыв агликона и образование продуктов реакции с обращенной конфигурацией.

Механизм действия так называемых «сохраняющих» конфигурацию аномерного атома углерода гликозидаз представляет собой реакцию двойного замещения SN2 через образование гликозил-фермента [190], предполагает последовательное осуществление двух нуклеофильных атак и включает две стадии (Рисунок 20). На первой стадии осуществляется гликозилирование. При этом отрицательно заряженная нуклеофильная группа фермента (обычно остаток глутаминовой или аспарагиновой кислоты) атакует аномерный атом углерода субстрата с образованием ковалентно связанного комплекса фермент-субстрат. Атака нуклеофила осуществляется со стороны, противоположной уходящему заместителю, что приводит к обращению конфигурации возникающей гликозидной связи. На втором этапе происходит реакция дегликозилирования по механизму общего основного катализа. Кар-

боксил кислотной-основной каталитической группы принимает на себя атом водорода от реакционного центра атакующего аномерный атом углерода сахара агента (или акцептора), повышая нуклеофильность последнего и облегчая тем самым очередное обращение конфигурации расщепляемой связи. Результатом данного этапа является образование свободного сахара и фермента. Таким образом, в результате двух последовательных атак углеродного атома нуклеофильными группами фермента, каждый раз со стороны, противоположной уходящей группе субстрата, конфигурация расщепляемой связи сохраняется.

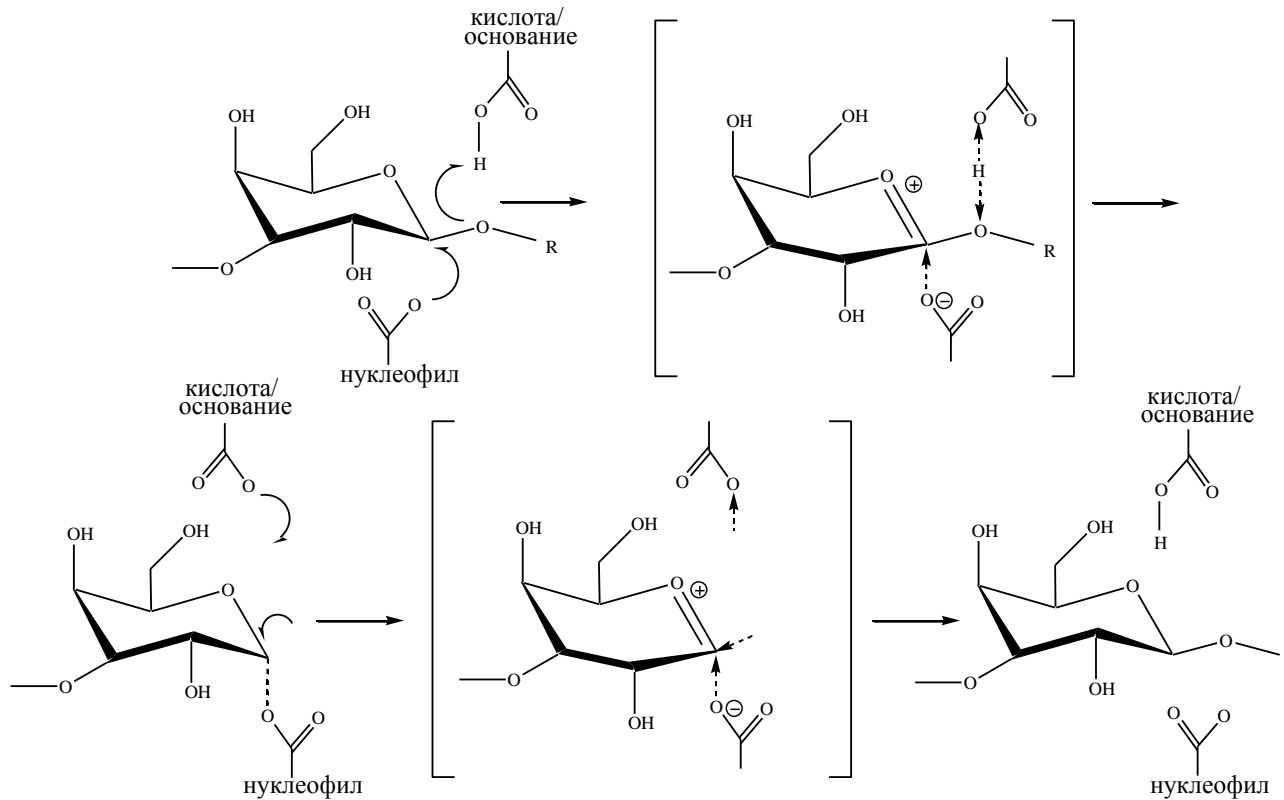


Рисунок 20 – Механизм действия «сохраняющих» конфигурацию аномерного атома углерода гликозидаз [190].

Рассматриваемые в данной работе ксиланолитические ферменты являются представителями «сохраняющих» конфигурацию аномерного атома углерода гликозидаз и соответственно осуществляют гидролиз по выше описанному механизму.

### 1.5.2.1. $\beta$ -ксилаза

По своей природе ксиланаза относится к гликозид-гидролазам, катализирующим гидролиз 1,4- $\beta$ -ксилозидной связи в ксиланах по эндодеполимеразному механизму [191].

Условно, по виду продуцента ксиланазы можно разделить на растительные и микробные. Ксиланазы были обнаружены в экстрактах солода, ржи, корневищах женьшеня. Однако основная часть ксиланаз синтезируются различными микроорганизмами: бактериями, дрож-

жами, грибами. В настоящее время ксиланазы микробного происхождения вызывают большой интерес из-за возможности их применения в пищевой и микробиологической промышленности. Среди грибов наиболее активными и широко распространенными источниками эндо-1,4- $\beta$ -ксилианаз являются продуценты рода *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Thermomyces*, *Geotrichum* и *Penicillium*.

Молекулярная масса известных на сегодняшний день ксиланаз колеблется в пределах 19000 - 50000. Сравнивая физико-химические и каталитические свойства отдельных представителей ксиланаз наряду со сходными чертами можно выявить существенные отличия, которые проявляются в различии оптимальных температур действия ферментов, pH-оптимумах, термо- и pH-стабильности. Эндоксилианазы считаются относительно термостабильными ферментами, сохраняющими активность в широких интервалах температур. Однако, большинство их представителей инактивируется при температурах выше 50°C. Температурный оптимум активности используемого в данной работе фермента, а именно  $\beta$ -ксилианазы, выделенной из коммерческого препарата Grindamyl H121, лежит в пределах 30-40°C, а pH оптимум в области 4.0-5.0.

Активный центр фермента представляет собой набор небольшого числа функциональных групп, расположенных близко друг к другу. Идентификация функциональных групп достигается комплексными исследованиями и, в первую очередь, применением специфических ингибиторов. Исследованиями установлено, что в каталитическом центре фермента содержатся два остатка глутаминовой кислоты. Также предполагается участие триптофана в активном центре ксиланазы.

Молекула ксиланазы содержит в своей структуре два домена, а именно каталитический и некаталитический углевод-связывающий, которые соединены между собой подвижным пептидным линкером [191]. Углевод-связывающий домен располагается на N-конце ксиланазной молекулы и позволяет ферменту избирательно сорбироваться на субстрате, тем самым, увеличивая его локальную концентрацию и в целом ускоряя процесс гидролиза. Было показано, что структура этих доменов комплементарна их субстратам.

Пептидные линкеры, связывающие ферментную молекулу, как правило, представляют собой гибкие неупорядоченные пептиды с высоким содержанием пролина, серина, треонина, глицина и аланина [192]. Длина линкеров может варьировать от 6 до 100 аминокислотных остатков, но обычно находится в диапазоне от 20 до 50. Благодаря наличию пролина, линкеры приобретают жесткость, свойственную коллагеноподобным структурам. Богатые глицином участки обеспечивают достаточную подвижность. Оксиаминокислоты в линкерах обычно гликозилированы, что защищает соответствующие полипептидные цепи от протеолиза.



Помимо пептидных линкеров домены связаны между собой водородными связями, а также за счет гидрофобных взаимодействий.

### 1.5.2.2. $\beta$ -ксилозидаза

$\beta$ -ксилозидаза действует на субстрат с невозстанавливающего конца молекулы ксилана или ксилоолигосахарида, поэтому ферменты данного вида не функционируют при наличии бокового заместителя у концевой невозстанавливающего остатка ксилозы. Активность  $\beta$ -ксилозидаз увеличивается с уменьшением молекулярной массы субстрата.

$\beta$ -ксилозидазы продуцируются многими организмами: бактериями, актиномицетами, дрожжами, грибами, беспозвоночными животными и высшими растениями. Среди микроорганизмов, способных продуцировать ксилозидазы, особо выделяются грибы из родов *Aspergillus*, *Trichoderma* и *Penicillium*, являющиеся промышленными продуцентами ферментных препаратов [191]. В связи с наибольшей распространенностью ксилозидаз среди мицелиальных грибов и бактерий, их физико-химические свойства описаны наиболее подробно. Используемая в работе  $\beta$ -ксилозидаза была выделена из культуральной жидкости мицелиального гриба *Aspergillus awamori*.

Молекулярные массы  $\beta$ -ксилозидаз варьируются от 40000 до 400000. Большинство представителей ксилозидаз стабильны в кислой и нейтральной области рН, однако теряют свои свойства в щелочных растворах. Ксилозидазы микроорганизмов обычно наиболее активны при кислых значениях рН в интервале от 4 до 6. Обнаружены также ферменты с оптимумом рН в нейтральной области. Используемый в данной работе представитель ксилозидаз имел рН оптимум в области 3.5 - 5.0. Данные о термостабильности свидетельствуют, что большинство ферментов способны сохранять активность при нагревании до 50°C в течение часа. Температурный оптимум ксилозидазы составляет 30 - 40°C [193], [194].

Многочисленные кристаллографические исследования структуры ферментов и фермент-субстратных комплексов, имеющиеся на данный момент, показали многосайтную структуру активных центров  $\beta$ -ксилозидазы. В данном случае активный центр фермента, действующего на полимерные субстраты, можно рассматривать как состоящий из сайтов или участков, каждый из которых связывает мономерный остаток полимера. Таким образом, фермент в активном центре содержит два сайта связывания, -1 и +1 как с невозстанавливающего, так и с восстанавливающего конца субстрата, между которыми происходит катализ [195]. Для некоторых ксилозидаз идентифицированы основные каталитические остатки активного центра, состав которых меняется для разных представителей данного вида ферментов. Так, в состав активного центра используемой ксилозидазы входят остатки аспарагино-

вой и глутаминовой кислот, которые играют соответственно роль нуклеофильной группировки и кислотного катализатора.

Характерным свойством некоторых ксилозидаз является также трансгликозилирующая активность, которую можно рассматривать, как способность ферментов в результате катализируемой реакции переносить гликозильный остаток исходного субстрата (донора) не на молекулу воды, а на иной акцептор – молекулу, имеющую, по крайней мере, одну гидроксильную группу. В роли акцептора могут выступать алифатические спирты, гидроксикарбоновые кислоты (Ser, Thr) или сахара.

### **1.5.2.3. Гетерогенные биокатализаторы на основе ксиланолитических ферментов**

В связи с широкими возможностями промышленного использования ксиланолитических ферментов осложненными, однако, их малой стабильностью были предприняты попытки локализации биомолекул на поверхности твердых носителей для получения гетерогенных биокатализаторов, характеризующихся высокой активностью в течение длительного времени.

В большинстве случаев, при иммобилизации наблюдалось улучшение специфической активности иммобилизованных ферментов, температурная и рН стабилизация, происходящая вследствие сокращения конформационной подвижности молекулы фермента, что предотвращало окисление, агрегацию и другие изменения в молекуле биокатализатора. Как упоминалось ранее, среди факторов, влияющих на эффективность гетерогенных биокатализаторов, способ иммобилизации, а также природа и свойства стационарной фазы играют важную роль. В таком случае, медленный массоперенос макромолекул субстрата может быть причиной снижения активности фермента в проточных системах. Например, в работах, посвященных иммобилизации ксиланазы на поверхности носителей различных типов, таких как Дуолит, Амберлит, ДЭАЭ-сефадекс, хитин, хитозан, желатин и полиакриламидный гель, сохранение активности иммобилизованного фермента было обнаружено только в случае использования в качестве носителей хитина и желатина, в то время как использование остальных видов носителей приводило к сокращению активности фермента до 56–87% в зависимости от типа используемого носителя [196], [197], [198]. Удовлетворительных результатов удалось добиться при иммобилизации ксиланазы на монолитные мембраны на основе сополимера 2-аминоэтиламинометакрилата с этиленгликольдиметакрилатом и 2-гидроксиэтилметакрилатом (АЭМА-ЭДМА-ГЭМА). Сохранения активности иммобилизованного фермента удалось достичь путем вариации поровых характеристик полимерного материала [199].

Эффективность иммобилизованной ксиланазы для получения ксилозы была доказана группой авторов [200]. Они проводили каталитическую деградацию ксилана в растворе с добавлением равных аликвот свободного и иммобилизованного на поверхности полимерного носителя (Eudragit L-100) фермента. В случае иммобилизованного фермента, по окончании реакции следовало его удаление из реакционной среды методом осаждения и центрифугирования. Было установлено, что степень конверсии 1% раствора ксилана в оптимальных условиях в течение 6 часов для свободного фермента составляла 25%, тогда как для иммобилизованного фермента – 42%.

В большинстве работ анализ получаемых продуктов подтверждал эффективность использования иммобилизованной  $\beta$ -ксилозидазы, которая обычно сохранялась на уровне свободного фермента или немного возрастала. Например, в работе [201] свободная очищенная ксилозидаза не обладала активностью в отношении непосредственно ксилана без предварительной его обработки ксиланазами, однако иммобилизованный на полиэтилениминсефарозу фермент оказался в состоянии конвертировать в ксилозу 3.5–5.0% этого субстрата. Автор объясняет полученные результаты конформационными изменениями в молекуле фермента, происходящими в результате иммобилизации, вследствие чего наблюдается увеличение сродства или увеличение доступности субстратом каталитического центра фермента.

Так как  $\beta$ -ксилозидаза участвует в гидролизе преимущественно коротких цепей ксилоолигосахаридов до ксилозы и в большинстве случаев не обладает высокой активностью в отношении полимерной молекулы ксилана, последний часто подвергают обработке  $\beta$ -ксилозидазой в сочетании с  $\beta$ -ксиланазой. Например, группа авторов [198] применила данный подход для сравнения эффективности  $\beta$ -ксилозидазы, иммобилизованной посредством физической адсорбции на поверхности полиамидной мембраны, с эффективностью нативного фермента. Максимальный выход ксилозы после продолжительного гидролиза 1% раствора ксилана в течение 6 часов с помощью нативной или иммобилизованной ксилозидазы в сочетании с нативной ксиланазой, составил 25 и 30% ксилозы, соответственно. В тоже время, при использовании только ксиланазы авторам удалось получить только 16% ксилозы.

Таким образом, для достижения максимально эффективной деструкции биополимеров совместное использование экзо- и эндогидролаз часто оказывается более предпочтительным. Например, в работе [196] авторы разработали гетерогенный биокатализатор на основе желатина, несущий совместно иммобилизованные ксиланазу и ксилозидазу. Максимальный выход ксилозы, полученной посредством гидролиза ксилана двумя ферментами в режиме зонального элюирования субстрата, составил 30%, в то время как тот же параметр для реакции, катализируемой только ксиланазой, достигал всего лишь 16%. Для тех же целей авторы [197] использовали в качестве носителя хитозан. В данном случае также проводили совместную

иммобилизацию обоих ферментов на поверхности выбранного носителя. При использовании полученного гетерогенного биокатализатора количество произведенной ксилозы возросло в 10 раз по сравнению с данным показателем, найденным при использовании свободной ксиланазы, и в 2 раза по сравнению с количеством ксилозы, полученным при использовании только иммобилизованной ксиланазы [196].

### 1.5.3. Эстераза

В настоящее время биodeградируемые полимеры с контролируемым временем распада представляют большой интерес в качестве материалов медицинского назначения. В частности, материалы на основе данных полимеров могут быть использованы в качестве временного каркаса, шовных материалов, а также для получения систем доставки лекарственных средств.

Полезные свойства медицинских материалов на основе биodeградируемых полимеров сильно зависят от их стабильности. Несмотря на то, что организм человека представляет собой довольно агрессивную среду, необходимо, чтобы эти материалы сохраняли свои свойства в течение определенного периода. Таким образом, контролируемое время деградации является ключевой характеристикой материалов биомедицинского назначения, а изучение процесса деструкции – необходимым этапом процесса создания таких материалов.

Обычно на начальном этапе разработки для этих целей используют модельные биологические смеси, содержащие ферменты, подходящие для деструкции полимерных молекул. Однако получение корректных результатов в данном случае осложняется вследствие того, что процесс деградации может быть довольно продолжительным, в то время как используемые нативные формы ферментов представляют собой крайне лабильные соединения, которые подвержены быстрой инактивации *in vitro*. Применение ферментов, закрепленных на твердой поверхности, может помочь в преодолении данных недостатков.

Среди биodeградируемых материалов, как используемых в медицине, так и разрабатываемых, полигидроксикислоты (поли(молочная кислота) (ПМК), поли(гликолевая кислота) (ПГК), поликапролактон (ПКЛ) и т.д.) занимают одно из ведущих мест. Эти вещества химически инертны, и, как следствие, биосовместимы, являются биodeградируемыми, а материалы на их основе характеризуются хорошими механическими свойствами. Деградация сополимеров данного класса в организме осуществляется, в первую очередь, различными ферментами подкласса эстераз.

### 1.5.3.1. Характеристика фермента

Эстеразы представляют собой ферменты класса гидролаз, катализирующие в клетках гидролитическое расщепление сложных эфиров до спиртов и кислот при участии молекул воды. К эстеразам в широком смысле слова относятся: липазы, фосфатазы, сульфатазы и собственно эстеразы. К последним принадлежат многочисленные специфические ферменты: холинэстераза, хлорофиллаза, танназа, пектаза и др. [202].

Эстеразы обнаружены у животных, высших растений и микроорганизмов. Наиболее хорошо изучены ферменты животного происхождения, в меньшей степени – растительного. Молекулярные массы различных эстераз могут варьироваться в пределах от 30000 до 180000 [203].

Для используемой в данной работе эстеразы из свиной печени характерна относительная групповая субстратная специфичность, то есть способность гидролизовать сложноэфирные связи между радикалами различного типа. Эстераза расщепляет моно-, ди-, триглицеролы и другие соединения, содержащие сложноэфирную связь. Скорость расщепления зависит от структуры субстрата. рН оптимум данного фермента лежит в щелочной области (рН 9.5). Оптимальная температура катализа эстеразой составляет 35-40°C, при 50°C наступает слабая, а при 65°C – быстрая (30 мин) инактивация.

Трехмерная структура эстеразы была определена с помощью метода рентгеновской кристаллографии. Она имеет структуру, которая представляет собой сердцевину, в свою очередь, состоящую из параллельных  $\beta$ -складчатых слоев, окруженных  $\alpha$ -спиралями. В состав активного центра данного фермента входят три аминокислоты, а именно серин, гистидин и аспарагиновая/глутаминовая кислоты (Рисунок 21) [203].

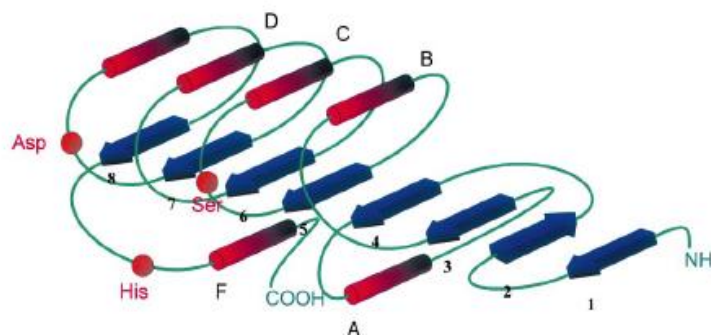


Рисунок 21 – Схема трехмерной структуры эстеразы: 1-8 –  $\beta$ -складчатые слои, A-F –  $\alpha$ -спирали [203].

Механизм действия эстеразы включает в себя нуклеофильную атаку гидроксильной группы остатка серина ( $\text{Ser}^{105}$ ), присутствующего в активном центре фермента, на ацилкарбонильную группу субстрата. При этом происходит формирование слабой водородной связи между остатками гистидина и аспарагиновой кислоты, которое облегчает действие нуклео-

фильной атаки  $\beta$ -ОН группы серина. В данном механизме гистидин отщепляет протон от серина в переходном состоянии для того, чтобы передать его ацилкарбонильной группе субстрата [204]. Это приводит к образованию тетраэдрического промежуточного соединения, которое стабилизируется слабой водородной связью между оксианионом и пептидной связью, образованной с участием Gln<sup>106</sup>. Формирование ацил-ферментного комплекса на следующем этапе требует удаления протона с гистидина, так что этот комплекс переходит в ацил-ферментное промежуточное соединение, при этом выделяется молекула спирта. На завершающем этапе молекула воды атакует комплекс (нуклеофильная атака), чтобы образовать промежуточное соединение, которое, затем, теряет молекулу кислоты с высвобождением фермента в своей нативной форме (Рисунок 22).

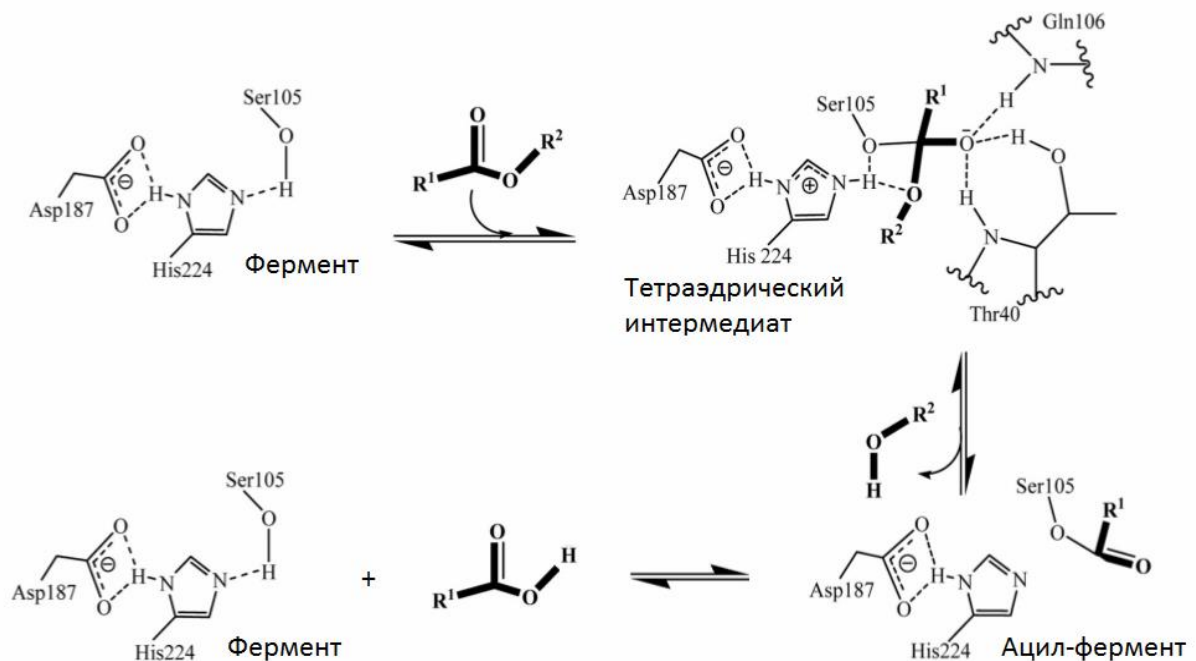


Рисунок 22 – Механизм действия эстеразы.

### 1.5.3.2. Гетерогенные биокатализаторы на основе эстеразы

Эстеразы представляют собой вид ферментов, в настоящее время широко применяемых для различных научных и практических целей вследствие их стабильности и высоких показателей хемо- и стереоселективности. Вследствие этого большое внимание уделяется методам повышения эффективности работы данных биокатализаторов, в том числе и методам иммобилизации эстераз.

В литературе представлен целый ряд успешных работ, посвященных созданию гетерогенных биокатализаторов на основе эстераз. Эти ферменты часто были иммобилизованы посредством адсорбции [205], однако наиболее популярным методом остается ковалентная

иммобилизация данного фермента на поверхности различных носителей, так как позволяет получать стабильные системы без возможного загрязнения продуктов реакции молекулами фермента. Например, эстераза из *B. stearotherophilus* была ковалентно иммобилизована на поверхности глиоксил агарозы. Было продемонстрировано экстремальное увеличение стабильности ковалентносвязанного фермента в условиях, приводящих к полной инактивации его нативной формы. Использование оптимизированного процесса мультиточечной иммобилизации эстеразы способствовало увеличению стабильности фермента и сохранению 65% его активности от данного показателя для нативной эстеразы после воздействия на гетерогенный биокатализатор 50% раствором диметилфумарата или диметилсульфида в течение недели [206].

Одним из наиболее распространенных видов носителей для иммобилизации эстераз являются магнитные наночастицы. В работе [207] эстераза была успешно иммобилизована через глутаровый альдегид на поверхности магнитных наночастиц, модифицированных аминосиланом. Полученный гетерогенный биокатализатор изучали для применения в реакциях биотрансформации, включающих синтез этилацетата и трансэтерификацию подсолнечных масел для производства биодизеля. Было показано, что иммобилизация фермента способствует значительному сокращению периода дезактивации фермента и обеспечивает сохранение его активности на высоком уровне как в процессе длительного хранения, так и в многократных циклах работы. Кроме того, наблюдалось увеличение выхода продукта каталитической реакции по сравнению с таковым для коммерческого фермента. Так, в случае использования гетерогенного биокатализатора выход этилацетата составлял около  $32 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$  за 12 часов. Аналогичное количество в случае коммерческого препарата достигалось лишь за 60 часов.

В работе [208] авторами были изучены характеристики эстеразы, иммобилизованной на поверхности магнитных наночастиц в реакции гидролиза растительных клеток для получения феруловой кислоты. Иммобилизация фермента способствовала значительному увеличению температурной стабильности фермента. В частности, для гетерогенного биокатализатора наблюдалось сохранение 80 и 69% начальной активности эстеразы после выдерживания при температуре 40 и 50°C в течение 120 часов, соответственно. В то же время при исследовании нативного фермента в аналогичных условиях активность составила только 45 и 40%. Также авторы отмечали высокую оперативную стабильность гетерогенного биокатализатора (сохранение 55% активности после более чем 50 циклов работы).

Подобные результаты были получены группами [209] и [210] при иммобилизации эстеразы на поверхности магнитных наночастиц, модифицированных золотом и аминосиланом, соответственно.

Кроме того, в литературе имеются сведения по ковалентной иммобилизации эстераз на поверхности таких носителей как полиакрилатные пористые частицы, содержащие реакционноспособные эпоксидные группы (Dilbeads) [211], макропористые полимерные частицы на основе сополимера стирола и дивинилбензола (Sepabeads и Eupergit) [212] и различные полиметакрилатные материалы, содержащие активированные азлактонные группы [213]. В первой работе [211] авторами была показана высокая рН и температурная стабильность иммобилизованного фермента в реакции с *n*-нитрофенилбутиратом. Авторами показано, что нативная эстераза теряла 80% активности при выдерживании в течение 2.5 часов при температуре 60°C, в то время как иммобилизованный фермент сохранял 50% активности инкубирования при данной температуре в течение 24 часов. Изучение рН стабильности проводилось посредством выдерживания в различных буферных растворах в течение 24 часов, после завершения эксперимента вычисленная остаточная активность составляла 31.5 и 97% для нативной и иммобилизованной эстеразы, соответственно. Высокая оперативная стабильность была продемонстрирована при использовании проточного варианта каталитической реакции. Для этого раствор *n*-нитрофенилбутирата пропускали сквозь колонку, набитую полимерными микросферами с иммобилизованной эстеразой, в течение 5 суток при скорости потока раствора субстрата 0.25 мл·мин<sup>-1</sup>.

Группа авторов [212] изучала свойства эстеразы, иммобилизованной на поверхности коммерческих носителей Sepabeads и Eupergit, в каталитических реакциях гидролиза (*R*, *S*)-3-замещенных карбоновых кислот. Была продемонстрирована высокая эффективность и энантиоселективность фермента, иммобилизованного на поверхности материала Sepabeads. При этом активность фермента была в 6 раз выше по сравнению с таковой для эстеразы, иммобилизованной на поверхности материала Eupergit. Авторы объясняют подобные результаты возможностью изменения поверхностного заряда фермента вследствие ковалентной иммобилизации и соответственным изменением констант ионизации аминокислотных остатков в активном центре фермента. Так, при ковалентном связывании эстеразы с материалом Eupergit, несущим реакционноспособные эпоксидные группы, уменьшается положительный заряд поверхности фермента, в то время как при иммобилизации на Sepabeads, содержащей гексаметиленаминовые группы, уменьшается отрицательный заряд поверхности, что и ведет к увеличению константы ионизации.

В работе [213] эстераза была ковалентно иммобилизована на поверхности полимерных частиц на основе сополимера 2-винил-4,4-диметилазлактона и 2-гидроксипропанметакрилатом с триметилпропантриметакрилатом (ВДМА-ГЭМА-ТМПТМА), содержащего азлактонные группы. На примере реакции с *n*-нитрофенилацетатом было показано сильное влияние гидрофобно-гидрофильных свойств носителя на эффектив-



ность гетерогенного биокатализа. Увеличение доли гидрофильного мономера (ГЭМА) способствовало созданию наиболее предпочтительного микроокружения для иммобилизованного фермента и максимальному сохранению его активности по сравнению с нативной формой (около 68 %).

В заключение следует отметить, что иммобилизация данных ферментов во всех случаях приводила к значительному увеличению стабильности биокатализатора и продолжительному сохранению его активности на достаточно высоком уровне.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Материалы

Для синтеза полиметакрилатных монолитов использовали коммерчески доступные мономеры, а именно 2,3-эпоксипропилметакрилат (глицидилметакрилат, ГМА, 97%), этилендиметакрилат (ЭДМА, 98%), 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА, 98%), глицерин-1,3-диметакрилат (ГДМА, 85%). В качестве порообразующих растворителей применяли додеканол (99%), циклогексанол (99%) и толуол (99%). Инициирование процесса полимеризации осуществляли с использованием *азо*-бис-изобутиронитрила (АИБН) (98%) Все перечисленные реактивы были продуктами компании Sigma-Aldrich (Германия).

Ферменты – рибонуклеаза А (РНКаза) из бычьей поджелудочной железы, липаза из *Candida rugosa* (ММ 64000), липаза из бычьей поджелудочной железы (ММ 63000), панкреатическая липаза (ММ 51000) и эстераза из свиной печени (ММ 162000), субстраты - полицитидиловая кислота (поли(С)), рибонуклеиновая кислота (РНК) из дрожжевых клеток, натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из половых желез лосося, ксилан из бука (ММ 40000), цитидин-2',3'-циклофосфат, а также ксилоза, цитидин-3'-монофосфат, молочная кислота были производства компании Sigma-Aldrich (Германия).

Ферменты –  $\beta$ -ксилаза (ММ 22000) и  $\beta$ -ксилозидаза (ММ 250000), а также реактивы Сомоджи и Нельсона, необходимые для определения кинетических параметров данных ферментов, были предоставлены к.х.н. А.А. Кульминской (Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» Петербургский Институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина).

Поли(молочная кислота) ( $M_w$  30000) и частицы на ее основе ( $d = 380 \pm 50$  нм) были синтезированы в лаборатории Полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ИВС РАН (Санкт-Петербург) и предоставлены к.х.н. В.А. Коржиковым.

Дигидрофосфат натрия дигидрат, гидрофосфат натрия додекагидрат, тетраборат натрия декагидрат, трис(гидроксиметил)аминометан, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), хлорид натрия, гидроксид натрия, боргидрид натрия, ацетат натрия и уксусная кислота, а также 25%-ный водный раствор аммиака, мочевины и соляная кислота были приобретены в ООО «Нева-Реактив» (Россия). Буферные растворы готовились путем растворения солей аналитической степени чистоты в дистиллированной воде с последующей фильтрацией через 0.45 мкм мембранный микропористый фильтр Millipore (США).

Водорастворимый полимер 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы (пМАГ) ( $M_w$  25000), используемый в качестве спейсера при иммобилизации ферментов, был синтезирован методом свободнорадикальной полимеризации в лаборатории Полимерных сорбентов

и носителей для биотехнологии под руководством к.х.н. О.В. Назаровой (ИВС РАН, Санкт-Петербург).

Синтез монолитных фаз, имеющих форму стержня, проводили в специальных колонках-картриджах из нержавеющей стали длиной 50 мм и диаметром 4.6 мм производства фирмы Supelco (США). Коммерчески доступные CIM Epoxy и CIM DEAE диски на основе сополимера ГМА-ЭДМА (диаметром 12 мм и толщиной 3 мм), использованные для иммобилизации фермента и хроматографического анализа образующихся в результате каталитических реакций продуктов, были получены от компании BIA Separations (Словения).

Для определения кинетических параметров нативной рибонуклеазы А в растворе реакция была остановлена путем удаления фермента методом ультрафильтрации с помощью 3000 или 10000 MWCO PES мембраны (VIVASPIN 500) фирмы Sartorius Stedim Biotech (Германия). Фильтрация молочной кислоты при проведении экспериментов по деградации частиц на основе поли(молочной кислоты) осуществлялась при использовании мембран Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel – 3000, Merck Millipore (Германия).

## 2.2. Оборудование

Синтез монолитных колонок осуществляли в жидкостном термостате MLW (Германия). Избыток мономеров и порогены удаляли из порового пространства полученных монолитных колонок в динамическом режиме, подавая растворы для промывания с помощью перистальтического насоса LKB P-1 Pharmacia (Швеция).

Хроматографический анализ продуктов и проточный вариант твердофазного биокатализа в *on-line* режиме выполнялись с использованием градиентной хроматографической системы Shimadzu (США), состоящий из двух насосов LC-10ADVP и LC-20AD, УФ-детектора SPD-10AV, системного контроллера SCL-10AVP и дегазатора DGU-14A. При проведении гетерогенного биокатализа температуру контролировали с помощью колоночного термостата ТК-50 Eppendorf (Германия).

Для проведения биоконверсии в режиме рециркуляции использовали перистальтический насос LKB P-1 Pharmacia (Швеция). Измерения оптической плотности растворов осуществляли с использованием спектрофотометра UV mini-1240 Shimadzu (Япония). Для удаления фермента или продуктов реакции из реакционной среды методом ультрафильтрации применяли центрифугу SIGMA 2-16 (Osterodeam Harz, Германия).

При проведении каталитических реакций в растворе температуру контролировали с помощью термостатируемого инкубатора Heidolph Inkubator 1000 с системой орбитального перемешивания Unimax 1010 (Германия).

В работе также были использованы магнитные мешалки с нагреванием MRHei-Standard (Heidolph, Германия), pH-милливольтметр pH-673 М (Россия) и лиофильная сушка LABCONO (LabconoCorporation, США).

Ртутный порозиметр Pascal 440, Thermoquest Instrument (Италия) использовали для количественного определения средних размеров пор и распределения пор по размерам. Визуальное исследование морфологической структуры полученных полимерных образцов осуществляли с помощью растрового электронного микроскопа JSM-35 CF (JEOL, Япония).

## 2.3. Методы

### 2.3.1. Получение макропористых монолитных материалов

#### 2.3.1.1. Синтез макропористых монолитных носителей для иммобилизации ферментов

В процессе работы были синтезированы три вида макропористых монолитных матриц в форме колонок, а именно, материалы на основе сополимеров (1) глицидилметакрилата (ГМА) с этиленгликольдиметакрилатом (ЭДМА), (2) глицидилметакрилата, 2-гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) с этиленгликольдиметакрилатом (ЭДМА), и (3) глицидилметакрилата (ГМА) с глицериндиметакрилатом (ГДМА).

Синтез макропористых монолитов осуществляли методом свободнорадикальной полимеризации *in situ* в колонках-картриджах. Полимеризационная смесь состояла из мономеров, сшивающего агента, порообразующих растворителей и инициатора. Соотношение компонентов реакционной смеси составляло 60 : 40 об.% для соотношения функциональный мономер(ы)/сшивающий агент, и 40 : 60 об.% для соотношения мономеров к порообразующим растворителям. Концентрация инициатора в полимеризационной смеси составляла 1.0% от массы мономеров. Соотношения порообразующих растворителей (додеканола, циклогексанола и толуола) в составе полимеризационной смеси, а также время полимеризации, использованные для синтеза сополимеров ГМА-ЭДМА, ГМА-ГЭМА-ЭДМА, ГМА-ГДМА отражены в Таблицах 1, 2, 3, соответственно.

С целью удаления кислорода, ингибирующего процесс радикальной полимеризации, непосредственно перед началом полимеризации реакционную смесь продували аргоном в течение 5 минут. Затем реакционную смесь вносили в колонки-картриджи, и инкубировали в водном термостате при 70°C в течение заданного времени. После завершения процесса полимеризации полученные колонки встраивали в хроматографическую систему низкого давления и последовательно промывали этанолом в течение 2 часов, смесью этанол-вода (1:1) – 30 минут и, наконец, водой в течение 30 минут при скорости потока подвижной фазы

0.5 мл·мин<sup>-1</sup> для удаления из порового пространства порообразующих растворителей и избытка мономеров.

Таблица 1 – Состав реакционных смесей, использованных для синтеза макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГМА-ЭДМА

Условия: концентрация инициатора (АИБН) 1.0 масс%, соотношение ГМА/ЭДМА = 60/40 об%, соотношение порогены/мономеры = 60/40 об%

Образец	Соотношение порогенов (%, об/об)		Время полимеризации, ч.
	Додеканол	Циклогексанол	
МЭ1	100	-	8
МЭ2	60	40	8
МЭ3	60	40	12

Таблица 2 – Состав реакционных смесей, использованных для синтеза макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА

Условия: концентрация инициатора (АИБН) 1.0 масс%, соотношение ГМА/ГЭМА/ЭДМА = 35/25/40 об%, соотношение порогены/мономеры = 60/40 об%

Образец	Соотношение порогенов (%, об/об)			Время полимеризации, ч.
	Додеканол	Циклогексанол	Толуол	
МГЭ1	100	-	-	8
МГЭ2	60	40	-	8
МГЭ3	60	40	-	12
МГЭ4	65	5	30	8
МГЭ5	65	10	25	8
МГЭ6	60	20	20	8
МГЭ7	70	20	10	8
МГЭ8	70	10	20	8
МГЭ9	75	5	20	8
МГЭ10	80	10	10	8
МГЭ11	85	5	10	8
МГЭ12	80	5	15	8
МГЭ13	90	-	10	8

Таблица 3 – Состав реакционных смесей, использованных для синтеза макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГМА-ГДМА

Условия: концентрация инициатора (АИБН) 1.0 масс%, соотношение ГМА/ГДМА = 60/40 об%, соотношение порогены/мономеры = 60/40 об%

Образец	Соотношение порогенов (% об/об)			Время полимеризации, ч
	Додеканол	Циклогексанол	Толуол	
МГ1	100	-	-	8
МГ2	60	40	-	8
МГ3	60	40	-	12
МГ4	70	30	-	8
МГ5	70	30	-	12
МГ6	60	30	10	8
МГ7	60	20	20	8

### 2.3.1.2. Синтез макропористых монолитных колонок для хроматографии

Синтез макропористых монолитных колонок для хроматографического анализа на основе сополимеров ЛМА-ЭДМА осуществляли методом свободнорадикальной полимеризации *in situ* в колонках-картриджах. Полимеризационная смесь состояла из мономеров, сшивающего агента, порообразующих растворителей и инициатора. Соотношение компонентов реакционной смеси составляло 50 : 50 об.% для соотношения ЛМА/ЭДМА, и 40 : 60 об.% для соотношения мономеры/порогены. Концентрация инициатора в полимеризационной смеси составляла 1.0% от массы мономеров. Для получения необходимых поровых характеристик варьировали время полимеризации и соотношение порообразующих растворителей в реакционной смеси. Состав полимеризационных смесей и условия синтеза отражены в Таблице 4.

Перед началом полимеризации реакционную смесь продували аргоном в течение 5 минут, затем вносили в колонки-картриджи, и инкубировали в водном термостате при 70°C в течение заданного времени. После завершения процесса полимеризации полученные колонки встраивали в хроматографическую систему низкого давления и промывали метанолом в течение 2 часов при скорости потока подвижной фазы 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>.

Таблица 4 – Состав реакционных смесей, использованных для синтеза макропористых монолитных материалов на основе сополимера ЛМА-ЭДМА

Условия: концентрация инициатора (АИБН) 1 масс%, соотношение ЛМА/ЭДМА = 50/50 об%, соотношение порогены/мономеры = 60/40 об%

Образец	Соотношение порогенов (%, об/об)		Время полимеризации, ч
	1,4-бутандиол	1-пропанол	
Мл1	20	80	4
Мл2	30	70	4
Мл3	40	60	4
Мл4	20	80	10
Мл5	30	70	10
Мл6	40	60	10

### 2.3.1.3. Изучение свойств монолитных матриц

Для полученных макропористых монолитных колонок и коммерческих монолитных дисков были изучены зависимости давления от скорости потока. В качестве подвижной фазы для данного исследования была использована вода. В случае колонок скорость потока подвижной фазы варьировалась в пределах 0 - 2.5 мл·мин<sup>-1</sup>, что соответствовало линейным скоростям потока 0 – 25 см·мин<sup>-1</sup>. В случае дисков скорость потока подвижной фазы, соответствующая используемым линейным скоростям, варьировалась в пределах 0 – 10 мл·мин<sup>-1</sup>.

Характеристики колонок, а именно, проницаемость, пористость и средний диаметр пор, рассчитывали, основываясь на данных гидродинамической проницаемости по закону Пуазеля-Дарси. В качестве неудаерживаемого компонента использовали низкомолекулярное соединение урацил. Для анализа использовали 10 мкл раствора урацила с концентрацией 0.1 г·л<sup>-1</sup>, растворенного в подвижной фазе, состоящий из ацетонитрила и воды, взятых в соотношении 1:1. Детектирование зоны элюирования урацила из колонок проводили при длине волны 254 нм. Расчет проницаемости синтезированных монолитов для подвижной фазы ацетонитрил-вода проводили с помощью уравнения (20), расчет пористости - с помощью уравнения (22). Зная значения проницаемости и пористости, решали уравнение (21) для определения среднего размера пор. Полученные посредством этого расчета поровые характеристики синтезированных колонок сравнивали с данными метода интрузионной ртутной порометрии, которые были выполнены на оборудовании компании VIA Separations (Айдовщина, Словения).

Исследование морфологии поверхности полученных монолитных материалов было изучено с помощью метода растровой электронной микроскопии. Слой катодного напыления платины составлял 50-100 Å.

### 2.3.2. Иммуобилизация ферментов на поверхности полимерного носителя

Иммуобилизацию рибонуклеазы А проводили двумя способами: (1) прямой реакцией аминогрупп фермента с поверхностными эпоксидными группами полимерного носителя; (2) многостадийным методом, основанным на введении промежуточного макромолекулярного спейсера, служащего для удаления молекулы фермента от поверхности носителя. В качестве спейсера использовали окисленный периодатом натрия водорастворимый полимер 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы (ок.-пМАГ). В обоих случаях условия иммуобилизации были оптимизированы таким образом, чтобы количество связанного с носителем фермента оказалось приблизительно равным.

В случае  $\beta$ -ксилазазы,  $\beta$ -ксилозидазы и эстеразы иммуобилизацию проводили только с использованием полимерного спейсера.

#### 2.3.2.1. Прямая иммуобилизация

Перед проведением иммуобилизации рибонуклеазы и колонку, и коммерческий диск уравнивали 0.1 М Na-боратным буферным раствором, рН 9.4. Затем через стационарную фазу пропускали раствор РНКазы в том же буферном растворе с концентрацией 5 мг·мл<sup>-1</sup> со скоростью потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>. В случае дисков 1 мл раствора фермента пропускали сквозь диск, который далее погружали в 1.0 мл раствора фермента. Так как объем монолитного носителя в форме колонок был в 2.5 раза больше, чем в форме дисков, для колонок объем пропускаемого раствора фермента составлял 3.0 мл. Реакцию проводили в течение 21 часа при температуре 22°C. Избыток фермента удаляли последовательным промыванием полученных каталитических систем Na-боратным буферным раствором (20 мл), 2М NaCl (8 мл) и дистиллированной водой (20 мл) при скорости потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>. Полученные гетерогенные биокатализаторы промывали 0.01 М Na-фосфатным буфером, рН 7.0, содержащим 0.15 М NaCl, и хранили в холодильнике при температуре 4°C.

#### 2.3.2.2. Иммуобилизация через полимерный спейсер

Данный метод иммуобилизации включал несколько стадий, а именно, (1) аминирование эпоксидных групп сорбента, (2) ковалентное присоединение альдегид-содержащего водорастворимого полимерного спейсера, (3) ковалентное связывание фермента и (4) восстановление остаточных альдегидных групп полимерного спейсера и иминных связей.

- Окисление пМАГ

100 мг (0.4 ммоль) пМАГ растворяли в 16 мл дистиллированной воды и полученный раствор охлаждали до 4°C. При тщательном перемешивании добавляли мета-периодат натрия в мольном соотношении [МАГ]:[NaIO<sub>4</sub>] = 0.5. Реакцию проводили в течение 24 часов



в темноте при 4°C. Очистку получаемого продукта проводили диализом против воды, после чего продукт лиофильно высушивали. Количество введенных в полимер альдегидных групп определяли с использованием высокочувствительного реагента Шиффа (фуксинсернистая кислота) и ацетальдегида в качестве стандарта. Для этого к пробе альдегидсодержащего соединения объемом 0.5 мл добавляли 2.5 мл реагента Шиффа, перемешивали и выдерживали 40 минут, после чего измеряли интенсивность поглощения окрашенного раствора при длине волны  $\lambda = 550$  нм.

- Амнирование

Предварительно прогретый до 40°C 25%-ный водный раствор аммиака пропускали через колонку или диск в количестве 10 или 5 мл, соответственно, при скорости потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>. Заполнив поровое пространство монолита раствором аммиака, колонку (диск) термостатировали в течение 5 часов при температуре 40°C. После завершения реакции стационарную фазу промывали дистиллированной водой до достижения нейтрального значения pH.

- Иммобилизация спейсера

Для ковалентного присоединения спейсера аминированные монолитные сорбенты уравнивали 0.01M Na-фосфатным буферным раствором, pH 7.0, в течение 20 мин. Затем через колонку или диск с помощью перистальтического насоса пропускали 4.0 или 1.5 мл раствора ок.-пМАГ в том же буфере, с концентрацией 0.45 или 0.65 мг·мл<sup>-1</sup>, соответственно. Реакцию проводили в течение 1.5 часов при температуре 22°C. После окончания реакции стационарные фазы, несущие ковалентно присоединенную ок.-пМАГ, в течение 15 минут промывали 0.01 M Na-фосфатным буферным раствором, pH 7.0. Скорость потока подвижной фазы во всех случаях составляла 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>.

- Иммобилизация фермента

- (а) Рибонуклеаза А

Поровое пространство колонки и диска, предварительно уравновешенных 0.01 M Na-боратным буферным раствором, pH 8.4, заполняли с помощью насоса 3.0 или 1.5 мл раствора РНКазы в том же буфере с концентрацией 4.0 или 5.0 мг·мл<sup>-1</sup>, соответственно. Реакцию ковалентного присоединения фермента проводили в течение 1.5 часов при температуре 22°C. После завершения процесса для удаления избытка рибонуклеазы А полученные гетерогенные биокатализаторы промывали последовательно 20 мл 0.01 M Na-боратного буфера, pH 8.4, 10 мл 2M NaCl и 10 мл воды.

- (б)  $\beta$ -ксиланаза

Поровое пространство монолитных носителей предварительно уравнивали 0.02M Na - ацетатным буферным раствором, pH 5.0. Затем, с помощью перистальтического насоса

прокачивали через диск 2.0 мл раствора, содержащего 180 мкг  $\beta$ -ксилазы, после чего диск помещали в оставшийся раствор фермента для статической иммобилизации. В случае иммобилизации  $\beta$ -ксилазы на поверхности носителя, имеющего форму колонки, 0.5 мл раствора, содержащего 160 мкг фермента, закачивали в поровое пространство стационарной фазы. Реакция иммобилизации протекала в течение 3 часов при температуре 35°C в воздушном термостате. После завершения процесса колонку и диск последовательно промывали 20 мл 0.02 М Na - ацетатного буфера, pH 5.0, 10 мл 2 М раствора хлорида натрия и 10 мл воды.

(в)  $\beta$ -ксилозидаза

В случае  $\beta$ -ксилозидазы иммобилизацию проводили только с использованием монолитных колонок в качестве стационарных фаз. Предварительно стационарные фазы уравнивали 0.02 М Na – ацетатным буфером, pH 5.0, после чего сквозь поры сорбента прокачивали 3.0 мл раствора  $\beta$ -ксилозидазы в том же буфере с концентрацией 2.0 мг·мл<sup>-1</sup> или 3.0 мг·мл<sup>-1</sup>. Ковалентное присоединение фермента проводилось в течение 1.5 или 2.5 часов при температуре 25 или 35°C в воздушном термостате, соответственно. По завершении реакции колонку промывали последовательно 20 мл используемого для иммобилизации буфера, 10 мл 2 М раствора хлорида натрия и 10 мл воды.

(г) Эстераза

Иммобилизацию эстеразы проводили на поверхности монолитного диска, предварительно уравновешенного 0.01 М Na-боратным буферным раствором, pH 8.4. После этого, поровое пространство диска заполняли 0.5 мл раствора фермента с концентрацией 2.0 мг·мл<sup>-1</sup>. Статическую реакцию иммобилизации проводили в течение 3 часов в воздушном термостате при 35°C. По окончании реакции диск с иммобилизованной эстеразой промывали последовательно 20 мл 0.01 М Na-боратным буферным раствором, pH 8.4, 10 мл 2 М раствора хлорида натрия и 10 мл воды.

- Восстановление иминных связей (оснований Шиффа)

На завершающем этапе иминные связи, образовавшиеся в результате взаимодействия amino- и альдегидных групп, а также остаточные альдегидные группы спейсера восстанавливали раствором боргидрида натрия в воде с концентрацией 2.0 мг·мл<sup>-1</sup> в течение часа при температуре равной 22°C. После окончания реакции полученные гетерогенные биокатализаторы промывали буферными растворами для хранения, в случае рибонуклеазы А и эстеразы – 0.01 М Na-фосфатным буферным раствором, pH 7.0, в случае  $\beta$ -ксилазы и  $\beta$ -ксилозидазы – 0.02 М Na-ацетатным буферным раствором, pH 5.0 в течение 15 мин при скорости потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>. Полученные гетерогенные биокатализаторы хранили в холодильнике при температуре 4°C.

### 2.3.2.3. Определение количества иммобилизованного фермента

Количество связавшегося с полимерной матрицей фермента,  $m_{(иммоб.ферм.)}$ (мг), рассчитывали на основе суммарной разности масс белка, определяемого в исходных и промывных растворах, следующим образом:

$$m_{(иммоб.ферм.)} = m_1 - m_2 - m_3, \quad (24)$$

где  $m_1$  – количество белка в исходном растворе до иммобилизации (мг);  $m_2$  – количество белка в растворе после иммобилизации (мг),  $m_3$  – количество белка в промывных растворах (мг).

Концентрацию белка в растворе определяли по методу Лоури-Фолина [214]. Значения УФ-поглощения окрашенного раствора регистрировали при длине волны 750 нм. Для расчетов концентрации использовали калибровочные зависимости, построенные для соответствующего фермента, в диапазоне концентраций от 0.01 до 0.10 мг·мл<sup>-1</sup>.

### 2.3.3. Определение кинетических параметров биокаталитических реакций

В процессе работы были определены кинетические характеристики как для свободных, так и для иммобилизованных ферментов. Для получения сопоставимых результатов для одной и той же пары фермент/субстрат реакции гомогенного и гетерогенного биокатализа проводили в идентичных условиях.

Значения константы Михаэлиса и максимальной скорости ферментативной реакции были рассчитаны при использовании графического метода, основанного на построении зависимости скорости гидролиза ( $V$ ) от концентрации субстрата ( $[S]$ ), и последующей линеаризации полученных кривых в координатах  $[S]/V$  от  $[S]$  (метод Хейнса). В данном случае пересечение прямой с осью  $X$  дает величину  $-K_M$ , а с осью  $Y$  – величину  $K_M/V_{max}$ .

Скорость гидролиза рассчитывали по уравнению:

$$V = [P]/t, \quad (25)$$

где  $t$  - время реакции (мин),  $[P]$  - концентрация продукта реакции (мкмоль·л<sup>-1</sup>), рассчитанная на основе экспериментальных данных с помощью уравнения:

$$[P] = \Delta A_n / \varepsilon_n l, \quad (26)$$

где  $\Delta A_n$  – прирост оптической плотности за время реакции при длине волны  $n$ ,  $l$  – толщина спектрофотометрической кюветы (см),  $\varepsilon_n$  – коэффициент экстинкции продукта каталитической реакции при длине волны  $n$  (л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>).

Зная значения  $V_{max}$  и объем реакционной смеси ферментативную активность ( $U$ ) рассчитывали с помощью соотношения:

$$U = V_{max} / \varphi, \quad (27)$$

где  $U$  – активность фермента (мкмоль·мин<sup>-1</sup>),  $\varphi$  – объем реакционного раствора (л).

Константу скорости реакции образования продуктов (каталитическую константу или число оборотов фермента)  $k_{cat}$  определяли по уравнению:

$$k_{cat} = V_{max}/[E], \quad (28)$$

где  $[E]$  – концентрация фермента (моль·л<sup>-1</sup>).

Удельную активность  $A$  ферментов рассчитывали путем нормирования активности фермента ( $U$ ) на массу биокатализатора в реакции:

$$A = U/m, \quad (29)$$

где  $m$  – количество иммобилизованного фермента (мг).

### 2.3.3.1. Рибонкулеаза А

В качестве специфических субстратов для РНКазы использовали цитидин-2',3'-циклофосфат (ЦЦФ) (низкомолекулярный субстрат) и полицитидиловую кислоту (высокомолекулярный субстрат). Определение кинетических параметров свободной и иммобилизованной РНКазы проводилось с использованием 0.01 М Трис-НСl буферного раствора, рН 7.5, содержащего 0.002 М ЭДТА и 0.1 М NaCl (рабочий буфер 1). Все эксперименты проводили при постоянной температуре (22°C).

- Гидролиз цитидин-2',3'-циклофосфата

Мониторинг протекания каталитической реакции осуществляли при длине волны 271 нм. Количество продукта рассчитывали по калибровочной зависимости, построенной для цитидин-3'-монофосфата.

#### (а) Реакция с участием растворенной РНКазы

К 2.9 мл раствора субстрата в рабочем буфере 1 добавляли 0.1 мл раствора фермента с концентрацией 0.5 мг·мл<sup>-1</sup>. Реакцию проводили в течение 10 минут, после чего регистрировали значение оптической плотности. Концентрацию субстрата варьировали в пределах от 0.06 до 1.6 мг·мл<sup>-1</sup>.

#### (б) Реакция с участием иммобилизованной РНКазы

Биокаталитические реакции с участием ферментов, иммобилизованных на поверхности стационарных фаз, осуществляли двумя способами, а именно, в режиме зонального элюирования или в режиме рециркуляции субстрата сквозь слой стационарной фазы.

Для проведения зонального элюирования колонку (диск), содержащую иммобилизованный фермент, встраивали в стандартную систему ВЭЖХ и уравнивали рабочим буферным раствором 1 в течение 15 минут. Фиксированный объем подаваемого через инжектор раствора субстрата составлял 100 мкл. Концентрацию субстрата варьировали в пределах от 0.6 до 17.0 мг·мл<sup>-1</sup>. Для исследования влияния скорости подвижной фазы на эффективность биокатализа процесс проводили при скоростях потока равных 0.3, 0.5 и 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>.

Для проведения биокатализа в режиме рециркуляции колонку (диск) подсоединяли к перистальтическому насосу. Перед проведением каталитической реакции колонку уравнивали рабочим буферным раствором 1 в течение 15 минут. Далее капилляры на входе и выходе биореактора погружали в емкость, заполненную раствором субстрата объемом 3.4 мл. Процесс рециркуляции проводили в течение 10 минут при различной скорости потока, а именно 0.5, 1.0 и 2.0 мл·мин<sup>-1</sup>. Концентрацию субстрата варьировали в пределах от 0.02 до 2.0 мг·мл<sup>-1</sup>.

- Гидролиз поли(С)

- (а) Реакция с участием растворенной РНКазы

К 2.9 мл раствора субстрата добавляли 0.1 мл раствора фермента с концентрацией 0.5 мг·мл<sup>-1</sup>. Концентрацию субстрата варьировали в пределах от 0.02 до 2.0 мг·мл<sup>-1</sup>. Реакцию проводили в течение 6 минут. После чего из реакционной смеси отбирали пробу объемом 100 мкл, разбавляли рабочим буфером 1.0 до 2.6 мл, отделяли низкомолекулярную фракцию с помощью ультрафильтрации и измеряли поглощение полученного раствора при длине волны 271 нм. Количество продукта рассчитывали по калибровочной зависимости, построенной для цитидин-3'-монофосфата.

- (б) Реакция с участием иммобилизованной РНКазы

Для исследования кинетических параметров реакций гидролиза низко- и высокомолекулярных субстратов с помощью иммобилизованной РНКазы использовали режим рециркуляции субстрата. Колонки/диски предварительно уравнивали рабочим буфером 1. Рециркуляцию 3.0 мл раствора субстрата в рабочем буфере сквозь слой стационарной фазы проводили при скорости потока раствора субстрата 0.5 мл·мин<sup>-1</sup> или 3.5 мл·мин<sup>-1</sup>. Концентрацию субстрата варьировали от 0.02 до 2.0 мг·мл<sup>-1</sup>. Остальные условия совпадали с такими, приведенными для реакции в растворе.

### 2.3.3.2. $\beta$ -ксилозидаза

Эксперименты по определению активности ксиланолитических ферментов были выполнены совместно с м.н.с. К. Бобровым (Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» Петербургский Институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина).

В качестве специфического субстрата для реакции с участием  $\beta$ -ксилозидазы использовали ксилан и ксилоолигосахариды, полученные в результате предварительного гидролиза ксилана иммобилизованной ксиланазой. Реакции деградации субстратов проводили в 0.02 М Na-ацетатном буферном растворе, pH 5.0, (рабочий буфер 2) при температуре 37°C.

Количественное определение редуцирующих сахаров, образующихся в результате деградации ксилана и ксилоолигосахаридов, проводили методом Сомоджи-Нельсона. Для этого к 1.0 мл реагента Сомоджи добавляли 100 мкл анализируемого образца. Полученную смесь тщательно перемешивали и термостатировали при 100°C в течение 20 минут. К охлажденному до комнатной температуры раствору добавляли 1.0 мл реагента Нельсона и выдерживали 10 минут. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 508 нм. Концентрацию продукта определяли по калибровочной зависимости, построенной для ксилозы с использованием метода Сомоджи-Нельсона при длине волны 508 нм в диапазоне концентраций от 0.001 до 0.01 моль/л.

(а) Реакция с участием растворенной  $\beta$ -ксилозидазы

К 135 мкл раствора ксилана или ксилоолигосахаридов добавляли 25 мкл раствора фермента в рабочем буфере 2. Концентрацию раствора субстрата варьировали от 0.05 до 1.8 мг·мл<sup>-1</sup>. Реакция протекала в течение 10 минут. Затем 100 мкл реакционного раствора отбирали для анализа методом Сомоджи-Нельсона.

(б) Реакция с участием иммобилизованной  $\beta$ -ксилозидазы

Реакцию гидролиза ксилана/ксилоолигосахаридов с помощью иммобилизованного фермента проводили в режиме рециркуляции. Монолитную колонку/диск встраивали в хроматографическую систему низкого давления и уравнивали рабочим буфером 2. 3.0 мл раствора ксилана или ксилоолигосахаридов пропускали сквозь колонку в течение 10 минут при скорости потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>. Концентрацию раствора субстрата варьировали в пределах от 0.1 до 2.6 мг·мл<sup>-1</sup>. После завершения реакции 100 мкл реакционного раствора отбирали для анализа методом Сомоджи-Нельсона.

### 2.3.3.3. $\beta$ -ксилаза

Для проведения реакций гидролиза в качестве подвижной фазы использовали 0.02 М Na-ацетатный буфер, pH 5.0 (рабочий буфер 2). Количественное определение продукта реакции проводили по методу Сомоджи-Нельсона (см. п. 3.3.3.2). Температура реакции во всех случаях была постоянной и составляла 22°C.

(а) Реакция с участием растворенной  $\beta$ -ксилазы

15 мкг ксилазы в 50 мкл рабочего буфера 2 добавляли к 50 мкл раствора субстрата. Концентрацию раствора субстрата варьировали в пределах от 0.1 до 2.6 мг·мл<sup>-1</sup>. Время реакции составляло 10 минут. Полученный гидролизат анализировали методом Сомоджи-Нельсона.

#### (б) Реакция с участием иммобилизованной $\beta$ -ксилазы

В случае иммобилизованной  $\beta$ -ксилазы каталитическую реакцию проводили в режиме рециркуляции. Для этого диск, с иммобилизованной  $\beta$ -ксилазой, устанавливали в хроматографическую систему низкого давления и предварительно уравнивали рабочим буфером 2. 3.0 мл раствора ксилана пропускали в режиме рециркуляции сквозь стационарную фазу в течение 10 минут при скорости потока  $0.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Концентрацию раствора субстрата варьировали в пределах от  $0.1$  до  $2.6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . После завершения реакции из реакционной среды отбирали аликвоту раствора объемом 100 мкл и проводили количественный анализ продуктов реакции по методу Сомоджи-Нельсона.

### 2.3.3.4. Эстераза

Реакции с участием эстеразы проводили при температуре  $37^\circ\text{C}$  в смеси ацетонитрила и  $0.01 \text{ M}$  фосфатного буфера, pH 7.4, взятых в соотношении 1/1 (рабочий буфер 3). В качестве субстрата использовали поли(молочную кислоту) (ПМК). Мониторинг каталитической реакции осуществляли посредством метода ВЭЖХ при использовании в качестве стационарной фазы макропористой монолитной колонки на основе сополимера додецилметакрилата с этилендиметакрилатом (С12) (см. п. 3.3.4.2). Долю деградации ПМК рассчитывали по уменьшению площади пика, отвечающего ПМК на хроматограммах.

#### (а) Реакция с участием растворенной эстеразы

К 50 мкл раствора ПМК в рабочем буфере 3 добавляли 50 мкл раствора эстеразы с концентрацией  $0.8 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Концентрацию субстрата варьировали в пределах от  $0.3$  до  $2.6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Время реакции составляло 5 часов.

#### (б) Реакция с участием иммобилизованной эстеразы

В случае иммобилизованного фермента реакцию деградации ПМК проводили в режиме рециркуляции. Диск с иммобилизованной эстеразой устанавливали в хроматографическую систему низкого давления и предварительно уравнивали рабочим буфером 3. 3.0 мл раствора ПМК пропускали в режиме рециркуляции сквозь слой гетерогенного биокатализатора в течение 5 часов при скорости потока  $1.0 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Концентрацию субстрата варьировали в пределах от  $0.3$  до  $2.6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ .

### 2.3.4. *Off-line* мониторинг образования продуктов деградации высокомолекулярных субстратов

Мониторинг продуктов гидролиза, отбираемых в процессе каталитических реакций, осуществляли методом ВЭЖХ с использованием в качестве стационарной фазы монолитных колонок или ультракоротких монолитных колонок (дисков), несущих необходимые функциональные группы.

### 2.3.4.1. Деграция высокомолекулярных субстратов

#### 2.3.4.1.1. Деграция полицитидиловой кислоты

##### (а) Реакция с участием растворенной РНКазы

К 90 мкл раствора субстрата с концентрацией  $0.25 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  добавляли 10 мкл раствора фермента, содержащего 1.0 мг рибонуклеазы А. Каталитическую реакцию проводили в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут. Реакцию гидролиза проводили при температуре  $22^\circ\text{C}$ . Останавливали процесс путем удаления фермента из реакционной среды методом ультрафильтрации.

##### (б) Реакция с участием иммобилизованной РНКазы

- Режим зонального элюирования

Колонку/диск, содержащую(ий) иммобилизованную РНКазу, устанавливали в хроматографическую систему низкого давления и предварительно уравнивали рабочим буферным раствором 1 в течение 15 минут. Фиксированное количество раствора субстрата, равное  $0.125 \text{ мг}$  вводили с помощью хроматографических петель на 100 или 500 мкл, для чего использовали растворы поли(С) с концентрацией  $1.25$  или  $0.25 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , соответственно. Реакцию гидролиза проводили при температуре  $22^\circ\text{C}$  при скорости потока подвижной фазы, равной  $0.1$ ,  $0.5$  и  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ . При скорости потока  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$  реакцию также проводили при температуре  $35^\circ\text{C}$ . Продукты каталитической реакции собирали и анализировали методом анионообменной ВЭЖХ.

- Режим рециркуляции

$3.0 \text{ мл}$  раствора субстрата пропускали в режиме рециркуляции через предварительно уравновешенную буфером 1 колонку с иммобилизованной РНКазой в течение 30 минут при скорости потока  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ . Концентрация раствора субстрата составляла  $0.25 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ .  $20 \text{ мкл}$  реакционной смеси отбирали каждые 3 минуты для мониторинга методом ВЭЖХ.

#### 2.3.4.1.2. Деграция РНК

##### (а) Реакция с участием растворенной РНКазы

Гидролиз в растворе проводили в течение различного времени, а именно 1, 3, 7 и 10 минут. Для проведения реакции гидролиза РНК использовали раствор РНК в рабочем буфере 1. Для этого в пробирки, содержащие  $0.5 \text{ мл}$  РНК с концентрацией  $0.1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  добавляли  $0.03 \text{ мл}$  РНКазы с концентрацией  $0.5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Каталитическую реакцию проводили в течение 1, 3, 7, и 10 минут, соответственно.

##### (б) Реакция с участием иммобилизованной РНКазы

Деграцию РНК проводили с использованием метода зонального элюирования. Перед использованием гетерогенный биокатализатор уравнивали рабочим буферным рас-



твором 1 в течение 15 минут. Для гидролиза использовали растворы РНК объемом 0.1, 0.5 и 1.0 мл, с концентрацией  $0.1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Скорость подачи раствора субстрата составляла 0.5 и  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ . Продукты каталитической реакции собирали для анализа методом анионообменной ВЭЖХ.

#### **2.3.4.1.3. Деградация РНК в многокомпонентной смеси**

##### **(а) Реакция с участием растворенной РНКазы**

В пробирки, содержащие 0.5 мл смеси, состоящей из БСА, ДНК и РНК в буферном растворе 1, добавляли 0.03 мл рибонуклеазы А с концентрацией  $0.5 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Содержание индивидуальных компонентов (БСА, ДНК и РНК) в смеси составляло 0.05 мг. Реакцию проводили в течение 10 минут.

##### **(б) Реакция с участием иммобилизованной РНКазы**

1.0 мл смеси, содержащей по 0.1 мг ДНК, РНК и БСА, пропускали через гетерогенный биокатализатор, предварительно уравновешенный в течение 15 минут буферным раствором 1. Скорость подачи раствора субстрата составляла  $0.5 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ . Элюат собирали в пробирку для последующего анализа методом ВЭЖХ.

#### **2.3.4.1.4. Деградация ксилана $\beta$ -ксиланазой**

##### **(а) Реакция с участием растворенной $\beta$ -ксиланазы**

0.5 мл раствора ксиланазы в рабочем буферном растворе 2 с концентрацией  $0.3 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  добавляли к 0.5 мл раствора ксилана в том же буфере с концентрацией  $1.0 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Каталитическую реакцию проводили в течение 5, 15, 30, 45 и 60 минут при температуре  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ .

##### **(б) Реакция с участием иммобилизованной $\beta$ -ксиланазы**

Колонку, содержащую иммобилизованный фермент, устанавливали в хроматографическую систему низкого давления и уравнивали рабочим буфером 2 в течение 15 минут. Далее 3.0 мл раствора ксилана пропускали в режиме рециркуляции сквозь гетерогенный биокатализатор в течение 60 минут при скорости потока  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ . Концентрация ксилана составляла  $1.0 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Реакцию проводили при температуре  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Каждые 5 минут из реакционной среды отбирали по 30 мкл реакционной смеси для ВЭЖХ мониторинга.

### 2.3.4.1.5. Дегградация ксилана $\beta$ -ксилозидазой

(а) Реакция с участием растворенной  $\beta$ -ксилозидазы

50 мкл  $\beta$ -ксилозидазы с концентрацией  $0.5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  добавляли к 0.95 мл раствора ксилана в рабочем буфере 2 с концентрацией  $1.0 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  и тщательно перемешивали. Каталитическую реакцию проводили в течение 150 минут в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Каждые 15 минут отбирали пробы объемом 20 мкл для ВЭЖХ анализа.

(б) Реакция с участием иммобилизованной  $\beta$ -ксилозидазы

Исследование дегградации ксилана с использованием гетерогенных биокатализаторов проводилось в режиме рециркуляции раствора субстрата. Для этого 3.0 мл раствора ксилана пропускали в режиме рециркуляции через предварительно уравновешенную соответствующим буферным раствором колонку с иммобилизованным ферментов в течение 150 минут при скорости потока  $1.0 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Реакцию проводили в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Концентрация субстрата составляла  $1.0 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Каждые 5 минут из реакционной среды отбирали по 30 мкл реакционной смеси для ВЭЖХ мониторинга.

### 2.3.4.1.6. Дегградация ксилана с помощью биферментной системы

Колонки/диски, содержащие иммобилизованные  $\beta$ -ксиланазу и  $\beta$ -ксилозидазу, были установлены в хроматографическую систему низкого давления последовательно. 3.0 мл раствора ксилана с концентрацией  $1.0 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  пропускали в режиме рециркуляции через два последовательно установленных гетерогенных биокатализатора в течение 20 минут. Каждые 5 минут из реакционной среды отбирали по 30 мкл реакционной смеси для ВЭЖХ-мониторинга.

### 2.3.4.1.7. Дегградация поли(молочной кислоты)

(а) Реакция с участием растворенных ферментов

Реакцию дегградации ПМК в растворе проводили с использованием различных ферментов, а именно липазы из *Candida rugosa*, липазы из поджелудочной железы крупного рогатого скота, панкреатической липазы человека и эстеразы из свиной печени. Во всех случаях к 360 мкл раствора ПМК, растворенной в рабочем буфере 3, добавляли 40 мкл фермента с концентрацией  $1.0 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . При использовании липазы из *Candida rugosa* был также приготовлен раствор с другим содержанием фермента. В частности, в раствор ПМК, объемом 200 мкл и концентрацией  $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , добавляли 200 мкл фермента с концентрацией  $2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Дополнительно, проводили реакцию дегградации ПМК в щелочной среде без участия ферментов. Во всех случаях температура реакции составляла  $37^\circ\text{C}$ . Пробы реакционной смеси объемом 20 мкл для ВЭЖХ анализа отбирали через 3, 8, 24, 48, 72 часа.

## (б) Реакция с участием иммобилизованной эстеразы

Эксперименты проводили в режиме рециркуляции 3.0 мл раствора ПМК сквозь макропористый диск, содержащий иммобилизованную эстеразу, при скорости потока 1.0 мл·мин<sup>-1</sup> и температуре 37°C. Концентрация субстрата составляла 0.5 мг·мл<sup>-1</sup>. Пробы реакционной смеси объемом 20 мкл для ВЭЖХ анализа отбирали через 7, 20, 42, 50, 72 часа.

**2.3.4.1.8. Деградация наночастиц на основе поли(молочной кислоты)**

## (а) Реакция с участием растворенной эстеразы

40 мкл эстеразы с концентрацией 0.4 мг·мл<sup>-1</sup> добавляли к 360 мкл раствора частиц на основе ПМК в 0.02 М натрий фосфатном буферном растворе (рН 7.4) (рабочий буфер 4) с содержанием частиц 0.2 мг и тщательно перемешивали. Каталитическую реакцию проводили в течение 60 дней в воздушном термостате при температуре 37°C. Пробы образующихся в ходе реакции продуктов отбирали посредством ультрафильтрации через мембрану (3000 Да) в течение 6 минут при 5000 об/мин и исследовали методом ВЭЖХ.

## (б) Реакция с участием иммобилизованной эстеразы

Сквозь диск, содержащий иммобилизованную эстеразу, в режиме рециркуляции пропускали 3.0 мл рабочего буферного раствора 4 с содержанием частиц 5.5 мг. Процесс деградации наночастиц проводили в течение 60 дней. Пробы образующихся в ходе реакции продуктов отбирали посредством ультрафильтрации через мембрану (3000 Да) в течение 6 минут при 5000 об/мин и исследовали методом ВЭЖХ.

## (в) Реакция в плазме крови

400 мкл плазмы, содержащей 0.2 мг частиц, инкубировали при 37°C в воздушном термостате в течение 60 дней. Пробы образующихся в ходе реакции продуктов отбирали посредством ультрафильтрации через мембрану (3000 Да) в течение 10 минут при 9000 об/мин и исследовали методом ВЭЖХ.

**2.3.4.2. ВЭЖХ-мониторинг**

С целью оценки эффективности использования гетерогенных биокаталитических систем для деградации высокомолекулярных субстратов были разработаны методы хроматографического мониторинга продуктов реакции.

- Поли(С)

Для анализа продуктов каталитической реакции применяли анионообменную хроматографию с использованием монолитных стационарных фаз. Коммерчески доступные монолитные ультракороткие колонки, а именно CIM DEAE диски, были выбраны в качестве сепарационных сред.

Аналитические процессы были реализованы в режиме линейного градиентного элюирования, т.е. при использовании линейного изменения концентрации соли в растворе А путем постепенного его разбавления раствором Б. В качестве раствора А использовали 0.02 М буфер Трис-НСl (рН 7.5). В качестве буфера для десорбции (раствор Б) использовали раствор 1М NaCl. Прибор оснащался петлей ввода пробы объемом 10 мкл. Анализ полицитидиловой кислоты и продуктов ее расщепления проводили с использованием линейного градиента соли (0–1 М NaCl) при скорости потока  $0.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$  в течение 30 минут. УФ-детектирование проводили при длине волны 260 нм.

- РНК

Для анализа продуктов каталитической деградации РНК также применяли анионообменную хроматографию с использованием монолитных стационарных фаз. Коммерчески доступные монолитные ультракороткие колонки, а именно CIM DEAE диски, были выбраны в качестве сепарационных сред.

Для хроматографического анализа продуктов деструкции РНК в качестве подвижной фазы был использован буферный раствор 0.02 М Трис-НСl (рН 7.5) (раствор А). Однако разделение фрагментов РНК осложнялось присутствием олигонуклеотидов различного состава и длины, которые обладают способностью агрегировать и тем самым влиять на качество анализа. В данной работе в качестве антиагрегационного агента использовали 7М раствор мочевины.

Для разделения применяли следующую систему элюентов: раствор А – 0.02 М Трис-НСl, рН 7.5, содержащий 7 М мочевины, раствор Б – 1 М NaCl в растворе А. Хроматографический анализ проводили в условиях линейного градиента элюента Б от 0 до 100% за 25 минут при скорости потока подвижной фазы  $1.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ . УФ-детектирование проводили при длине волны 260 нм.

- Ксилан

Продукты ферментативной деградации ксилана анализировали методом анионообменной ВЭЖХ. УФ-детектирование проводили при длине волны 220 нм. В качестве подвижной фазы для анализа использовали 0.02 М водный Na-ацетатный буфер (рН 5.0) (раствор А) и 2 М раствор хлорида натрия в качестве раствора Б. Хроматографическое разделение осуществляли в условиях линейного градиентного элюирования от 0 до 100% Б за 15 минут при скорости потока  $1.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

- ПМК

Детектирование ПМК осуществляли с помощью ВЭЖХ анализа с использованием в качестве стационарной фазы монолитной колонки на основе сополимера лаурилметакрилата с этилендиметакрилатом (С12). Детектирование проводили при длине волны 210 нм. В каче-

стве подвижной фазы использовали воду. Анализ ПМК осуществляли в условиях линейного градиента 100% ацетонитрила в воде в течение 20 минут.

- Частицы на основе ПМК

Для определения степени деградации частиц на основе ПМК был разработан метод детектирования молочной кислоты методом анионообменной ВЭЖХ при использовании в качестве стационарной фазы трех CIM QA дисков, последовательно установленных в специальный картридж-держатель. Определение молочной кислоты осуществляли в режиме линейного градиента соли (0 - 40% 1 М NaCl) при скорости потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup> в течение 8 минут. В качестве подвижной фазы использовали 0.005 М Na-ацетатный буфер (рН 4.0).

### **2.3.5. On-line мониторинг образования продуктов деградации высокомолекулярных субстратов**

#### **2.3.5.1. Хроматографический реактор на основе рибонуклеазы А**

Гетерогенный биокатализатор в форме колонки и анионообменный диск встраивались последовательно в хроматографическую систему с использованием короткого промежуточного капиллярного адаптера. Гетерогенный биокатализатор в форме диска устанавливали последовательно с сепарационным диском в один картридж-держатель.

- РНК

Деструкцию РНК проводили методом зонального введения пробы субстрата при скорости потока элюента 1.5 мл·мин<sup>-1</sup>. Ввод пробы осуществляли через капиллярную петлю объемом 500 мкл. В данном случае использовалось три буферных раствора, так как буферные системы, используемые для биокатализа и сепарации, имели различный состав: (1) 0.02 М Трис-НСl, рН 7.5, (раствор А); (2) раствор А, содержащий 7 М раствор мочевины (раствор Б), и (3) 1 М хлорид натрия в растворе Б (раствор В). Процесс биоконверсии с последующим мониторингом продуктов проводили в режиме линейного градиента по следующей программе: 0-5 мин – раствор А (гидролиз РНК), 5-10 мин – раствор Б (уравновешивание колонки буфером для ВЭЖХ анализа), 10-35 мин – 0-100% раствор В (ВЭЖХ анализ продуктов ферментативного гидролиза).

- Поли(С)

Так как буферные растворы для гидролиза высокомолекулярного субстрата поли(С) и анализа продуктов его деградации были одинаковы, процесс протекал в две стадии – (1) деструкция субстрата и (2) разделение продуктов методом градиентной анионообменной хроматографии. Процесс биоконверсии с последующим мониторингом продуктов проводили в режиме линейного градиента по следующей программе: 0-5 мин – элюент А (гидролиз поли-

цитидиловой кислоты), 5-35 мин – 0-100% элюент Б (ВЭЖХ анализ продуктов ферментативного гидролиза). Ввод пробы осуществляли через капиллярную петлю объемом 500 мкл.

### **2.3.5.2. Хроматографический реактор на основе комплекса ксиланолитических ферментов**

Диск с иммобилизованной  $\beta$ -ксиланазой и колонка с иммобилизованной  $\beta$ -ксилозидазой, а также аналитический DEAE диск были установлены последовательно в ВЭЖХ систему. Деграцию ксилана проводили методом зонального элюирования при скорости потока  $1.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Ввод пробы осуществляли с помощью петли объемом 1.0 мл. Так как рабочие буферы для каталитической реакции как для  $\beta$ -ксилаказы, так и для  $\beta$ -ксилозидазы и рабочий буфер для аналитического процесса имел одинаковый состав, *on-line* процесс проходил в два этапа, а именно: каталитическая реакция (0-5 мин - 100% элюент А) и ВЭЖХ анализ образующихся продуктов на DEAE диске (5-20 мин - 0-100 % элюент Б).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание высокоэффективных динамических биоконверсионных систем является одним из активно разрабатываемых направлений современной биотехнологии и биоинженерии. Как упоминалось ранее, использование гетерогенных биокатализаторов позволяет получать стабильные системы, обладающие широким спектром достоинств по сравнению с нативными ферментами. В связи с этим изучение закономерностей поведения иммобилизованных ферментов, осуществляющих каталитическую функцию, является, несомненно, актуальной задачей. Развитие данного направления тесно связано с внедрением новых типов носителей и методов иммобилизации, которые позволили бы перейти к созданию высокоэффективных гетерогенных биокатализаторов.

#### 3.1. Получение макропористых монолитных носителей для иммобилизации ферментов

Успешное применение макропористых монолитных носителей на основе полиметакрилатных сополимеров в динамических сепарационных процессах позволило сделать заключение о возможности использования данного типа материалов для конструирования биоконверсионных, а также хроматографических реакторов, позволяющих объединять стадии биокатализа и *on-line* анализа получаемых продуктов. Ключевой особенностью динамических процессов с использованием макропористых монолитных матриц является конвективный механизм массопереноса. Кроме того, к несомненным достоинствам монолитных матриц на основе полиметакрилатных сополимеров можно отнести механическую и химическую стабильность, а также возможность синтеза данных материалов в различных геометрических форматах, а именно в форме дисков, колонок и трубок. В настоящее время данный тип носителей в форме дисков выпускается фирмой VIA Separations (Словения) в качестве хроматографических стационарных фаз различной функциональности.

Вследствие упомянутых положительных особенностей макропористых монолитных материалов в данной работе была получена серия монолитных колонок, характеризующихся различным составом мономеров и средним размером пор, а также проведено сравнение гетерогенных биокатализаторов на основе полученных колонок с таковыми на основе коммерчески доступных дисков (Рисунок 23). Коммерчески доступные макропористые монолитные диски, содержащие эпоксидные группы, представляют собой сильно-сшитый сополимер глицидилметакрилата (ГМА) с этиленгликольдиметакрилатом (ЭДМА).

Для синтеза макропористых монолитных колонок в представляемой работе были выбраны следующие мономеры и сшивающие агенты: глицидилметакрилат,

2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА), этиленгликольдиметакрилат и глицерин-1,3-диметакрилат (ГДМА). Структурные формулы мономеров представлены на Рисунке 24.

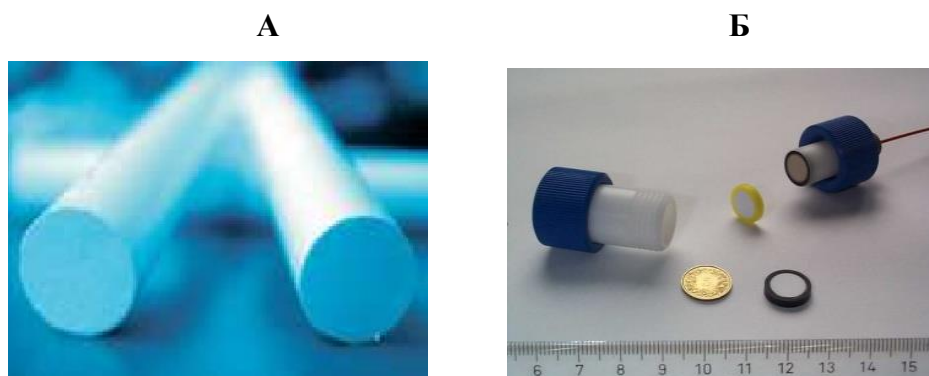


Рисунок 23 – Фотографии монолитных носителей, использованных для иммобилизации ферментов.

*A* – монолитные колонки без металлического картриджа, *B* – СИМ диски и картридж-держатель (BIA Separations).

Выбор ГЭМА и ГДМА мономеров по сравнению с коммерческим материалом обусловлен содержанием в их структуре дополнительных гидроксильных групп, обеспечивающие большую гидрофилизацию поверхности получаемого материала. В случае ферментов, катализирующих реакции в водных средах, гидрофилизация поверхности способствует лучшей сольватации белков на поверхности, что облегчает их взаимодействие с поверхностью в процессе иммобилизации и способствует закреплению правильной (активной) конформации. Как следствие, активность иммобилизованного фермента должна максимально сохраняться.

Таким образом, задачей данного этапа являлось получение проточных полиметакрилатных макропористых монолитных материалов на основе следующих сополимеров: (1) ГМА-ЭДМА, (2) ГМА-ГЭМА-ЭДМА и (3) ГМА-ГДМА. Синтез этих материалов проводили методом радикальной полимеризации *in situ* в колонках-картриджах из нержавеющей стали диаметром 4.6 мм и длиной 50 мм.

Как упоминалось в Обзоре литературы, помимо мономеров и инициатора полимеризационная смесь должна включать также порогенные растворители, которые образуют гомогенную систему с мономерами и инициатором, но термодинамически несовместимы с образующимся в ходе полимеризации полимером, вследствие чего происходит процесс разделения фаз и формирование макропористой структуры образующегося материала. В качестве порогенов для синтезируемых систем были выбраны достаточно широко применяемые в синтезе полиметакрилатных макропористых материалов растворители, такие как додеканол, циклогексанол и толуол. Структурные формулы используемых порообразующих агентов приведены на Рисунке 25. Из литературных данных известно, что при использовании додеканол-содержащих систем как порогенов в синтезе ГМА-содержащих полимерных материа-



лов соотношение порога/мономеры = 60/40 позволяет получать макропористые материалы оптимальной структуры с точки зрения соотношения размера пор и площади поверхности [88].

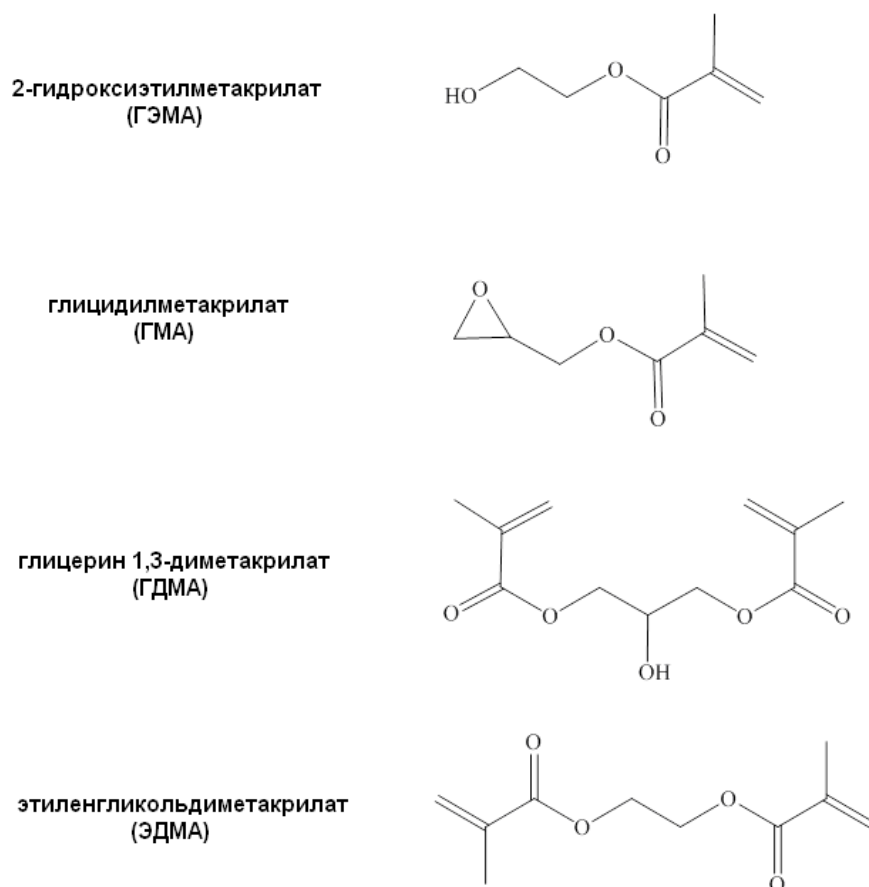


Рисунок 24 – Структурные формулы мономеров, используемых для приготовления монолитных матриц.

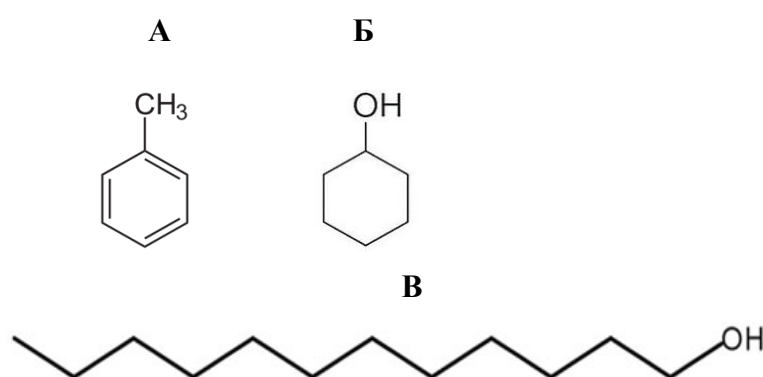
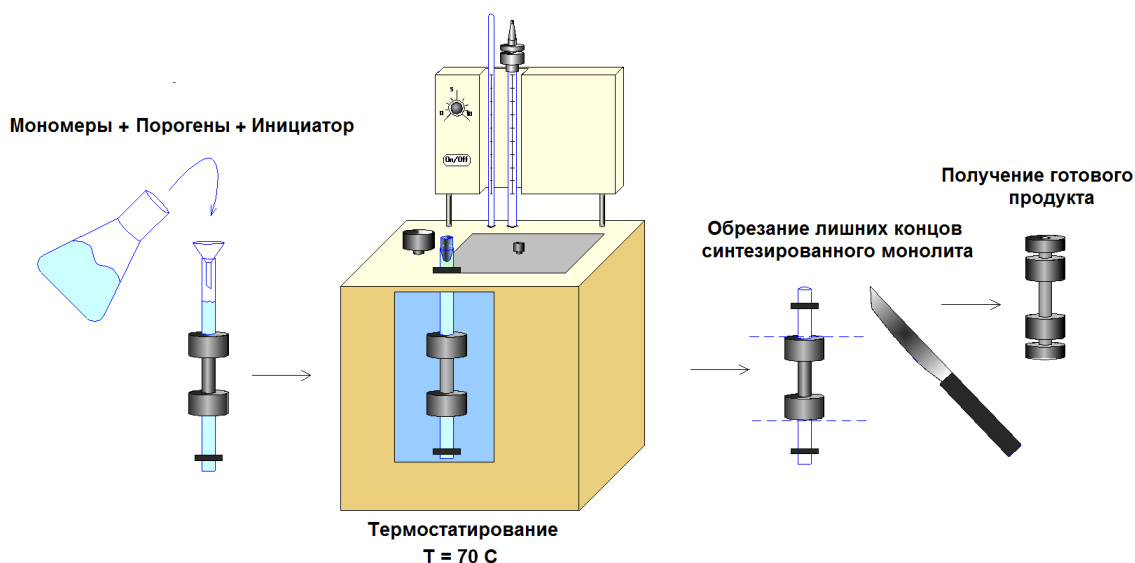


Рисунок 25 – Структурные формулы порогенов, использованных для приготовления монолитных матриц: *A* – толуол, *Б* – циклогексанол, *B* – додеканол.

Подробный состав полимеризационных смесей приведен в Таблицах 1-3 для сополимеров ГМА-ЭДМА, ГМА-ГЭМА-ЭДМА и ГМА-ГДМА, соответственно. Схема синтеза обсуждаемых материалов представлена на Рисунке 26.

Известно, что при реализации динамических процессов средний размер пор может влиять на проницаемость стационарной фазы, а, следовательно, на величину обратного давления в системе. Также, чем выше средний размер пор, тем большие скорости подвижной фазы можно использовать для проведения процесса. С другой стороны увеличение среднего размера пор ведет к уменьшению удельной площади поверхности. В адсорбционных видах хроматографии данный параметр является одним из ключевых, влияющих на сорбционную емкость стационарной фазы. Однако в случае гетерогенного биокатализа, не предполагающего адсорбцию веществ на поверхности, данный параметр не играет такой существенной роли. В то же время достаточно большой размер пор, обеспечивающий незатрудненное взаимодействие субстрата с иммобилизованным ферментом и быстрое удаление продуктов реакции, а также высокую производительность за счет применения высоких скоростей подвижной фазы, имеет огромное значение. В связи с этим, получение носителей с размером пор ниже 300 нм в данной работе не представлялось целесообразным.

А



Б

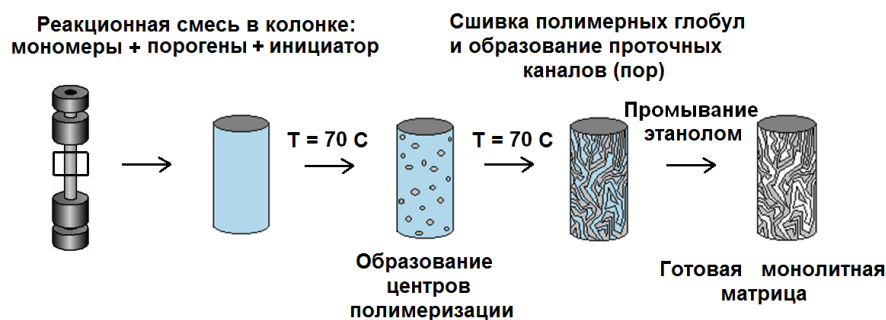


Рисунок 26 – Схемы синтеза макропористых монолитных колонок: А – техническая схема; Б – схема образования макропористых полимерных монолитов.

Для реализации направленного формирования поровой структуры, оптимальной для проведения как иммобилизации, так и биоконверсии, было исследовано влияние параметров термоиницируемой полимеризации на поровые характеристики получаемых полимерных матриц. В качестве инициатора процесса полимеризации был использован 2,2-азо-бис-изобутиронитрил (АИБН). Распад инициатора на свободные радикалы протекает в интервале температур 50-70°C по схеме, представленной на Рисунке 27. Проведение полимеризации при температурах ниже 60°C сопряжено с медленным распадом инициатора и, как следствие, скорость реакции полимеризации также невысока. При повышении температуры более 60°C скорость распада инициатора возрастает, что способствует росту количества свободных радикалов в единицу времени и, следовательно, увеличению скорости реакции полимеризации. В связи с этим в данной работе полимеризацию проводили при 70°C.

Как известно из литературных данных, максимальный выход полимеров на основе ГМА-ЭДМА с удовлетворительной поровой структурой, как правило, достигается при концентрации инициатора 0.8 – 1.0 масс.% [215]. Увеличение концентрации инициатора приводило к значительному возрастанию скорости полимеризации, что, в свою очередь, способствовало формированию неоднородной структуры материала с ухудшенными гидродинамическими характеристиками. При этом выход сополимера существенно не зависел от концентрации инициатора. По этой причине в данной работе концентрация инициатора была выбрана постоянной и составляла 1 масс.% от массы мономеров.

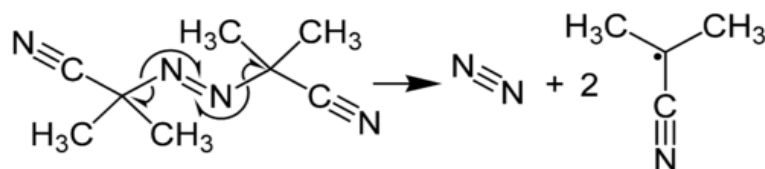


Рисунок 27 – Схема распада на радикалы инициатора (2,2-азо-бис-изобутиронитрил), используемого для приготовления монолитных матриц.

В ходе предварительных экспериментов было установлено, что формирование монолитного полимерного материала достигалось уже спустя 5-6 часов после начала полимеризации, в то время как максимальный выход для двойных сополимеров достигался через 8-10 часов протекания процесса, а для тройных – через 12 часов. Таким образом, для более детального изучения было выбрано время полимеризации равное 8 и 12 часам.

Для каждого вида сополимера были получены серии образцов, поровые характеристики которых были рассчитаны на основании данных гидродинамической проницаемости. Согласно теории, где монолитная матрица рассматривается как система проточных капилляров, проницаемость для монолитов может вычисляться по формуле (20), выведенной из за-

кона Пуазеля-Дарси [98]. На основе значений проницаемости средний размер пор и пористость синтезированных материалов рассчитывали по уравнениям (21) и (22), приведенным в Обзоре литературы.

При получении сополимера ГМА-ЭДМА, по аналогии с опубликованными данными, в качестве порообразующих веществ были использованы циклогексанол и додеканол [86] (Таблица 5). Было установлено, что использование стандартной системы порогенов позволяло получить образцы материала со средним размером пор от 600 до 880 нм. На примере синтеза данного сополимера было показано влияние времени проведения полимеризации на поровые характеристики получаемого материала. Так, при увеличении времени полимеризации с 8 до 12 часов наблюдалось уменьшение среднего размера пор с 880 до 780 нм и значения пористости с 64 до 55%, что является следствием увеличения степени сшивки микроглобул сополимера, а значит их более плотной упаковки в монолитном каркасе.

Таблица 5 – Поровые характеристики образцов материала, полученных на основе сополимера ГМА-ЭДМА

Образец	Проницаемость, $\frac{2}{\text{м}}$	Общая пористость, %	Средний размер пор*, нм
М <sub>Э1</sub>	$0.8 \times 10^{-14}$	65	$630 \pm 20$
М <sub>Э2</sub>	$1.5 \times 10^{-14}$	64	$880 \pm 30$
М <sub>Э3</sub>	$1.1 \times 10^{-14}$	55	$780 \pm 20$

\*Значение рассчитано по данным трех измерений.

С целью получения новых гидрофильных макропористых материалов на основе сополимеров ГМА-ГЭМА-ЭДМА и ГМА-ГДМА в качестве порогенных растворителей кроме додеканола и циклогексанола, использовали также толуол (Таблицы 6 и 7). Использование в качестве порообразующего агента только додеканола при получении материалов на основе сополимеров ГМА-ГЭМА-ЭДМА и ГМА-ГДМА приводило к формированию макропористых носителей со средним размером пор и пористостью равными, соответственно, 800 нм и 66% для тройного сополимера (образец М<sub>ГЭ1</sub>) и 490 нм и 57% для двойного сополимера (образец М<sub>Г1</sub>) при использовании одинакового времени полимеризации (8 часов). Скорее всего, полученный результат может быть объяснен различной кинетикой полимеризации тройного и двойного сополимеров, и, как следствие, различной скоростью фазового разделения, что приводит к формированию материалов с различной степенью сшивки микроглобул сополимера и, как следствие, к их различной упаковке в структуре конечного монолитного материала и различным поровым характеристикам.

Как и в случае получения материалов на основе сополимера ГМА-ЭДМА, для более гидрофильных материалов также была подтверждена тенденция к уменьшению среднего размера пор и пористости при увеличении времени полимеризации (образцы М<sub>ГЭ2</sub> и М<sub>Г2</sub> – полимеризация в течение 8 часов, образцы М<sub>ГЭ3</sub> и М<sub>Г3</sub> – полимеризация в течение 12 часов).

Как уже упоминалось выше, использование только додеканола в качестве порогена при получении материалов на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА приводило к образованию носителя со средним размером пор 800 нм (образец М<sub>ГЭ1</sub>). При этом введение циклогексанола в полимеризационную смесь практически не оказывало влияния на величину среднего размера пор (образцы М<sub>ГЭ2</sub> и М<sub>ГЭ3</sub>). Использование толуола в качестве сопорогена приводило к значительному увеличению среднего размера пор получаемых макропористых материалов, что свидетельствует о том, что добавление толуола в реакционную смесь повышает термодинамическую несовместимость системы в процессе полимеризации. В свою очередь, локальная концентрация мономеров в растущих ядрах возрастает в присутствии толуола по сравнению с использованием додеканола и циклогексанола, что приводит к формированию микроглобул большего размера и, следовательно, больших расстояний между ними (макропор). Как и ожидалось, увеличение доли толуола за счет уменьшения доли додеканола при постоянном количестве циклогексанола в смеси способствовало увеличению значения среднего размера пор (образцы М<sub>ГЭ6</sub> и М<sub>ГЭ7</sub>). Аналогичная тенденция наблюдалась при увеличении доли толуола за счет уменьшения доли циклогексанола при постоянном количестве додеканола (образцы М<sub>ГЭ7</sub> и М<sub>ГЭ8</sub>).

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 (Таблица 7). Влияние этих веществ, взятых в различном соотношении, на характеристики полученных полимерных образцов имело такую же тенденцию, как и в случае синтеза сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА.

Для некоторых образцов поровые характеристики, определенные из данных гидродинамической проницаемости, сравнивали с показателями, полученными методом интрузионной ртутной порометрии. Для этого из числа синтезированных сополимеров были выбраны несколько образцов, обладающих удовлетворительными характеристиками для реализации процессов иммобилизации фермента и последующей биоконверсии с участием низкомолекулярных субстратов, а именно образцы М<sub>Э1</sub>, М<sub>ГЭ3</sub> и М<sub>Г6</sub>.

В случаях, когда не только фермент, но и субстрат представлял собой высокомолекулярное соединение, для минимизации стерических затруднений при внутривидовых взаимодействиях между компонентами представлялось целесообразным использовать колонки с

проточными порами большего размера (не менее 1 мкм). В связи с этим, образцы МГЭ7 и МГЭ9 также были отобраны для дальнейшего исследования.

Таблица 6 – Поровые характеристики образцов материала, полученных на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА

Образец	Проницаемость, $\frac{2}{\text{м}}$	Общая пористость, %	Средний размер пор *, нм
МГЭ1	$1.3 \times 10^{-14}$	66	$800 \pm 35$
МГЭ2	$1.5 \times 10^{-14}$	58	$920 \pm 30$
МГЭ3	$1.8 \times 10^{-14}$	60	$710 \pm 15$
МГЭ4	$3.7 \times 10^{-14}$	77	$1240 \pm 20$
МГЭ5	$4.6 \times 10^{-14}$	86	$1310 \pm 20$
МГЭ6	$3.7 \times 10^{-14}$	60	$1410 \pm 35$
МГЭ7	$3.1 \times 10^{-14}$	59	$1290 \pm 30$
МГЭ8	$4.6 \times 10^{-14}$	65	$1510 \pm 20$
МГЭ9	$4.6 \times 10^{-14}$	51	$1700 \pm 35$
МГЭ10	$2.1 \times 10^{-14}$	72	$960 \pm 20$
МГЭ11	$2.6 \times 10^{-14}$	63	$1160 \pm 30$
МГЭ12	$3.7 \times 10^{-14}$	56	$1450 \pm 30$
МГЭ13	$2.7 \times 10^{-14}$	57	$1220 \pm 35$

\*Значение рассчитано по данным трех измерений.

Таблица 7 – Поровые характеристики образцов материала, полученных на основе сополимера ГМА-ГДМА

Образец	Проницаемость, $\frac{2}{\text{м}}$	Общая пористость, %	Средний размер пор *, нм
МГ1	$0.4 \times 10^{-14}$	57	$490 \pm 20$
МГ2	$0.4 \times 10^{-14}$	47	$550 \pm 20$
МГ3	$0.3 \times 10^{-14}$	77	$340 \pm 20$
МГ4	$0.5 \times 10^{-14}$	58	$520 \pm 25$
МГ5	$0.7 \times 10^{-14}$	65	$570 \pm 20$
МГ6	$1.2 \times 10^{-14}$	67	$660 \pm 30$
МГ7	$1.5 \times 10^{-14}$	69	$840 \pm 30$

\*Значение рассчитано по данным трех измерений.

В Таблице 8 представлены результаты определения среднего размера пор и пористости, полученные по данным гидродинамической проницаемости и методом интрузионной ртутной порометрии, для 5 выбранных образцов. Характеристики, полученные двумя методами, практически полностью совпадали, что подтверждает достоверность определения поровых характеристик для монолитов в форме колонок по данным гидродинамической проницаемости.

Таблица 8 – Сравнение поровых характеристик образцов, определенных различными методами

Монолитный материал	Расчет по данным гидродинамической проницаемости		Метод интрузионной ртутной порометрии	
	Средний размер пор, нм	Пористость, %	Средний размер пор, нм	Пористость, %
МЭ1	630	65	625	65
МГЭ3	710	60	650	65
МГ6	660	67	610	68
МГЭ7	1290	59	1200	60
МГЭ9	1700	51	1620	57

Согласно данным интрузионной ртутной порометрии, образцы МЭ1, МГЭ3, МГ6, МГЭ7 и МГЭ9 характеризовались узким распределением пор по размерам. В качестве иллюстрации на Рисунке 28 представлены порограммы, полученные для образцов материала на основе сополимеров (А) ГМА-ЭДМА (образец МЭ1) и (Б) ГМА-ГЭМА-ЭДМА (образец МГЭ7).

Анализ морфологии и однородности поверхности проводили методом растровой электронной микроскопии. Из приведенных на Рисунке 29 микрофотографий поверхности, полученных для макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА, очевидно, что материалы имели одинаковую морфологию поверхности и однородную структуру, что крайне важно при использовании подобных носителей в качестве стационарных фаз в любых динамических процессах. Кроме того, как и ожидалось, увеличение добавление толуола (сравн. образцы МГЭ3 и МГЭ7) и увеличение его доли (сравн. образцы МГЭ7 и МГЭ9) приводило к увеличению размера микроглобул вследствие более быстрого фазового разделения.

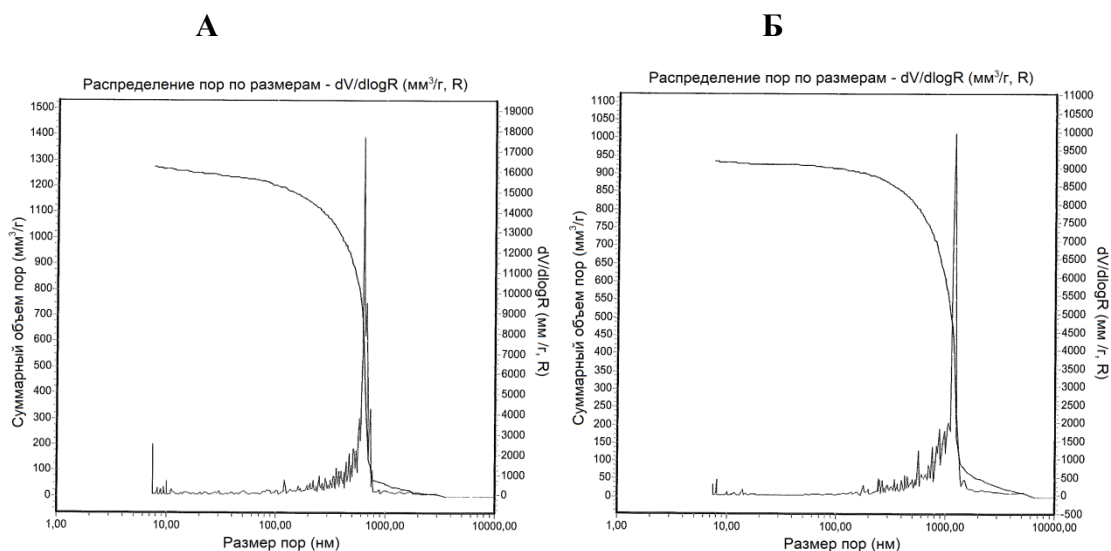


Рисунок 28 – Порограммы, полученные методом интрузионной ртутной порометрии, для макропористых монокристаллических материалов на основе сополимеров: *A* – ГМА-ЭДМА (образец МЭ1), *B* – ГМА-ГЭМА-ЭДМА (образец МГЭ7).

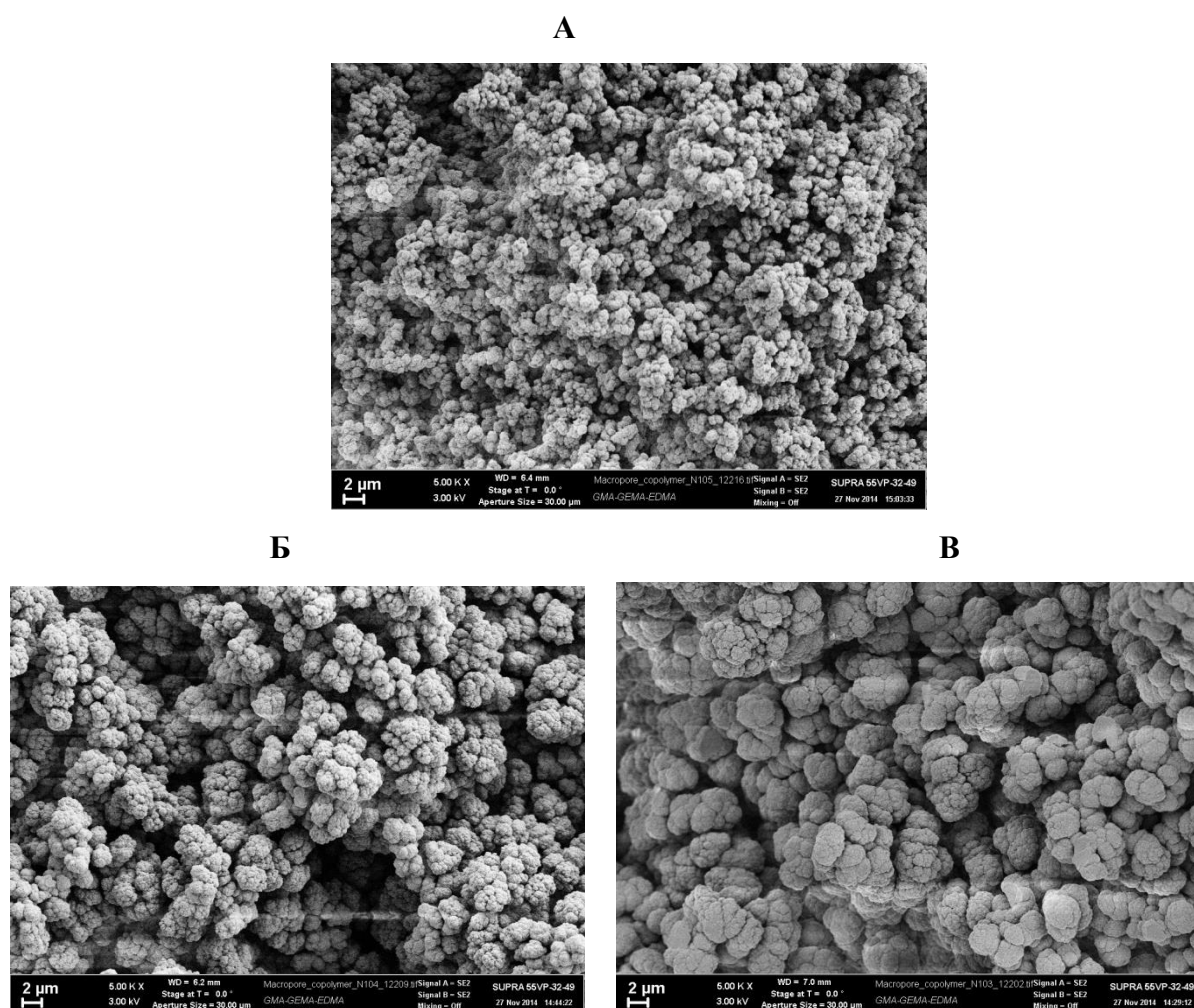


Рисунок 29 – Микрофотографии образцов макропористых монокристаллических материалов на основе сополимеров ГМА-ГЭМА-ЭДМА: *A* – МГЭ3; *B* – МГЭ7 и *V* – МГЭ9.



Для сравнения влияния геометрии стационарной фазы на эффективность получаемого гетерогенного биокатализатора в работе также были использованы коммерческие макропористые монолитные диски (диаметр > длина) на основе сополимера ГМА-ЭДМА (VIA Separations, Словения). Сравнимые колонки и диски имели сопоставимые поровые характеристики, но различались по объему стационарной фазы и геометрии носителя (Таблица 9).

Таблица 9 – Сравнение характеристик коммерческих и синтезированных макропористых монолитных носителей

Характеристики стационарной фазы	Формат стационарной фазы	
	СІМ Ероху диск	колонка
Диаметр, мм	12.0	4.6
Длина, мм	3	50
Средний размер пор, нм	1600	1300
Пористость, %	60	62
Объем колонки, мл	0.34	0.84
Объем пор, мл	0.20	0.52

Как известно, макропористые монолитные материалы характеризуются высокой механической стабильностью, что является несомненным преимуществом при использовании данных носителей в динамических процессах в условиях высоких скоростей потока подвижной фазы. Так, в зависимости от геометрических размеров монолитные матрицы выдерживают скорости потока  $25 \text{ см} \cdot \text{мин}^{-1}$  и более без каких-либо структурных изменений. В то же время увеличение скорости потока подвижной фазы при использовании колонок, упакованных дисперсными частицами, связано со значительным ростом обратного давления, и, как следствие, усадкой слоя сорбента.

Для исследования механической стабильности все используемые для дальнейшей работы монолитные колонки и коммерческие диски были протестированы на сопротивление потоку при различных скоростях потока подвижной фазы. В качестве иллюстрации на Рисунке 30 приведены зависимости давления ( $P$ ) от скорости потока подвижной фазы ( $V$ ) для монолитных колонок, полученных на основе различных сополимеров со средним размером пор  $\sim 600 \text{ нм}$  каждая, и для коммерческих монолитных дисков (средний размер пор  $1600 \text{ нм}$ ). Для всех образцов графики сохраняли линейность в широком ряду скоростей потока подвижной фазы, что подтверждает механическую стабильность и отсутствие сжимаемости полученных стационарных фаз.

Таким образом, приведенные в данной главе результаты показывают, что поровые характеристики полимерных носителей монолитного типа могут с успехом регулироваться на стадии получения материала путем вариации условий проведения синтеза. При этом выбор

системы используемых порогенных растворителей является наиболее важным фактором, позволяющим получать материалы с заданным размером пор и пористостью.

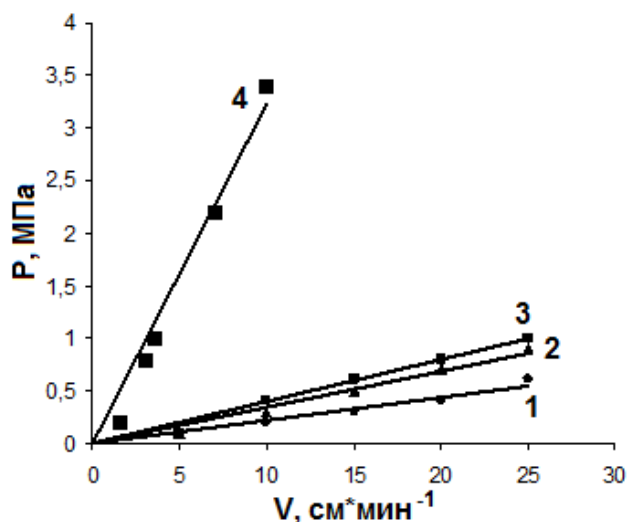


Рисунок 30 – Зависимости обратного давления от скорости потока подвижной фазы (вода) для колонок на основе сополимеров (1) ГМА-ЭДМА, (2) ГМА-ГДМА, (3) ГМА-ГЭМА-ЭДМА и (4) коммерческого СМ Ероху диска.

### 3.2. Получение макропористых монолитных стационарных фаз для хроматографического анализа

Использование монолитных макропористых сорбентов в качестве стационарных фаз для ВЭЖХ дает возможность реализации высокоскоростных процессов анализа различных веществ при сохранении эффективности разделения. В связи с этим синтез стационарных фаз для осуществления различных хроматографических процессов также является актуальной задачей.

В данной работе для хроматографии поли(молочной кислоты) была специально разработана колонка, содержащая гидрофобные функциональные группы C12, а именно колонка на основе сополимера лаурилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом (ЛМА-ЭДМА). Хроматографические колонки на основе сополимера ЛМА-ЭДМА могут применяться в широком ряду процессов ВЭЖХ, посвященных разделению и определению различных органических соединений в многокомпонентных смесях, таких как биожидкости, пищевые продукты, предполагающих использование обращенно-фазового или нормально-фазового варианта высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Синтез макропористых монолитных колонок на основе сополимера ЛМА-ЭДМА осуществляли также методом свободнорадикальной полимеризации в колонках-картриджах из нержавеющей стали размером 4.6 мм × 50 мм. Сополимеризацию выбранных мономеров ЛМА/ЭДМА в соотношении 50:50 об.% проводили при постоянной температуре 70°C. В ка-

честве инициатора также использовали АИБН в количестве равном 1 масс.% от массы мономеров.

В случае синтеза хроматографических стационарных фаз морфология поверхности получаемого материала играет наиболее важную роль. Как уже упоминалось, одним из ключевых моментов при получении макропористых монолитов является создание материалов с так называемой «компромиссной» поровой структурой, когда получаемая матрица обладает достаточно большими порами для реализации высокоскоростных динамических процессов и в то же время приемлемой удельной площадью поверхности, от которой зависит адсорбционная емкость сорбента.

Роль порогенов в данном случае выполняли 1,4-бутандиол и 1-пропанол. Согласно литературным данным, данная система порогенов была весьма эффективна в синтезе гидрофобных сополимеров, в частности, на основе бутилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата [216]. С целью оптимизации поровой структуры сорбентов на основе сополимеров ЛМА-ЭДМА варьировали соотношение порогенов в реакционной смеси и время полимеризации (Таблица 10). Было показано, что при синтезе данных макропористых монолитов увеличение содержания 1,4-бутандиола в качестве порогена в реакционной смеси благоприятствовало увеличению размеров пор синтезируемых материалов (М<sub>Л3</sub> и М<sub>Л6</sub>). При этом присутствие небольшого количества 1,4-бутандиола способствовало формированию мелких пор (М<sub>Л1</sub> и М<sub>Л4</sub>), что делало данные материалы непригодными для дальнейшего использования.

Таблица 10 – Поровые характеристики образцов материала, полученных на основе сополимера ЛМА-ЭДМА

№ образца	Средний размер пор (ИРП), нм	Удельная площадь поверхности, м <sup>2</sup> ·г <sup>-1</sup>
М <sub>Л1</sub>	90± 5	120
М <sub>Л2</sub>	590 ± 35	41
М <sub>Л3</sub>	2500± 150	31
М <sub>Л4</sub>	80 ± 5	150
М <sub>Л5</sub>	600 ± 40	38
М <sub>Л6</sub>	2500± 140	50

Увеличение времени полимеризации от 4 до 10 часов не оказывало существенного влияния на средний размер пор получаемых образцов. Однако было показано, что сокращение времени полимеризации значительно ухудшало механические характеристики получаемых образцов. Прочность их была не высока, в результате чего в процессе работы (особенно

при использовании высоких скоростей потока подвижной фазы) происходило значительное продольное сжатие слоя сорбента.

Таким образом, в данной работе для синтеза хроматографического сорбента на основе сополимера ЛМА-ЭДМА было использовано оптимальное соотношение порообразующих растворителей для данной системы, а именно 1,4-бутандиол:1-пропанол = 4:6 и время полимеризации в течение 10 часов.

С учетом того, что сорбент М<sub>Лб</sub> планировалось использовать в ВЭЖХ, на Рисунке 31 представлены зависимости давления в хроматографической системе от скорости потока подвижных фаз с различной вязкостью (изопропанола и тетрагидрофурана). Аналогичный эксперимент был проведен для коммерческого монолитного диска (СИМ Диск С4, диаметром 5 мм и длиной 5 мм). Как и ожидалось, все полученные зависимости, как для коммерческого, так и для оптимального синтезированного сорбента (образец М<sub>Лб</sub>) были линейными в широком диапазоне используемых скоростей потока подвижных фаз, что в свою очередь доказывает оптимальные механические характеристики получаемых макропористых монолитных стационарных фаз.

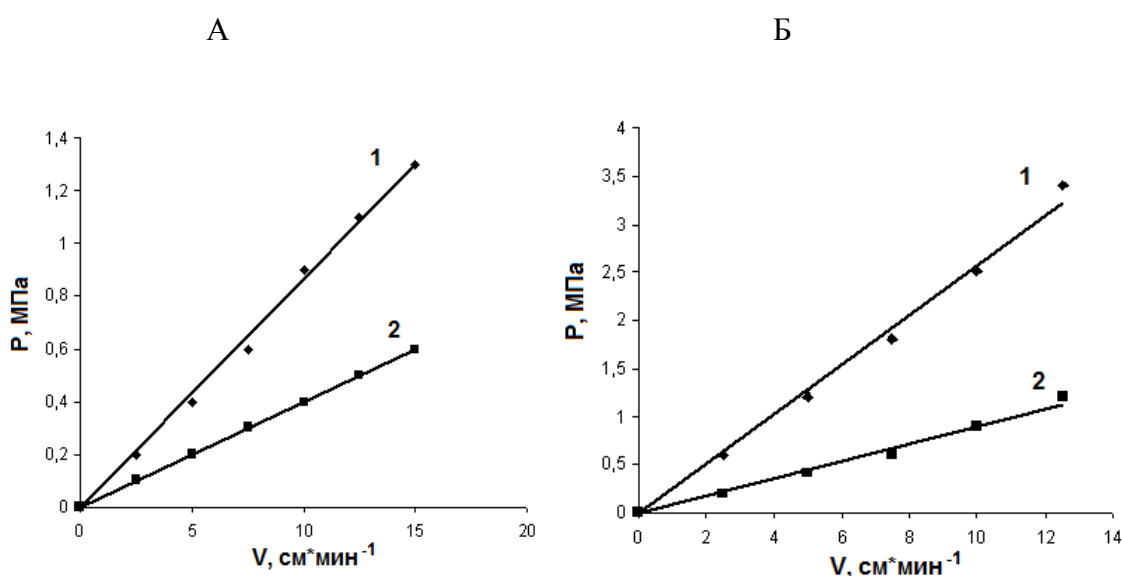


Рисунок 31 – Зависимости обратного давления от скорости потока подвижной фазы: А – тетрагидрофуран, Б – изопропанол для колонок на основе сополимера ЛМА-ЭДМА (образец М<sub>Лб</sub>) (1) и коммерческого СИМ С4 диска (2).

Кроме того, образец полученного материала был исследован методами растровой электронной микроскопии и интрузионной ртутной порометрии (Рисунок 32). Было установлено, что синтезированный материал имел однородную структуру, а также достаточно узкое распределение пор по размерам. Для образца М<sub>Лб</sub> общая пористость и средний размер пор, определенные различными методами, практически совпадали.

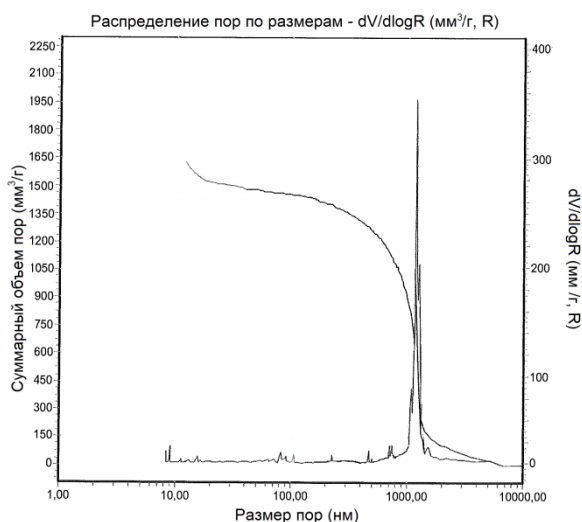


Рисунок 32 – Порограмма, полученная методом интрузионной ртутной порометрии, для макропористых монолитного материала на основе сополимера ЛМА-ЭДМА (образец М<sub>ДБ</sub>).

Таким образом, было показано, что полученная на основе сополимера ЛМА-ЭДМА хроматографическая колонка обладала узким распределением пор по размерам, гомогенной морфологией, необходимым размером пор и механической прочностью и может быть успешно применена в качестве стационарной фазы в ВЭЖХ анализе.

### 3.3. Иммобилизация ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей

Данный этап работы посвящен созданию гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных материалов, несущих на своей поверхности различные гидролитические ферменты, такие как рибонуклеаза А,  $\beta$ -ксилаза,  $\beta$ -ксилозидаза и эстераза.

Как уже упоминалось, монолитные материалы на основе сополимера ГМА-ЭДМА наиболее хорошо изучены и условия иммобилизации белков на его поверхности были оптимизированы ранее. Так, известно, что в результате реакции между аминогруппами биомолекулы и эпоксидными группами сорбента максимальное количество белка связывается примерно через 16-20 часов проведения реакции при pH 9.4 и температуре 37°C [217]. Протекание реакции с участием именно эпоксидной, а не сложноэфирной группы, подтверждено ранее методом ИК-спектроскопии [218], [219]. В частности, о протекании реакции аминирования судили по исчезновению характеристических полос поглощения эпоксидной группы и появлению полос поглощения амино- и гидроксильных групп. Наличие эпоксидных групп в составе сополимеров ГМА-ГДМА и ГМА-ГЭМА-ЭДМА позволяет использовать тот же механизм иммобилизации белковых молекул на поверхности выбранных материалов.

Известно, что иммобилизация может приводить к значительному снижению ферментативной активности [21]. Наряду со стерическими и диффузионными ограничениями,

накладываемыми твердой поверхностью на доступность активного центра биокатализатора, существенную роль также играет микроокружение иммобилизованного фермента, определяемое свойствами материала-носителя. Влияние твердой матрицы на активность фермента может быть минимизировано за счет введения промежуточного спейсера, который позволит дистанцировать молекулу фермента от поверхности твердой фазы и, вместе с тем, обеспечить дополнительную доступность активного центра биомолекулы. Использование в качестве спейсеров высокомолекулярных соединений, содержащих достаточное количество реакционно-способных групп, позволяет стабилизировать конформацию фермента за счет многоточечного связывания, что, в свою очередь, позволяет максимально снизить потери его активности. Более того, по сравнению с низкомолекулярными спейсерами, высокомолекулярные позволяют значительно удалить биомолекулу от поверхности твердой фазы, приблизив ее состояние к состоянию в растворе.

Таким образом, иммобилизацию 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.

В качестве высокомолекулярного спейсера в данной работе был выбран синтетический полимер класса винилсахаридов, а именно окисленный полимер 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы (ок.-пМАГ) с молекулярной массой 25000. Выбранный спейсер представляет собой водорастворимый и биосовместимый полимер, альдегидные группы в котором были получены путем частичного окисления боковых звеньев глюкозы периодатом натрия. Схема окисления пМАГ и структура используемого полимерного спейсера представлена на Рисунке 33.

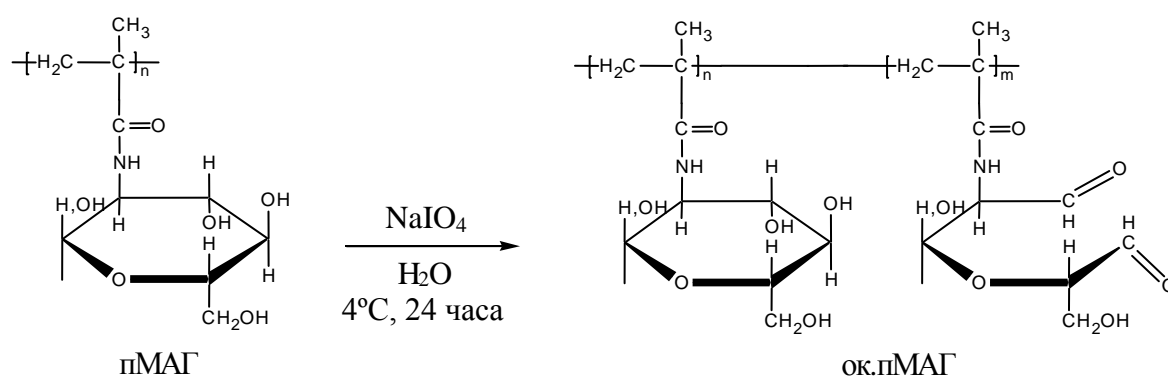


Рисунок 33 – Схема окисления и структура окисленной поли(2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы).

Для оценки количества реакционных групп, введенных в структуру полимера, был использован фотометрический метод, основанный на измерении оптической плотности окрашенных продуктов реакции альдегидных групп с реактивом Шиффа. Согласно результатам количественного анализа, содержание альдегидных групп в полимерном образце составило  $29 \pm 3\%$ . Высокая реакционная способность альдегидных групп позволяет осуществлять быстрое ковалентное связывание амино-содержащих лигандов, например, ферментов, в мягких условиях с единственным побочным продуктом, которым является вода. Кроме того, наличие сахаридных остатков в боковой цепи полимера способствует формированию микроокружения фермента, близкого к природной среде.

Схемы реакций иммобилизации фермента представлены на Рисунке 34. В отличие от прямого метода иммобилизации, метод иммобилизации через спейсер включал несколько стадий, а именно, аминирование эпоксидных групп носителя, ковалентное присоединение альдегид-содержащего спейсера, иммобилизацию фермента и, наконец, восстановление остаточных альдегидных групп и образовавшихся иминных связей (оснований Шиффа) боргидридом натрия.

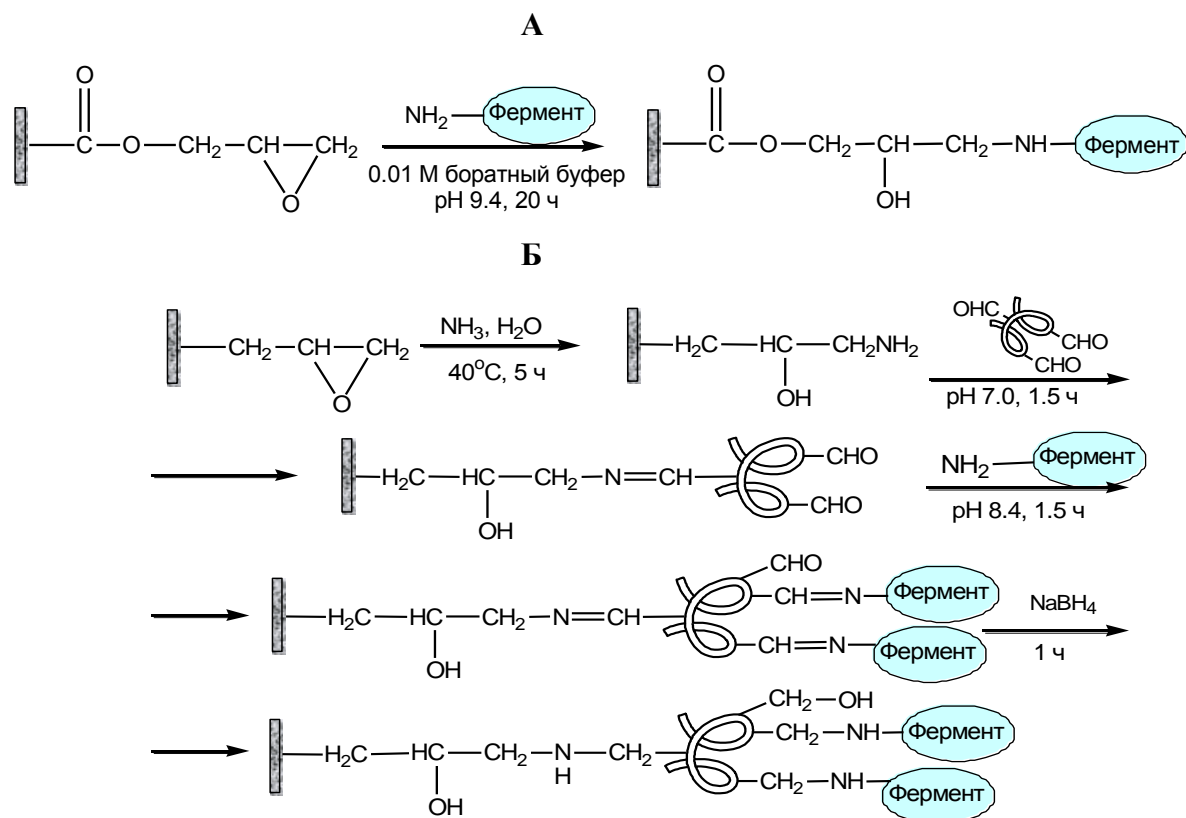


Рисунок 34 – Схематическое изображение реакций иммобилизации ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей: *А* – прямая ковалентная иммобилизация фермента на поверхности монолитного носителя; *Б* – иммобилизация через промежуточный полимерный спейсер.

В случае иммобилизации фермента с использованием макромолекулярного спейсера предварительно были оптимизированы условия проведения модификации поверхности макропористых монолитных материалов. На первом этапе исследовали зависимость степени конверсии эпоксидных групп носителей от времени реакции аминирования (Таблица 11). Реакцию проводили 25%-ным водным раствором аммиака при температуре 40°C. Степень функционализации определяли методом элементного анализа по содержанию азота в анализируемом образце. Максимально достигнутая степень конверсии реакционных групп составила 26% спустя 5 часов реакции.

Таблица 11 – Оптимизация условий аминирования макропористых монолитных носителей на основе сополимера ГМА-ЭДМА (образец М<sub>Э1</sub>)

Время реакции, ч	Степень конверсии эпоксидных групп, %	Содержание аминогрупп, моль·г <sup>-1</sup> сорбента
3	15	0.6
4	20	0.8
5	26	1.0

На следующем этапе проводили модификацию поверхности аминированного сорбента полимерным спейсером, при этом исследовали зависимость иммобилизационной емкости спейсера от концентрации полимера в растворе (Рисунок 35). Реакцию иммобилизации полимера проводили в одинаковых условиях в 0.01 М натрий фосфатном буферном растворе, рН 7.4 в течение 1.5 часов в статических условиях.

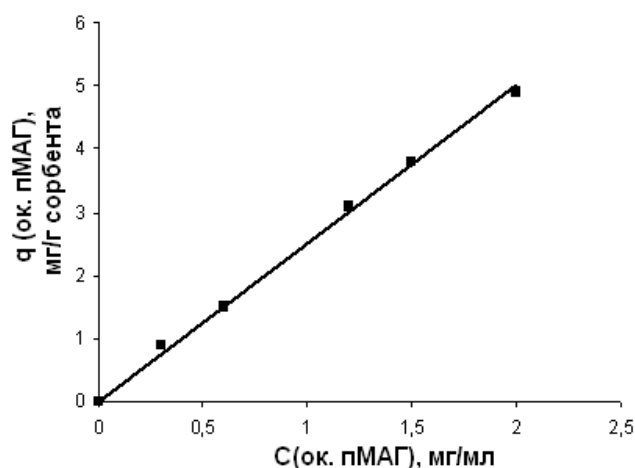


Рисунок 35 – Зависимость иммобилизационной емкости спейсера на поверхности макропористого монолитного носителя от исходной концентрации полимера.



Количество иммобилизованного фермента является важным фактором, влияющим на эффективность гетерогенного биокатализа. Так, слишком высокая плотность иммобилизованного фермента на поверхности может способствовать возникновению стерических затруднений в формировании специфического комплекса фермент-субстрат, и, как следствие, приводить к снижению удельной активности иммобилизованного фермента. Таким образом, для корректного сравнения биокаталитических систем необходимо обеспечить оптимальное содержание фермента на поверхности твердого носителя.

В основе предложенного многостадийного метода иммобилизации ферментов лежит реакция между альдегидными и аминогруппами. Известно, что скорость данной реакции значительно возрастает при переходе от нейтральных значений pH в область щелочных или кислых значений [220]. В связи с тем, что различные ферменты характеризуются различным интервалом pH стабильности оптимизацию условий иммобилизации белка на поверхности макропористого монолитного носителя проводили при двух значениях pH, а именно 5.0 (область стабильности  $\beta$ -ксилозидазы и  $\beta$ -ксилаказы) и 8.4 (область стабильности эстеразы и рибонуклеазы А).

В качестве модельного белка для определения оптимальных условий иммобилизации использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). При этом варьировали концентрацию раствора белка, а также время и температуру проведения реакции. В Таблице 12 приведены результаты по иммобилизации БСА через спейсер (ок.-пМАГ) на поверхности макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА со средним размером пор 1700 нм и пористостью 50% (образец МГЭ9) в зависимости от различных условий.

Как и предполагалось, 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/г сорбента для обоих значений pH.

Количество связавшегося с полимерной матрицей белка рассчитывали по разности масс белка, определяемых в исходных и промывных растворах по методу Лоури-Фолина, который основан на сочетании биуретовой реакции на пептидную связь с реакцией Фолина на ароматические аминокислоты. В настоящее время этот метод является одним из наиболее чувствительных и точных, что позволяет вести определение белков в сильно разбавленных растворах с концентрацией 10-100 мкг в пробе.

Для расчетов использовались предварительно построенные калибровочные зависимости по соответствующим ферментам в буферных растворах, выбранных для иммобилизации. Пример калибровочной зависимости, использованной для расчета

количества иммобилизованной рибонуклеазы А в натрий боратном буферном растворе (рН 8.4), представлен на Рисунке 36.

Таблица 12 – Оптимизация условий иммобилизации белков на поверхности макропористых монолитных носителей на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА (образец МГЭ9)

№	$C_{BCA}$ , мг/мл	$pH$ буферного раствора	$T_{реакции}$ , °С	$t_{реакции}$ , МИН	$Q_{иммоб. BSA}$ , мг белка/г сорбента
1	5.0	8.4	22	90	2.4
2	2.0	8.4	35	120	1.7
3	0.7	8.4	35	120	0.1
4	5.0	5.0	22	90	1.0
5	5.0	5.0	22	150	1.9
6	5.0	5.0	35	90	1.2
7	5.0	5.0	35	180	2.2
8	6.0	5.0	22	180	2.0
9	3.0	5.0	35	150	0.8
10	1.0	5.0	35	180	0.2

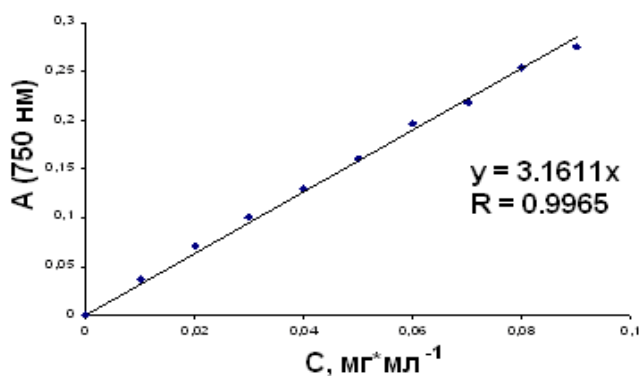


Рисунок 36 – Зависимость оптической плотности раствора от концентрации рибонуклеазы А в натрий боратном буферном растворе (рН 8.4).

В случае РНКазы фермент ковалентно связывали с поверхностью макропористых монолитных колонок на основе сополимеров различной гидрофильности, а именно на основе ГМА-ЭДМА, ГМА-ГЭМА-ЭДМА и ГМА-ГДМА. Кроме того, для исследования влияния геометрии стационарной фазы на эффективность получаемого биореактора также проводили иммобилизацию рибонуклеазы А на поверхности монолитных коммерческих дисков. В Таблице 13 приведены характеристики монолитных носителей и количество иммобилизованного фермента для всех полученных гетерогенных биокатализаторов на основе РНКазы. Иммобилизацию проводили так, чтобы достичь сопоставимого количества фермента, ковалентно связанного с поверхностью монолитных колонок двумя методами. Принимая во внимание то, что объем колонки в 2.5 раза больше объема диска, количество связанного фермента на

диск должно быть пропорционально ниже, то есть составлять примерно 0.9 мг фермента на диск. При этом, вследствие близких характеристик поровой структуры используемых коммерческих дисков и синтезированных колонок (пористость 60–62%, средний размер пор 1300–1600 нм), удельная емкость иммобилизации полученных гетерогенных биокатализаторов должна оказаться практически одинаковой.

В частности, для всех монолитных колонок содержание фермента на поверхности лежало в пределах 2.1-2.4 мг/колонку или 153-175 нмоль/колонку, соответственно. Для монолитных носителей в форме дисков количество иммобилизованного фермента составляло около 0.9 мг/диск или 65 нмоль/диск.

Таблица 13 – Характеристики полученных гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных носителей, содержащих иммобилизованную РНКазу

Биокатализатор	Материал носителя	Средний размер пор, нм	Пористость, %	Метод иммобилизации фермента	$Q_{\text{иммоб. РНКазы}}$ , мг
КР <sub>1</sub>	ГМА-ЭДМА	630	65	Прямой	2.4
КР <sub>2</sub>	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	710	60	Прямой	2.2
КР <sub>3</sub>	ГМА-ГДМА	660	67	Прямой	2.4
КР <sub>4</sub>	ГМА-ЭДМА	630	65	Через спейсер	2.1
КР <sub>5</sub>	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1290	59	Прямой	2.4
КР <sub>6</sub>	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1290	59	Через спейсер	2.3
ДР <sub>1</sub>	ГМА-ЭДМА	1600	60	Прямой	0.92
ДР <sub>2</sub>	ГМА-ЭДМА	1600	60	Через спейсер	0.89

Иммобилизацию  $\beta$ -ксилазы и  $\beta$ -ксилозидазы на поверхности приготовленных монолитных колонок и коммерческих дисков осуществляли только многостадийным методом, через спейсер ок.-пМАГ. Метод прямой иммобилизации ферментов в данном случае не применялся, так как в экспериментах с иммобилизованной рибонуклеазой А более эффективным оказался метод иммобилизации через спейсер (полученные результаты будут приведены в последующих главах работы).

В качестве стационарной фазы для иммобилизации ксиланолитических ферментов использовали колонки на основе гидрофильного сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА и коммерческие СИМ Ероху диски. Количества иммобилизованных ферментов и характеристики используемых стационарных фаз приведены в Таблице 14.

Таблица 14 – Характеристики полученных гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных носителей, содержащих иммобилизованную  $\beta$ -ксилозидазу и  $\beta$ -ксиланазу

Биокатализатор	Материал носителя	Средний размер пор, нм	Пористость, %	Метод иммобилизации фермента	Количество иммобилизованного фермента, нмоль
$\beta$ -ксилозидаза					
КК <sub>1</sub>	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1700	51	Через спейсер	6.9
КК <sub>2</sub>	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1700	51	Через спейсер	1.1
$\beta$ -ксиланаза					
КК <sub>3</sub>	ГМА-ГЭМА-ЭДМА	1700	51	Через спейсер	1.1
ДК <sub>4</sub>	ГМА- ЭДМА	1600	60	Через спейсер	0.6

Ковалентное прикрепление эстеразы к поверхности макропористых монолитных носителей проводили в оптимальных условиях, также используя метод иммобилизации через спейсер. В данном случае в качестве стационарной фазы использовали коммерческие диски. Количество иммобилизованного фермента в расчете на диск составило 0.52 мг или 3.2 нмоль (ДЭ<sub>1</sub>).

### 3.4. Изучение влияния различных факторов на эффективность гетерогенного биокатализа

Как уже упоминалось, эффективность гетерогенного биокатализа сильно подвержена влиянию различных факторов, таких как природа и свойства материала-носителя, метод иммобилизации фермента, иммобилизационная емкость носителя 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, несущую иммобилизованный фермент, режим подачи раствора субстрата и геометрия носителя. Таким образом, задачей данного этапа работы было исследование влияния перечисленных факторов на активность иммобилизованных ферментов.

Значения константы Михаэлиса ( $K_M$ ), удельной активности ( $A$ ), каталитической константы ( $k_{cat}$ ) и эффективности биокатализа ( $k_{cat}/K_M$ ) были рассчитаны на основании линеаризованных зависимостей кривых Михаэлиса. Линеаризацию проводили по методу Хейнса.

### 3.4.1. Влияние природы поверхности материала-носителя

На первом этапе проводимого исследования было изучено влияние химической природы стационарной фазы на эффективность гетерогенного биокатализа. Для этого использовали гетерогенные биокатализаторы КР<sub>1</sub>-КР<sub>3</sub> (см. Таблица 13), содержащие РНКазу, иммобилизованную на поверхности материалов на основе сополимеров (1) ГМА-ЭДМА, (2) ГМА-ГЭМА-ЭДМА, и (3) ГМА-ГДМА.

Для исследования свойств полученных гетерогенных биокатализаторов каталитическую реакцию проводили в режиме *зонального введения субстрата* (или *зонального элюирования*), который представляет собой метод, включающий применение небольшого фиксированного объема раствора субстрата, подаваемого в колонку с иммобилизованным ферментом (Рисунок 37). В данном случае колонка встраивалась в стандартную систему ВЭЖХ, состоящую из инжектора, насоса, спектрофотометрического детектора и компьютера, снабженного соответствующим программным обеспечением.

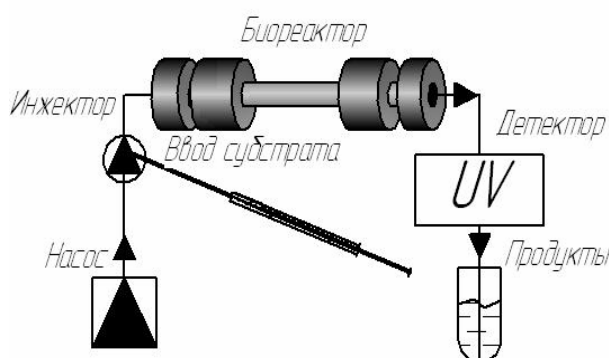


Рисунок 37 – Схема процесса, основанного на зональном методе введения субстрата (зональное элюирование).

В качестве субстрата использовали специфический для выбранного фермента субстрат, а именно цитидин-2',3'-циклофосфат (ЦЦФ) [177]. Гистограммы, описывающие изменение константы Михаэлиса и эффективности каталитической реакции гидролиза ЦЦФ с помощью иммобилизованной РНКазы, представлены на Рисунке 38.

Как известно, значение константы Михаэлиса характеризует термодинамическое сродство фермента к субстрату, что, по сути, отражает прочность образующегося комплекса фермент-субстрат. Чем ниже величина данного параметра, тем больше взаимное сродство компонентов. Во всех трех случаях, в реакции гидролиза ЦЦФ с участием иммобилизованной РНКазы значения  $K_M$  имели один и тот же порядок и были близки к значению определенному для той же самой пары фермент-субстрат в растворе, а именно 0.6 мМ [187]. Тем не менее, наиболее близкое значение  $K_M$  к таковому, полученному в растворе, демонстрировал гетерогенный биокатализатор на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА (0.5 мМ).

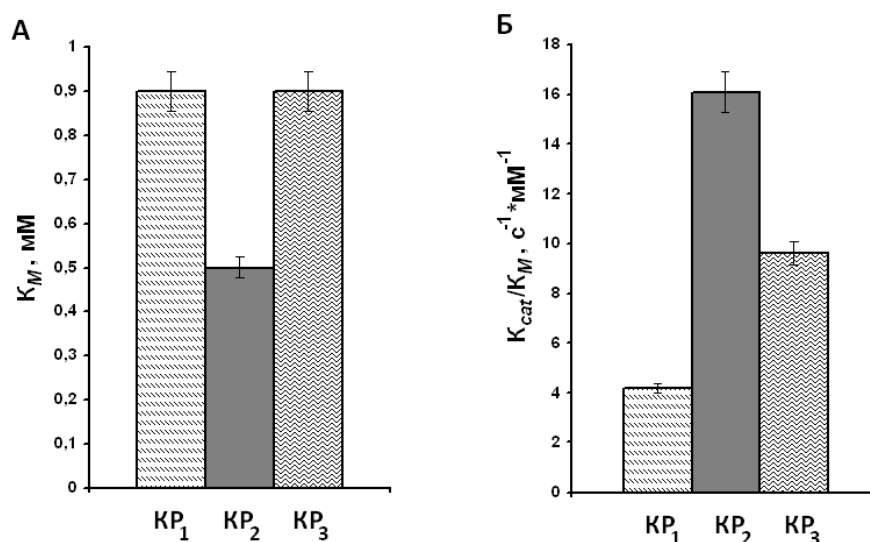


Рисунок 38 – Сравнение констант Михаэлиса (А) и эффективности различных гетерогенных биокатализаторов (Б) в реакции ферментативного гидролиза цитидин-2',3'-циклофосфата.

*Условия реакции:* прямая иммобилизация, метод зонального элюирования, температура 22°C, количество вводимого субстрата 0.06-1.70 мг, скорость потока подвижной фазы (20 mM буфер Трис-НСl, рН 7.5) 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>.

Как и ожидалось, гидрофилизация поверхности благоприятствовала закреплению наиболее активной конформации фермента в процессе его иммобилизации, что выражалось в более высоких значениях удельной активности и соотношениях  $k_{cat}/K_M$  для каталитических реакций с участием рибонуклеазы, иммобилизованной на поверхности материалов на основе сополимеров ГМА-ГЭМА-ЭДМА и ГМА-ГДМА. Так, при прочих равных условиях эффективность гетерогенного биокатализа возрастала в ряду носителей: ГМА-ЭДМА < ГМА-ГДМА < ГМА-ГЭМА-ЭДМА.

Таким образом, наибольшая эффективность биокатализа достигалась при использовании носителя на основе гидрофильного сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА. В данном случае значение  $k_{cat}/K_M$  увеличивалось в 4 раза по сравнению с использованием фермента, иммобилизованного на поверхности стандартного материала на основе сополимера ГМА-ЭДМА. На основании этого макропористый монолитный материал на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА был выбран в качестве оптимального для дальнейшей работы.

### 3.4.2. Влияние метода иммобилизации фермента

Первоначально, для исследования влияния способа иммобилизации на эффективность биокатализа сравнивали гетерогенные биокатализаторы, полученные различными методами иммобилизации рибонуклеазы А на поверхности колонок на основе сополимера ГМА-ЭДМА (колонки KP<sub>1</sub> и KP<sub>4</sub>), а также монолитных дисков (ДР<sub>1</sub> и ДР<sub>2</sub>). Также как и в предыдущем случае в качестве субстрата использовали ЦЦФ. Реакцию гидролиза низкомолекулярного

субстрата проводили как в режиме зонального элюирования, так и в режиме рециркуляции субстрата. В последнем случае биореактор функционировал как циклическая система, где раствор субстрата подавался с помощью перистальтического насоса и пропусклся сквозь колонку (диск) с иммобилизованным ферментом в течение определенного времени при выбранной скорости потока (Рисунок 39).

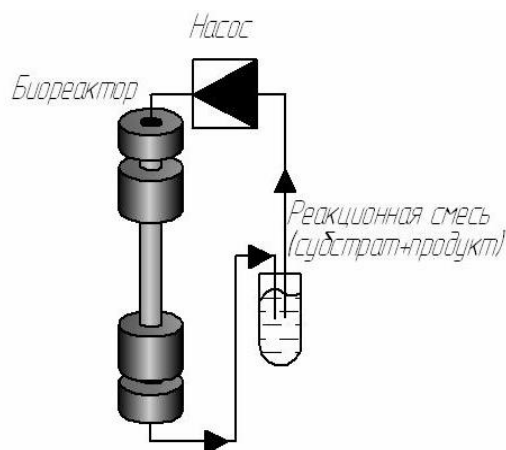


Рисунок 39 – Схема процесса рециркуляции субстрата сквозь стационарную фазу с иммобилизованным ферментом.

При гидролизе раствора ЦЦФ с помощью колонок и дисков с иммобилизованной РНКазой найденные значения констант Михаэлиса для дисков составляли 0.5 ( $DP_1$ ) и 0.7 мМ ( $DP_2$ ), а для обеих колонок, функционирующих как режиме зонального элюирования, так и в режиме рециркуляции, лежали в пределах 0.8 - 0.9 мМ, что свидетельствует о практически идентичной прочности образуемого комплекса фермент-субстрат.

При использовании метода рециркуляции раствора ЦЦФ удельная активность РНКазы, иммобилизованной на поверхности диска через спейсер, возросла более чем на 30%, в то время как удельная активность фермента, иммобилизованного на поверхности колонки, сохраняла свое значение вне зависимости от метода иммобилизации. При сравнении эффективности гидролиза ЦЦФ, катализируемого РНКазой А, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок и дисков различными методами, при использовании метода рециркуляции субстрата сохранялась та же тенденция, что и для активности фермента (Рисунок 40). В случае РНКазы, иммобилизованной на поверхности диска через спейсер ( $DP_2$ ), эффективность биокатализа возросла почти на 20% по сравнению с гетерогенным биокатализатором, содержащим фермент, иммобилизованный прямым методом ( $DP_1$ ). Данные результаты могут быть связаны с тем, что введение спейсера, удаляющего фермент от твердой поверхности, повышает степень подвижности макромолекулы биокатализатора и, как следствие, увеличивает доступность его активного центра для молекул субстрата. При переходе к гетерогенным биокатализаторам в форме колонок эффект от способа иммобилизации фермента в реакции

гидролиза низкомолекулярного субстрата нивелировался за счет длинны пути движения раствора субстрата, что выражалось в совпадении значений эффективности биокатализа для РНКазы, иммобилизованной прямым методом и через спейсер. В то же время, 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 (КР<sub>4</sub>).

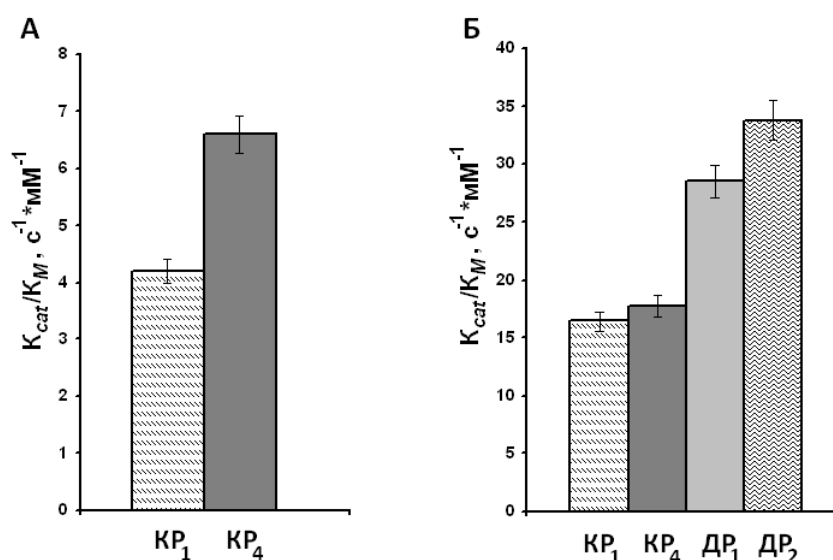


Рисунок 40 – Сравнение эффективности гидролиза ЦЦФ, катализируемого РНКазой А, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок и дисков различными методами, при использовании метода зонального элюирования (А) и рециркуляции субстрата (Б).

*Условия реакции:* зональное элюирование: условия см. Таблицу 9; метод рециркуляции: концентрация раствора субстрата 0.02-2.0 мг·мл<sup>-1</sup>, время реакции 10 мин, скорость потока подвижной фазы (20 мМ буфер Трис-НСI, рН 7.5) 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>.

Кроме того, было исследовано влияние метода иммобилизации фермента на эффективность биокатализа в реакции гидролиза высокомолекулярного субстрата. Известно, что рибонуклеаза А является ферментом, специфически расщепляющим фосфодиэфирные связи в одноцепочечных молекулах РНК и полинуклеотидах, построенных из пиримидиновых производных, при этом полицитидиловая кислота расщепляется приблизительно в 20 раз быстрее, чем полиуридиловая кислота [177]. В данной работе в качестве субстрата была выбрана полицитидиловая кислота.

Из-за большого размера всех молекул, участвующих в каталитическом процессе, носители для иммобилизации ферментов, используемые для высокомолекулярных субстратов, должны обеспечивать высокую проницаемость в комбинации с эффективным массопереносом между иммобилизованным ферментом и макромолекулярным субстратом, присутствующим в подвижной фазе. Вследствие этого, для реализации каталитических процессов с уча-



ствием полимерных субстратов были синтезированы макропористые монолитные колонки с размером пор более 1000 нм и получены гетерогенные биокатализаторы КР<sub>5</sub> и КР<sub>6</sub>.

При использовании высокомолекулярных субстратов в режиме зонального элюирования времени удерживания субстрата внутри гетерогенного биокатализатора не всегда достаточно для достижения полной деградации субстрата. Так, для обсуждаемых колонок время контакта,  $t_c$ , составит менее 0.5 мин при скорости 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>. На основании этого, в случае деградации поли(С) применяли метод рециркуляции субстрата как для колонок, так и для дисков, содержащих иммобилизованную РНКазу.

Как и в большинстве случаев, иммобилизация фермента приводила к увеличению значения  $K_M$  по сравнению с величиной, определенной для нативной формы биокатализатора (Таблица 15). Данный результат является следствием формирования ковалентных связей, частично лимитирующих пространственную свободу макромолекулы фермента и, таким образом, влияющих на образование специфического комплекса двух макромолекул.

Таблица 15 – Кинетические параметры реакции гидролиза поли(С), катализируемой РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок различными методами

*Условия реакции:* метод рециркуляции субстрата, концентрация субстрата варьировалась в интервале 0.01–2.0 мг·мл<sup>-1</sup>, температура 22°C, объем реакционной смеси – 3.0 мл, время реакции – 6 мин, скорость потока подвижной фазы (20 мМ буфер Трис-НСl, рН 7.5) 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>

Гетерогенный биокатализатор	$K_M$ , мМ	$A$ , нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup>
В растворе	0.3	32	95.6
КР <sub>5</sub>	0.8	40	42.7
КР <sub>6</sub>	0.6	35	52.0
ДР <sub>1</sub>	0.3	23	58.7
ДР <sub>2</sub>	0.4	27	68.1

Стоит отметить, что во всех обсуждаемых случаях иммобилизованный через спейсер фермент (гетерогенные биокатализаторы КР<sub>6</sub> и ДР<sub>2</sub>) характеризовался более высокими значениями  $k_{cat}/K_M$ , что может быть связано с уменьшением влияния твердой матрицы и большей доступностью активного центра фермента для молекул субстрата. Так при использовании гетерогенных биокатализаторов КР<sub>6</sub> и ДР<sub>2</sub> по сравнению с аналогичными системами, содержащими напрямую иммобилизованный фермент, эффективность биокатализа возросла на 22 и 16%, соответственно. Таким образом, использование макромолекулярного спейсера при иммобилизации фермента на поверхности макропористых носителей является перспективным направлением в развитии технологии проточного гетерогенного биокатализа.

### 3.4.3. Влияние геометрии стационарной фазы

Для сравнения влияния геометрии стационарной фазы на эффективность получаемого гетерогенного биокатализатора были использованы гетерогенные биокатализаторы в форме дисков и колонок. В отличие от дисков, для которых диаметр > длина, колонки характеризуются обратным соотношением геометрических размеров, т.е. длина > диаметр.

Для исследования кинетических параметров ферментативно катализируемого гидролиза низко- и высокомолекулярных субстратов был выбран режим постоянной рециркуляции раствора субстрата сквозь стационарную фазу, содержащую иммобилизованную РНКазу. В случае гидролиза низкомолекулярного субстрата кинетические параметры определяли при фиксированной скорости подачи раствора субстрата  $0.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$  (Таблица 16).

Таблица 16 – Кинетические параметры гидролиза ЦЦФ, катализируемого РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных дисков и колонок

Условия реакции: метод рециркуляции субстрата, условия гидролиза см. Таблицу 10

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

В реакции гидролиза низкомолекулярного субстрата ЦЦФ значение удельной активности РНКазы, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок было сопоставимо с таковым 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 форме дисков. При этом эффективность биокатализа с использованием РНКазы, иммобилизованной на поверхности монолитной колонки, составляла всего 28% от таковой для гомогенной реакции.

Принимая во внимание то, что диаметр монолитного диска в 2.6 раза превышает диаметр колонки, одинаковая линейная скорость потока подвижной фазы будет соответствовать значительно различающимся объемным скоростям подачи жидкости, и, следовательно, временам взаимодействия субстрата с иммобилизованным ферментом. Поскольку особенно заметную роль данный параметр играет в реакциях деградации высокомолекулярных субстратов в случае гидролиза поли(С) эксперимент проводили в двух вариантах, а именно, в усло-

виях одинаковой объемной скорости (первый случай) и линейной скорости потока раствора субстрата (второй случай).

Из данных, представленных в Таблице 17, очевидно, что кинетические параметры реакции ферментативной деструкции поли(С) существенно зависели от скорости рециркуляции раствора субстрата сквозь стационарную фазу, содержащую иммобилизованный фермент. При сравнении различных форм гетерогенных биокатализаторов было установлено, что при сохранении объемной скорости потока подвижной фазы ( $0.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ ), эффективность гетерогенного биокатализа с помощью РНКазы, иммобилизованной на поверхности монолитных дисков, была примерно на 30% выше значения, определенного для колоночного варианта гетерогенного биокатализатора.

В то же время, в условиях одинаковой линейной скорости (увеличение объемной скорости для диска от  $0.5$  до  $3.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) наблюдалось значительное увеличение эффективности биокатализа с помощью гетерогенного биокатализатора в форме диска. В частности, соотношение  $k_{cat}/K_M$  для данной формы биокатализатора было на 90% выше, чем значение, установленное для колонки, содержащей иммобилизованную РНКазу, и совпадало с параметром, найденным для реакции в растворе.

Таблица 17 – Кинетические параметры гидролиза реакции поли(С), катализируемой РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных дисков и колонок

*Условия реакции:* метод рециркуляции субстрата, концентрация субстрата варьировалась в интервале  $0.02\text{--}2.0 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , температура  $22^\circ\text{C}$ , объем реакционной смеси  $3.0 \text{ мл}$ , скорость потока субстрата  $0.5$  и  $3.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$

Ферментативная реакция	Скорость рециркуляции, $\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}$	Линейная скорость, $\text{см} \cdot \text{мин}^{-1}$	$K_M$ , мМ	$A$ , $\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	$k_{cat}$ , $\text{с}^{-1}$	$k_{cat}/K_M$ , $\text{с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$
В растворе	-	-	0.3	33	26	95.6
КР <sub>8</sub>	0.5	4.9	0.6	35	29	52.0
ДР <sub>2</sub>	0.5	0.7	0.4	27	26	68.1
	3.5	5.0	0.5	54	44	99.0

В дополнение для оценки влияния геометрии стационарной фазы на каталитический процесс деградации высокомолекулярных субстратов был рассмотрен процесс гидролиза ксилана нативной и иммобилизованной ксиланазой (Таблица 18).

Таблица 18 – Кинетические параметры гидролиза ксилана, катализируемого нативной и иммобилизованной  $\beta$ -ксилазой

*Условия реакции:* метод рециркуляции субстрата, концентрация субстрата варьировалась в интервале 0.1–2.6 мг·мл<sup>-1</sup>, температура 22°C, объем реакционной смеси – 3.0 мл, скорость потока подвижной фазы (10 мМ натрий ацетатный буфер, рН 5.0) 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>

Ферментативная реакция	$K_M$ , мг·мл <sup>-1</sup>	$A$ , мкмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , с <sup>-1</sup> ·мМ <sup>-1</sup>
В растворе	4.1	1.0	6.9
КК <sub>3</sub>	5.4	9.8	50.9
ДК <sub>4</sub>	6.6	18.5	77.8

Как и в предыдущих случаях, значение  $K_M$  для иммобилизованных форм  $\beta$ -ксилазы было немного выше, чем для растворенного фермента. При этом наблюдалось существенное увеличение активности иммобилизованных форм фермента и эффективности биокатализа, по сравнению с данными показателями, найденными для нативного фермента. Значения  $k_{cat}/K_M$  возрастали в 7.4 и в 11.3 раз для колонки и диска с иммобилизованной ксиланазой, соответственно, по сравнению с таковым для растворенной формы фермента.

Сравнение кинетических параметров  $\beta$ -ксилазы, иммобилизованной на поверхности монолитного диска и колонки, позволило заключить, что гетерогенный биокатализатор в форме диска является более эффективным для реакций, проводимых в режиме рециркуляции высокомолекулярного субстрата, что соотносится с данными, полученными в подобных экспериментах для РНКазы. 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.

#### 3.4.4. Влияние скорости потока раствора субстрата сквозь гетерогенный биокатализатор

Одним из наиболее важных факторов, влияющих на эффективность проточного варианта гетерогенного биокатализа, является скорость потока раствора субстрата сквозь стационарную фазу с иммобилизованным ферментом. Для исследования влияния скорости потока на эффективность биокатализа была проведена серия экспериментов по гидролизу ЦЦФ, поли(С) и РНК с использованием различных гетерогенных биокатализаторов на основе рибонуклеазы А.

Влияние скорости потока раствора низкомолекулярного субстрата (ЦЦФ) сквозь стационарную фазу с иммобилизованным ферментом рассматривали в режиме зонального элю-

ирования при использовании гетерогенных биокатализаторов КР<sub>1</sub> – КР<sub>3</sub>. Скорость подвижной фазы увеличивали от 0.3 до 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>, что соответствовало значениям линейной скорости, равным 3 – 10 см·мин<sup>-1</sup>.

Анализ полученных кинетических данных показал, что для гетерогенных биокатализаторов, используемых в режиме зонального элюирования, удельная активность РНКазы возрастала с увеличением скорости потока субстрата. При этом также наблюдалось значительное увеличение показателя эффективности биокатализа при переходе к высоким скоростям потока (при 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>), в то время как для скоростей потока в пределах 0.3 – 0.5 мл·мин<sup>-1</sup> значение  $k_{cat}/K_M$  для всех используемых биореакторов сохранялось постоянным (Рисунок 41). Данный результат может быть отнесен к особенностям динамического поведения молекул при высоких скоростях потока. Из литературы известно, что при высоких скоростях подвижной фазы (более 2.0 см·мин<sup>-1</sup>) имеет место доминирование конвективного механизма массопереноса вещества, тогда как при малых скоростях массоперенос является смешанным, где существенную роль начинает играть диффузионный процесс [98]. При высоких скоростях подвижной фазы, т.е. в условиях незатрудненного диффузией массопереноса, число контактов молекул растворенного субстрата с закрепленными на поверхности макромолекулами фермента возрастает за счет увеличения диффузионной подвижности молекул субстрата. Как следствие, количество образовавшихся пар фермента с субстратом и, соответственно, продукта в единицу времени также возрастает. 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.

Помимо зонального элюирования влияние скорости подачи раствора низкомолекулярного субстрата было исследовано и в режиме рециркуляции при использовании гетерогенных биокатализаторов в форме дисков (ДР<sub>1</sub> и ДР<sub>2</sub>). Гидролиз ЦЦФ проводился при скорости потока раствора субстрата 0.5, 1.0 и 2.0 мл·мин<sup>-1</sup>, что соответствовало значениям линейной скорости равным 0.7, 1.4 и 2.8 см·мин<sup>-1</sup>. Полученные кинетические характеристики суммированы в Таблице 19.

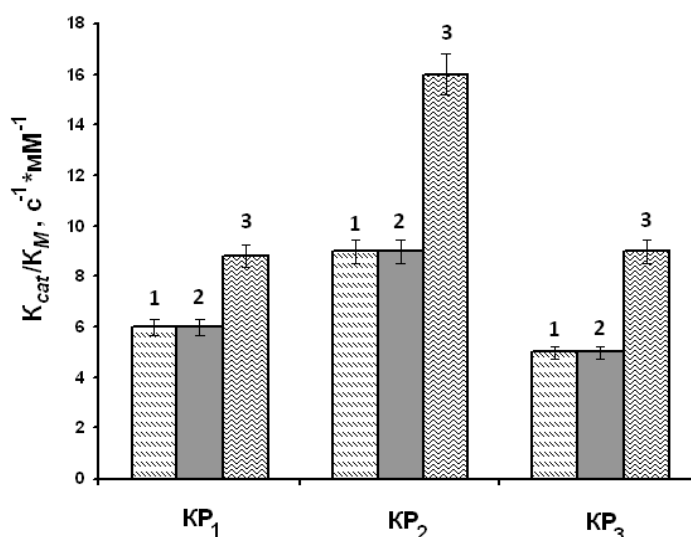


Рисунок 41 – Влияние скорости подачи раствора субстрата на эффективность гидролиза ЦЦФ в условиях зонального элюирования.

Условия реакции: см. Рисунок 38.

Таблица 19 – Влияние скорости подачи раствора субстрата на кинетические параметры гидролиза ЦЦФ в условиях рециркуляции

Условия реакции: см. Таблицу 10

Гетерогенный биокатализатор	Скорость потока субстрата, мл·мин <sup>-1</sup>	K <sub>M</sub> , мМ	A, мкмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> , с <sup>-1</sup> ·мМ <sup>-1</sup>
ДР <sub>1</sub>	0.5	0.6	0.22	0.09
	1.0	0.9	0.38	0.10
	2.0	1.3	0.48	0.09
ДР <sub>2</sub>	0.5	0.9	0.15	0.16
	1.0	1.1	0.17	0.15
	2.0	1.6	0.25	0.16

Также как и в режиме зонального элюирования, при использовании рециркуляции ЦЦФ сквозь диски с иммобилизованной РНКазой с увеличением скорости потока субстрата наблюдалось увеличение значений удельной активности иммобилизованной РНКазы. Однако, в отличие от режима зонального элюирования, в режиме рециркуляции с увеличением скорости подачи подвижной фазы также наблюдалось значительное увеличение значений  $K_M$ . В то же время величина  $k_{cat}/K_M$  оставалась постоянной и не зависела от скорости рециркуляции раствора субстрата в исследуемом узком интервале линейных скоростей. В отличие от зонального элюирования, где максимальная исследованная линейная скорость составила 10 см·мин<sup>-1</sup>, в режиме рециркуляции максимально достигнутая скорость составила всего 2.1 см·мин<sup>-1</sup>, что было ограничено трудностью технической реализации процесса рециркуляции при больших скоростях.

В случае гидролиза высокомолекулярных субстратов (поли(С) и РНК) также оценивали влияние скорости потока раствора субстрата на эффективность биокатализа. Для экспериментов с высокомолекулярными субстратами использовали гетерогенные биокатализаторы КР<sub>5</sub> и КР<sub>6</sub>. Скорость подвижной фазы варьировали в пределах 0.3 – 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>, что соответствовало значениям линейной скорости, равным 3 – 10 см·мин<sup>-1</sup> (зональное элюирование). На основании графиков, представленных на Рисунке 42, и, иллюстрирующих зависимости прироста оптической плотности в единицу времени становится очевидным, что и в данном случае скорость каталитической реакции, а, следовательно, и удельная активность возрастает с увеличением скорости подачи раствора субстрата.

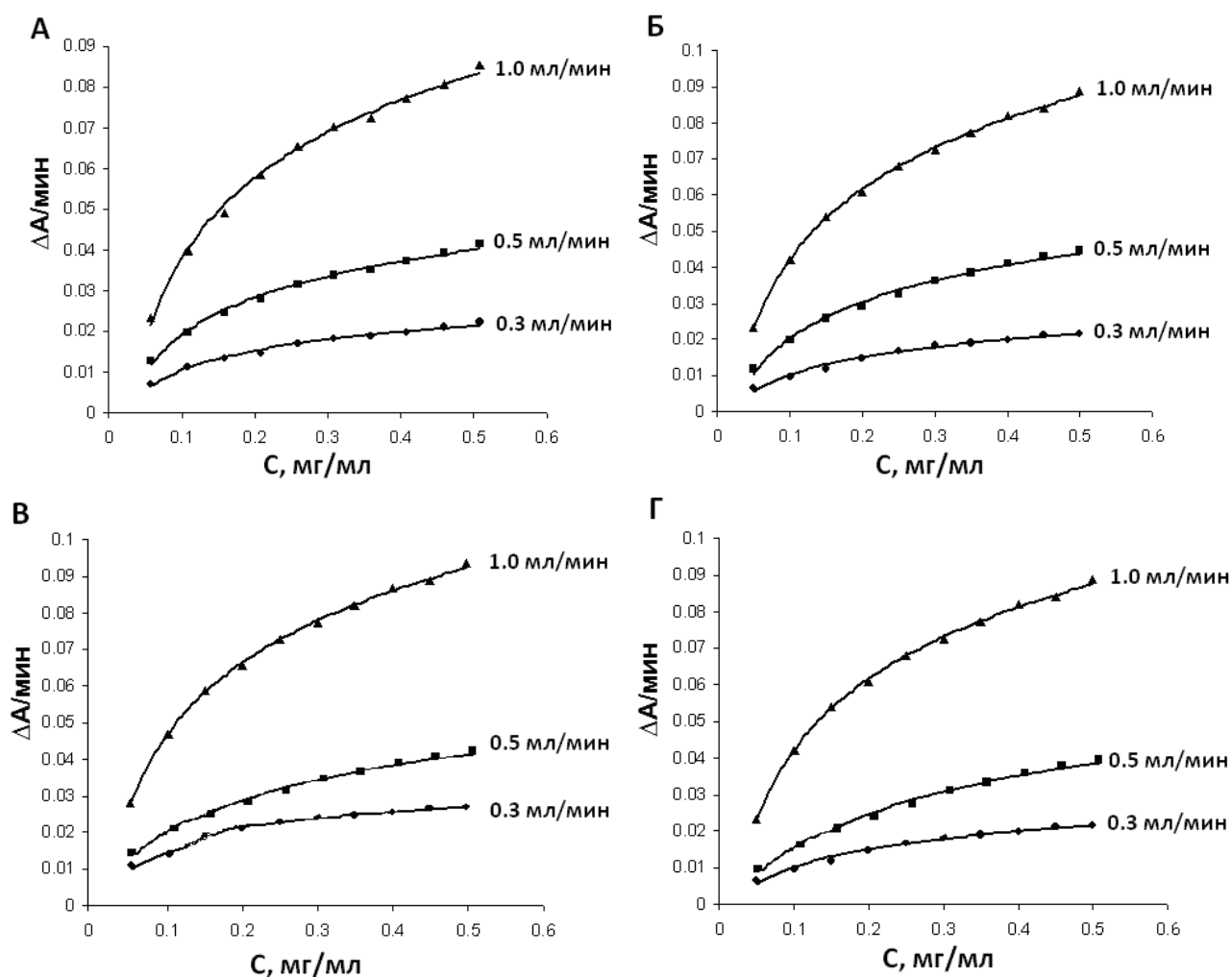


Рисунок 42 – Зависимость прироста оптической плотности раствора после реакции ферментативного гидролиза поли(С) (А, Б) и РНК (В, Г) в единицу времени от скорости подачи раствора субстрата.

Обозначения: А, В – гетерогенный биокатализатор КР<sub>5</sub>, Б, Г – гетерогенный биокатализатор КР<sub>6</sub>.

Таким образом, было установлено, что независимо от дизайна стационарной фазы (диски или колонки), природы стационарной фазы, метода иммобилизации фермента, а также независимо от режима проведения биокаталитического процесса (зональное элюирование или рециркуляция) и структуры используемого субстрата увеличение скорости подачи раствора субстрата способствовало росту удельной активности иммобилизованного фермента. Для режима зонального элюирования при скоростях более  $5 \text{ см} \cdot \text{мин}^{-1}$  также наблюдался и рост эффективности гетерогенного биокатализа в целом. Это обстоятельство, несомненно, является следствием конвективного механизма массопереноса, характерного для макропористых монолитных материалов.

### 3.4.5. Влияние количества иммобилизованного фермента

Влияние количества иммобилизованного фермента на эффективность биокатализа было изучено на примере  $\beta$ -ксилозидазы, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок. Как упоминалось ранее, эффективность гетерогенного биокатализа может снижаться вследствие конформационных изменений в активном центре фермента, вызванных ковалентным присоединением биокатализатора к поверхности твердой фазы. Кроме этого, снижение активности иммобилизованного фермента может быть сопряжено со стерическими затруднениями в образовании комплексов фермент-субстрат, связанных с недоступностью активного центра фермента вследствие высокой плотности биокатализатора на поверхности. Особенно заметным этот эффект может быть в случае ферментов с высокой молекулярной массой, например, таких как  $\beta$ -ксилозидаза (ММ 250000).

Для оценки влияния количества иммобилизованного фермента на эффективность биокаталитического процесса было получено два гетерогенных биокатализатора с различной иммобилизационной емкостью  $\beta$ -ксилозидазы. Как известно, данный фермент является экзогенным и действует только на концевые остатки ксилозы в макромолекуле ксилана, отщепляя их по одному. Частичная деструкция ксилана до олигосахаридов облегчает их дальнейшую деполимеризацию, катализируемую  $\beta$ -ксилозидазой. Таким образом, в данной работе в качестве специфических субстратов для  $\beta$ -ксилозидазы были использованы ксилан и смесь ксилоолигосахаридов.

В качестве твердого носителя использовали макропористые монолитные колонки на основе выбранного тройного сополимера, а именно ГМА-ГЭМА-ЭДМА, а в качестве метода иммобилизации – иммобилизацию через спейсер. Учитывая то, что  $\beta$ -ксилозидаза, представляет собой фермент с высокой молекулярной массой, и используемые субстраты также являются высокомолекулярными соединениями, для минимизации стерических взаимодействий при образовании комплекса фермент-субстрат были использованы носители с диамет-



ром пор 1700 нм. Характеристики полученных гетерогенных биокатализаторов КК<sub>1</sub> и КК<sub>2</sub>, отличающихся количеством иммобилизованной  $\beta$ -ксилозидазы, представлены в Таблице 8. В частности, в случае гетерогенного биокатализатора КК<sub>1</sub> количество иммобилизованной  $\beta$ -ксилозидазы было в 6 раз больше, чем для КК<sub>2</sub>.

Для исследования свойств полученных гетерогенных биокатализаторов каталитическую реакцию деградации специфических субстратов проводили в режиме рециркуляции раствора субстрата сквозь стационарную фазу с иммобилизованным ферментом. Реакция расщепления субстрата протекала при комнатной температуре при скорости сквозного потока подвижной фазы (10 мМ натрий ацетатный буферный раствор, рН 5.0) 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>.

Кинетические характеристики иммобилизованной и нативной форм  $\beta$ -ксилозидазы приведены в Таблице 20. Очевидно, что оба гетерогенных биокатализатора и нативный фермент демонстрировали сходные значения  $K_M$  для реакции гидролиза ксилана и ксилоолигосахаридов, что свидетельствует о незначительном влиянии иммобилизации фермента на образование специфического комплекса фермент-субстрат.

Таблица 20 – Кинетические параметры гидролиза ксилана нативной и иммобилизованной  $\beta$ -ксилозидазой

*Условия реакции:* метод рециркуляции субстрата, концентрация субстрата варьировалась в интервале 0.1–2.6 мг·мл<sup>-1</sup>, температура 22°C, объем реакционной смеси – 3.0 мл, скорость потока подвижной фазы (10 мМ натрий ацетатный буфер, рН 5.0) 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>

Биокатализатор	$K_M$ , мМ	$A$ , мкмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , мин <sup>-1</sup> ·мМ <sup>-1</sup>
<i>Ксилан</i>			
В растворе	3.6	0.12	8.6
КК <sub>1</sub>	4.1	0.52	32.0
КК <sub>2</sub>	4.2	0.08	5.0
<i>Ксилоолигосахариды</i>			
В растворе	4.3	0.18	10.6
КК <sub>1</sub>	4.8	0.81	42.1
КК <sub>2</sub>	4.3	0.08	4.9

При сравнении двух гетерогенных биокатализаторов с различным содержанием фермента в реакции гидролиза ксилана было установлено, что удельная активность биокатализатора КК<sub>2</sub> (низкозагруженная колонка) была примерно в 4 раза выше, чем для фермента в растворе и в 6 раз выше, чем для колонки КК<sub>1</sub> с высокой иммобилизационной емкостью. Аналогичная тенденция к падению биокаталитической активности при увеличении количества иммобилизованного фермента наблюдалась ранее для трипсина, иммобилизованного на поверхности силикатных монолитных колонок [221].

Как и ожидалось, в случае ферментативно-катализируемой деструкции ксилоолигосахаридов общая тенденция относительно эффективности биокатализа осталась такой же, как в случае деполимеризации ксилана. В частности, наилучшие характеристики были получены для гетерогенного биокатализатора с низким содержанием  $\beta$ -ксилозидазы на поверхности твердой фазы (КК<sub>2</sub>). Более того, в случае каталитической реакции с использованием колонки с высоким содержанием фермента (КК<sub>1</sub>) не наблюдалось повышения эффективности биокаталитического процесса при использовании частично гидролизованного субстрата. Это может означать, что процесс взаимодействия фермента с субстратом лимитирован стерической доступностью активного центра биокатализатора вследствие высокой загруженности поверхности. Таким образом, увеличение количества биокатализатора на поверхности не приводит к повышению эффективности гетерогенного биокатализа.

Кроме того, наблюдалось значительное увеличение удельной активности иммобилизованного фермента, а также эффективности биокатализа, по сравнению с нативным примерно на 70%. Данный факт можно объяснить положительным влиянием проведения реакции биокатализа в динамических условиях. Как уже упоминалось, ксилозидаза является экзогенным ферментом и процессы деградации высокомолекулярных субстратов при ее участии протекают крайне медленно, возможно, это происходит вследствие медленной ориентации макромолекул субстрата и фермента в пространстве реакционной среды и распознавания активным центром фермента необходимого для осуществления каталитической реакции концевого участка субстрата.

В случае гетерогенного катализа с участием ферментов, иммобилизованных на поверхности макропористых монолитов, обеспечивающих высокую проницаемость и незатрудненный диффузией массоперенос, быстрое отведение продуктов реакции приводит к смещению равновесия каталитической реакции в сторону образования продуктов. Как следствие, эффективность гетерогенного биокатализа по сравнению с таковыми для нативного фермента возрастает.

При использовании дисков, характеризующихся малой толщиной слоя, и, как следствие, малым временем пребывания молекул субстрата внутри поровой системы, введение спейсера обеспечивало положительный эффект, сводящий к минимуму так называемый «неэффективный проскок» субстрата, снижающий вероятность образования пары фермент-субстрат.

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

При использовании низкомолекулярных субстратов, как правило, каталитическая реакция протекает достаточно быстро и без каких-либо затруднений. Фермент взаимодействует с субстратом, расщепляет его, после чего взаимодействует со следующей молекулой субстрата. В случае высокомолекулярных субстратов фермент последовательно обрабатывает все возможные связи в макромолекуле субстрата, постепенно превращая его в набор продуктов. В отличие от реакции в растворе для иммобилизованных ферментов ситуация усложняется, во-первых, за счет возникновения стерических ограничений в доступности активного центра. Во-вторых, при использовании высокомолекулярных субстратов, плохой массоперенос или недостаточное время контакта фермента с субстратом может также стать причиной снижения эффективности проточного гетерогенного биокатализа.

Макропористые монолитные носители, используемые в данной работе, характеризуются высокой проницаемостью для потока жидкости и поэтому обеспечивают выгодные условия для эффективного межфазового массопереноса любых типов молекул, включая высокомолекулярные соединения. Изучение процесса деградации высокомолекулярных субстратов с помощью гетерогенных биокатализаторов, содержащих рибонуклеазу, ксилозидазу, ксиланазу или эстеразу, проводили на примере гидролиза поли(С), РНК, ксилана и поли(молочной кислоты). 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.

#### **3.5.1. Разработка метода хроматографического мониторинга поли- и олигонуклеотидов**

Для анализа олигонуклеотидов могут применяться различные виды ВЭЖХ, а именно, обращенно-фазовая, ионообменная (анионо- и катионообменная), а также ионпарная хроматография. В данной работе для анализа продуктов деградации полирибонуклеотидов был выбран анионообменной вариант ВЭЖХ (АО ВЭЖХ), как наиболее часто используемый для этих целей. В качестве стационарных фаз для ВЭЖХ анализа были использованы коммерчески доступные монолитные ультракороткие колонки, а именно CIM DEAE диски.

При использовании метода анионообменной ВЭЖХ в качестве подвижных фаз обычно применяют буферные растворы, позволяющие регулировать значения pH. Для слабых ионообменных сорбентов выбор pH определяет степень ионизации ионогенных групп ад-

сорбционной поверхности, которая влияет на прочность связывания ионогенного вещества. Из литературы известно, что рН-оптимум подвижной фазы для разделения поли- и олигонуклеотидов при использовании слабых анионообменных сорбентов лежит в пределах от 6.5 до 8.0 [222]. В данной работе в качестве рабочего буферного раствора (элюент А) использовали 20 мМ буферный раствор Трис-НСl с рН 7.5. Выбор состава элюента и его рН был связан с тем, что данный буферный раствор применялся для проведения каталитических реакций с участием иммобилизованной РНКазы.

В качестве десорбирующего элюента (элюент Б) использовали раствор NaCl в элюенте А. Процесс адсорбции и десорбции веществ зависит от концентрации в элюенте ионов соли. Адсорбция ионогенных соединений на ионообменном сорбенте происходит в отсутствие ионов соли или при их минимальном содержании. Резкое увеличение концентрации соли (ионной силы раствора) в подвижной фазе приводит к быстрой десорбции веществ с поверхности стационарной фазы, в результате чего, вещества элюируются без разделения. При промежуточных значениях концентрации соли в подвижной фазе наблюдается постепенное элюирование и разделение веществ.

Для обсуждаемой системы было установлено, что полная десорбция полирибонуклеотидов достигалась при содержании 1 моль·л<sup>-1</sup> соли в элюенте. Поэтому разделение проводили в режиме градиентного элюирования, то есть используя линейное изменение концентрации соли в элюенте А путем постепенного его разбавления элюентом Б.

При оптимизации метода анализа поли(С) и продуктов ее деградации варьировали скорость потока подвижной фазы и время градиента, определяющие такой важный параметр как объем градиента, отражающий общее количество вытеснителя (соли), прошедшего сквозь слой сорбента при скорости  $X$  за время  $Y$ . Как правило, чем больше объем градиента, тем выше коэффициент разрешения хроматографических пиков.

Оптимальные условия анализа поли(С) и продуктов ее расщепления включали использование линейного градиента соли, а именно от 0 до 1 моль·л<sup>-1</sup> NaCl, при скорости потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup> в течение 30 минут. Представленные на Рисунке 12А хроматограммы поли(С) демонстрируют неоднородность коммерческого полирибонуклеотида, выраженную наличием на хроматограмме нескольких пиков. Аналогичная картина была получена при анализе поли(С) методом капиллярного электрофореза (Рисунок 43).

Методика хроматографического анализа продуктов деградации РНК отличалась от методики, разработанной для поли(С) и продуктов ее деструкции. Попытка использовать тот же буферный раствор, а именно, 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, не привела к положительному результату. Известно, что разделение олигонуклеотидов различного состава и длины может осложняться вследствие их способности образовывать агрегаты за счет возникновения меж-

молекулярных водородных связей [223]. В качестве агентов, подавляющих образование межмолекулярных водородных связей, в подвижную фазу обычно вводят мочевины. Например, добавление в рабочий буфер мочевины в концентрации  $7 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$  положительно влияет на разделение олигонуклеотидов [223]. В результате, механизм разделения олигонуклеотидов подчиняется только закону ионного обмена.

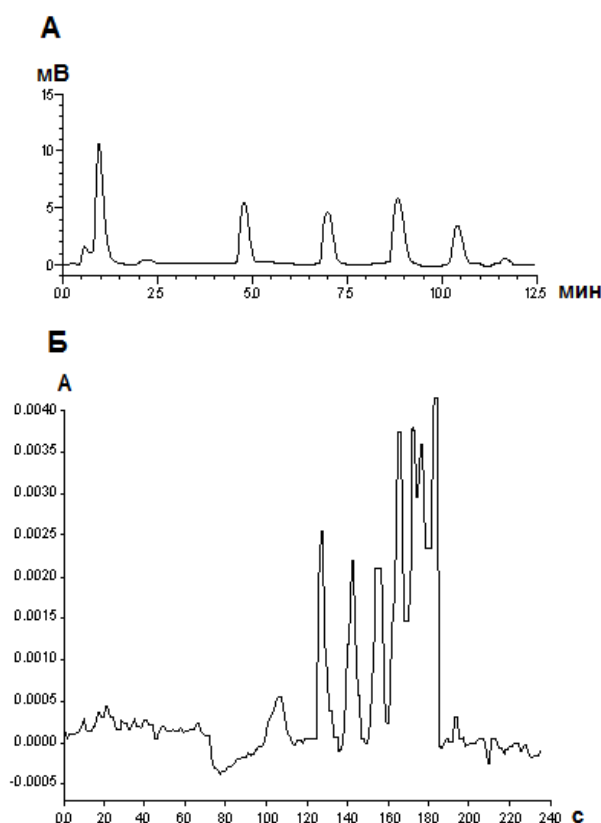


Рисунок 43 – Анализ коммерческой поли(С): А – АО ВЭЖХ, Б – капиллярный электрофорез (КЭФ).

*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, элюент Б – 1 М NaCl в элюенте А; скорость потока подвижной фазы –  $0.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ ; концентрация поли(С) –  $0.125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ; объем вводимой пробы – 10 мкл; программа анализа – линейный градиент 0 – 100% элюента Б за 30 минут.

*Условия КЭФ:* рабочий буфер – 10 мМ натрий боратный буфер, напряжение – 20 кВ, ток – 75 мкА, температура –  $22^\circ\text{C}$ , концентрация поли(С) –  $0.025 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , метод ввода пробы – в течение 7 секунд под давлением 2.0 бар, детектирование при  $\lambda = 260 \text{ нм}$ , диаметр капилляра – 75 мкм, длина капилляра – 45 см.

Кроме того, ухудшение разделения может быть вызвано взаимодействием олигонуклеотидов и их агрегатов с поверхностью сорбента не только за счет ионных, но и гидрофобных взаимодействий, образования водородных связей, а также ван-дер-ваальсовых сил. Возникновение водородных связей между олигонуклеотидами и матрицей также предотвращается добавлением мочевины в подвижную фазу, тогда как для подавления гидрофобных вза-

имодействий с матрицей используют добавки органических растворителей, например, в подвижную фазу добавляют изопропанол, ацетонитрил, ДМСО, и др.

Поскольку гидрофобных взаимодействий фрагментов РНК с используемой полиметакрилатной матрицей не наблюдалось, в подвижную фазу вводили только мочевины. Оптимальные условия разделения продуктов каталитической деградации РНК включали использование линейного градиента от 0 до 40% элюента Б, содержащего 1 моль·л<sup>-1</sup> NaCl и 7 моль·л<sup>-1</sup> мочевины, при скорости потока 1.0 мл·мин<sup>-1</sup> в течение 15 минут.

Хроматограммы анализа РНК и продуктов ее деградации приведены на Рисунке 44. Как видно из Рисунка 44Б и 44В добавление мочевины значительно улучшало эффективность разделения пиков олигонуклеотидов, полученных в результате гидролиза. Кроме того, в отличие от исходного полирибонуклеотида, элюирующегося в течение 10 минут в виде широкого пика (Рисунок 44А), в тех же условиях градиента гидролизаты элюировались в виде набора пиков, причем за значительно более короткое время, а именно, в течение 5 минут (Рисунок 44Б).

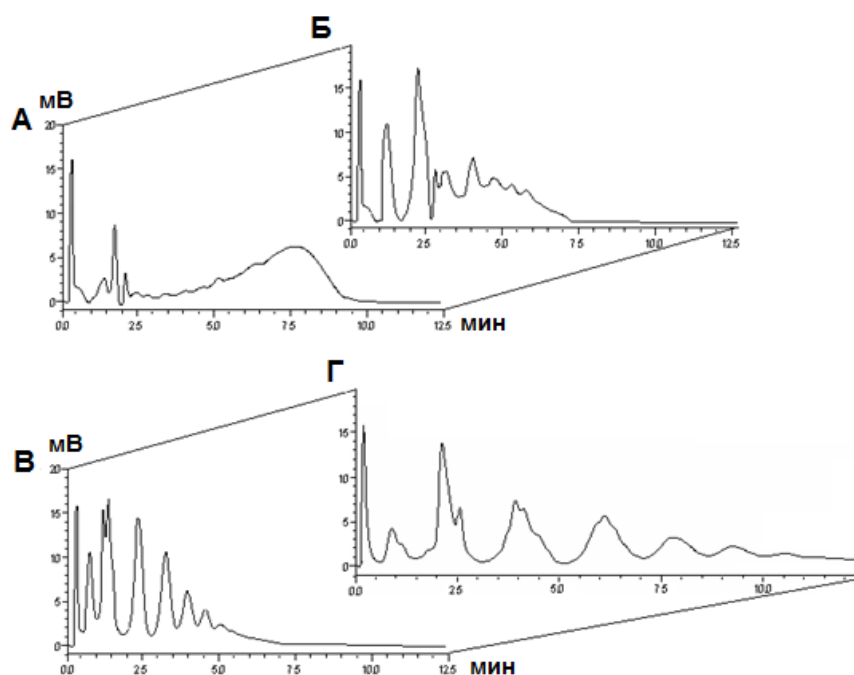


Рисунок 44 – Анализ РНК и продуктов ее гидролиза методом ВЭЖХ с использованием макропористых анионообменных монолитных дисков.

Обозначения: А – РНК (градиент 0 – 100% элюента Б с добавлением 7 моль·л<sup>-1</sup> мочевины), Б – гидролизат РНК (градиент 0 – 100% элюента Б без добавления мочевины), В – гидролизат РНК (градиент 0 – 100% элюента Б с добавлением 7 моль·л<sup>-1</sup> мочевины), Г – гидролизат РНК (градиент 0 – 40% элюента Б с добавлением 7 моль·л<sup>-1</sup> мочевины)

Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный диск СИМ DEAE (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, + 7 моль·л<sup>-1</sup> мочевины, элюент Б – 1 М NaCl в элюенте А; скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>; концентрация РНК – 0.1 мг·мл<sup>-1</sup>; объем вводимой пробы – 10 мкл.

### 3.5.2. Изучение процесса ферментативной деградации полицитидиловой кислоты

Первоначально было проведено исследование процесса деградации поли(С) РНКазой в растворе. Мониторинг процесса осуществляли разработанным методом АО ВЭЖХ. Так как РНКаза представляет собой экзогенный фермент она может расщеплять связи внутри цепи поли(С) с образованием набора олигонуклеотидов, с последующей их деградацией до мономера. Известно, что данная реакция протекает через образование промежуточного соединения, а именно цитидин-2',3'-циклофосфата, которое затем конвертируется в цитидин-3'-монофосфат (см. п. 1.5.1.1.). Представленная на Рисунке 45 хроматограмма иллюстрирует образование продуктов в ходе реакции деградации поли(С), при этом наблюдается очевидное перераспределение хроматографических пиков в течение процесса.

Цитидин-3'-монофосфат (ЦМФ) и цитидин-2',3'-циклофосфат (ЦЦФ) использовали в качестве хроматографических стандартов. Можно видеть, что уже спустя 5 минут после начала реакции данные вещества являются единственными продуктами каталитической реакции. Из представленной на Рисунке 45 хроматограммы 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.

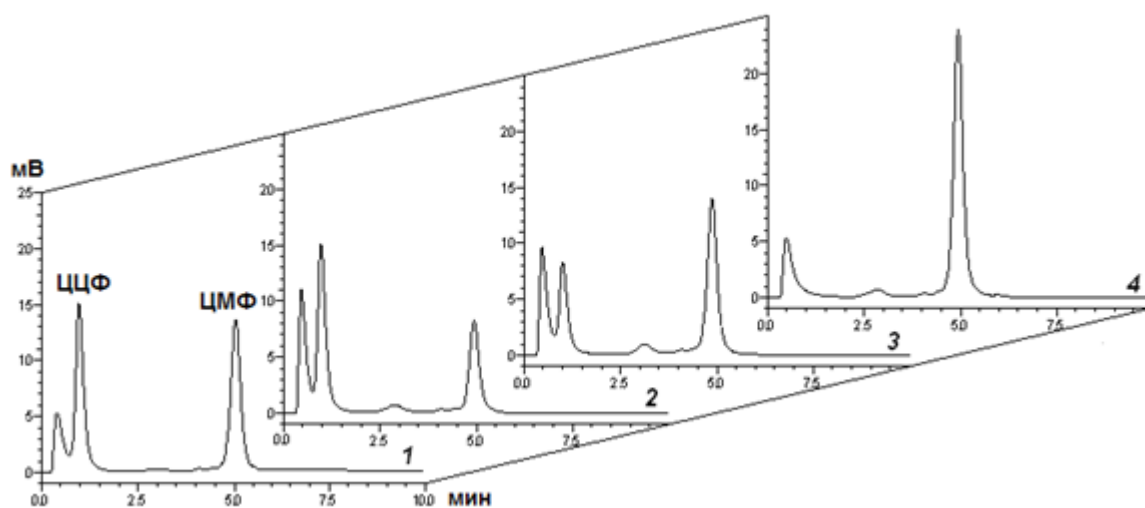


Рисунок 45 – Мониторинг процесса деградации поли(С) РНКазой в растворе.

Обозначения: 1 – смесь стандартов цитидин-2',3'-циклофосфата и цитидин-3'-монофосфата, 2 – гидролиз в течение 5 минут, 3 – гидролиз в течение 15 минут, 4 – гидролиз в течение 30 минут.

Условия ВЭЖХ: см. Рисунок 43.

Разработанный метод АО ВЭЖХ мониторинга использовался в дальнейшем для изучения каталитической реакции с участием полученных гетерогенных биокатализаторов. Пер-

воначально, процесс деградации поли(С) изучали при использовании подхода зонального элюирования, когда фиксированное количество раствора субстрата протекало сквозь макропористую монолитную колонку с иммобилизованным ферментом. При этом был изучен эффект различных экспериментальных факторов, таких как объем вводимой пробы, скорость потока субстрата и температура на процесс ферментативного гидролиза

На Рисунке 46 представлены хроматограммы, иллюстрирующие образование продуктов реакции в зависимости от скорости потока раствора субстрата сквозь монолитные колонки, содержащие иммобилизованную РНКазу (КР<sub>5</sub> и КР<sub>6</sub>). Как видно из полученных хроматограмм, каталитическая реакция деградации поли(С) при использовании гетерогенных биокатализаторов в отличие от каталитической реакции в растворе помимо ЦМФ и ЦЦФ сопровождается образованием смеси олигонуклеотидов. Данный результат может быть объяснен коротким временем пребывания субстрата внутри колонки, в результате чего происходит лишь частичная деградация поли(С).

При использовании зонального элюирования раствора субстрата увеличение скорости потока обратно пропорционально времени пребывания субстрата в поровом пространстве колонки, содержащей иммобилизованный фермент, что в свою очередь может снижать вероятность формирования специфических комплексов между растворенным субстратом и ферментом, локализованным на поверхности твердой фазы. Так, при выбранных скоростях потока 0.1, 0.5 и 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>, 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. Таким образом, несмотря на существенное уменьшение времени пребывания молекул субстрата в колонке, более высокие скорости потока способствуют более эффективному массопереносу, что в свою очередь, не приводит к снижению количества контактов между молекулами субстрата и иммобилизованными молекулами фермента.

При сравнении эффективности двух гетерогенных биокатализаторов КР<sub>5</sub> и КР<sub>6</sub>, отличающихся способом ковалентного прикрепления фермента, можно констатировать уменьшение числа пиков на хроматограмме, полученной при использовании гетерогенного биокатализатора КР<sub>6</sub> (иммобилизация через макромолекулярный спейсер), что свидетельствует о большей глубине биоконверсии. В частности, в случае использования гетерогенного биокатализатора КР<sub>6</sub> полученные хроматограммы не содержат пиков, элюируемых после 5.5 минут и соответствующих полинуклеотидам.



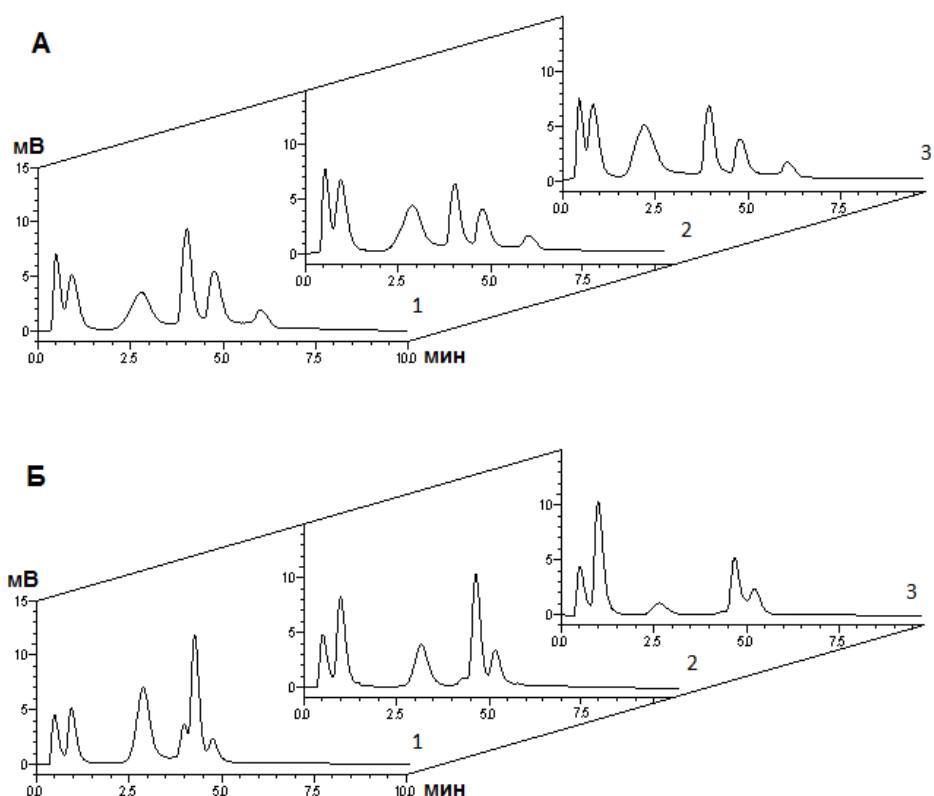


Рисунок 46 – Влияние скорости потока раствора субстрата на эффективность гидролиза поли(С) под действием РНКазы, иммобилизованной прямым методом (А) и через спейсер (Б).

Обозначения: 1 – скорость потока субстрата  $0.1 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ , 2 – скорость потока  $0.5 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ , 3 – скорость потока  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ .

Условия биокатализа: зональное элюирование, гетерогенные биокатализаторы КР<sub>5</sub> (А) и КР<sub>6</sub> (Б), объем раствора поли(С) – 0.5 мл, концентрация раствора поли(С) –  $0.25 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , температура –  $22^\circ\text{C}$ .

Условия ВЭЖХ: условия см. Рисунок 43.

Исследование влияния температуры на эффективность гетерогенного биокатализа проводили при температурах  $22$  и  $35^\circ\text{C}$  (скорость потока раствора субстрата –  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ ). Как и ожидалось, при повышении температуры скорость каталитической реакции возрастала. Качественно, это выражалось в исчезновении ряда пиков олигомеров, образующихся при проведении реакции при температуре  $22^\circ\text{C}$ , а также в увеличении площади пика, отвечающего конечному продукту (ЦМФ) (Рисунок 47). При этом, в случае использования фермента, иммобилизованного через полимерный спейсер (КР<sub>6</sub>), эффективность биоконверсии оказалась выше (на хроматограмме отсутствуют пики олигомеров). Полученный набор продуктов (Рисунок 47 Б(2)) соответствует реакции гидролиза поли(С) в растворе в течение 15 минут (Рисунок 45(3)). Таким образом, реакция деградации поли(С) с использованием гетерогенного биокатализатора КР<sub>6</sub> в режиме зонального элюирования раствора субстрата при скорости потока  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$  протекает примерно в 30 раз быстрее, чем реакция в растворе. Время контакта фермента с субстратом в данных условиях составляет всего 30 секунд.

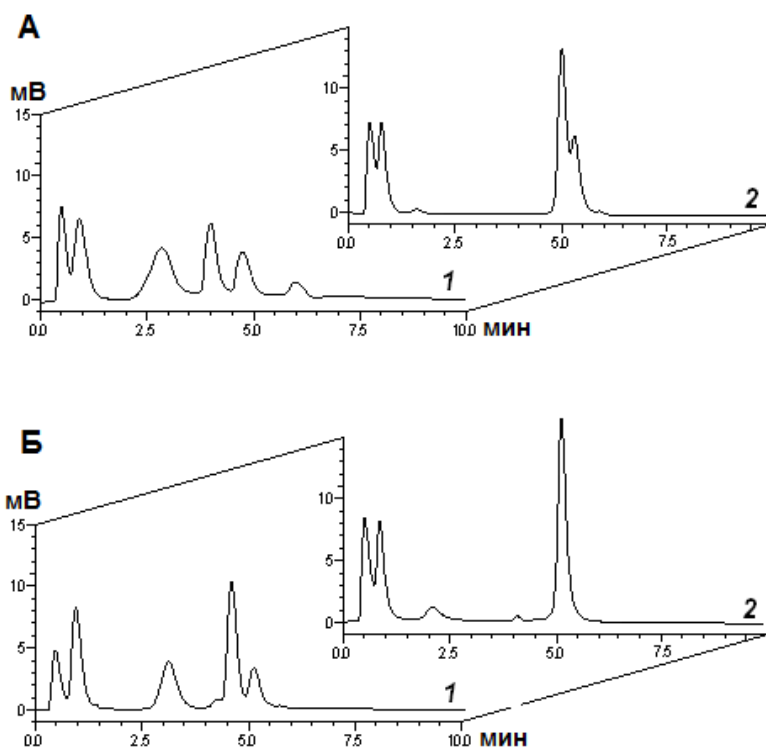


Рисунок 47 – Влияние температуры на глубину конверсии поли(С), катализируемой РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок прямым методом (А) и через спейсер (Б).

Обозначения: 1 – температура 22°C, 2 – температура 35°C.

Условия биокатализа: зональное элюирование, гетерогенные биокатализаторы КР<sub>5</sub> (А) и КР<sub>6</sub> (Б), объем раствора поли(С) – 0.5 мл, концентрация раствора поли(С) – 0.25 мг·мл<sup>-1</sup>, скорость подачи раствора субстрата 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>.

Условия ВЭЖХ: условия см. Рисунок 43.

Влияние объема вводимой пробы на ход каталитической деградации поли(С) оценивали путем введения двух различных объемов растворов субстрата (100 и 500 мкл) с равным количеством поли(С) (Рисунок 48). Было показано, что в случае фермента, иммобилизованного через полимерный спейсер (КР<sub>6</sub>), количество ЦМФ и олигонуклеотидов было практически одинаковым при введении обоих объемов пробы (Рисунок 48Б). В случае РНКазы, иммобилизованной посредством прямой реакции, деградация поли(С) эффективнее происходила при меньшем объеме раствора субстрата (100 мкл), что выражалось в уменьшении числа пиков, отвечающих продуктам гидролиза. В частности, наблюдалось исчезновение пика, расположенного на хроматограмме в области 6.2 мин (Рисунок 48А).

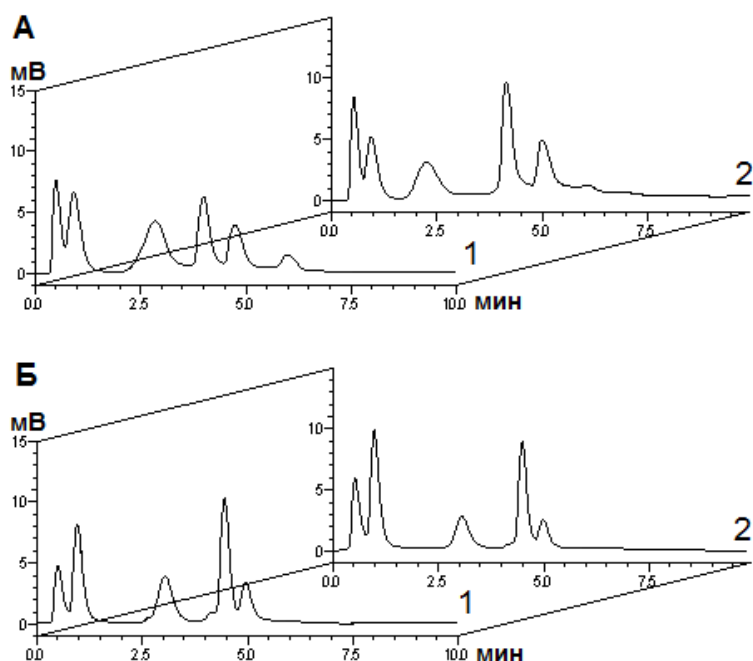


Рисунок 48 – Влияние объема вводимого раствора субстрата на глубину конверсии поли(С), катализируемой РНКазой А, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок прямым методом (А) и через спейсер (Б).

Обозначения: 1 – ввод раствора субстрата с концентрацией  $0.25 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  объемом 500 мкл, 2 – ввод раствора субстрата с концентрацией  $1.25 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$  объемом 100 мкл.

Условия биокатализа: зональное элюирование, гетерогенные биокатализаторы КР<sub>5</sub> (А) и КР<sub>6</sub> (Б), скорость подачи раствора субстрата  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ .

Условия ВЭЖХ: см. Рисунок 43.

Поскольку обсуждаемый ранее метод зонального введения субстрата не позволял достичь полного гидролиза поли(С), была проведена серия экспериментов по исследованию того же процесса, но в режиме рециркуляции раствора субстрата. На Рисунке 49 приведены хроматограммы смеси продуктов, полученных в режиме рециркуляции при использовании тех же гетерогенных биокатализаторов, а именно КР<sub>5</sub> и КР<sub>6</sub>. 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. Видно, что 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.

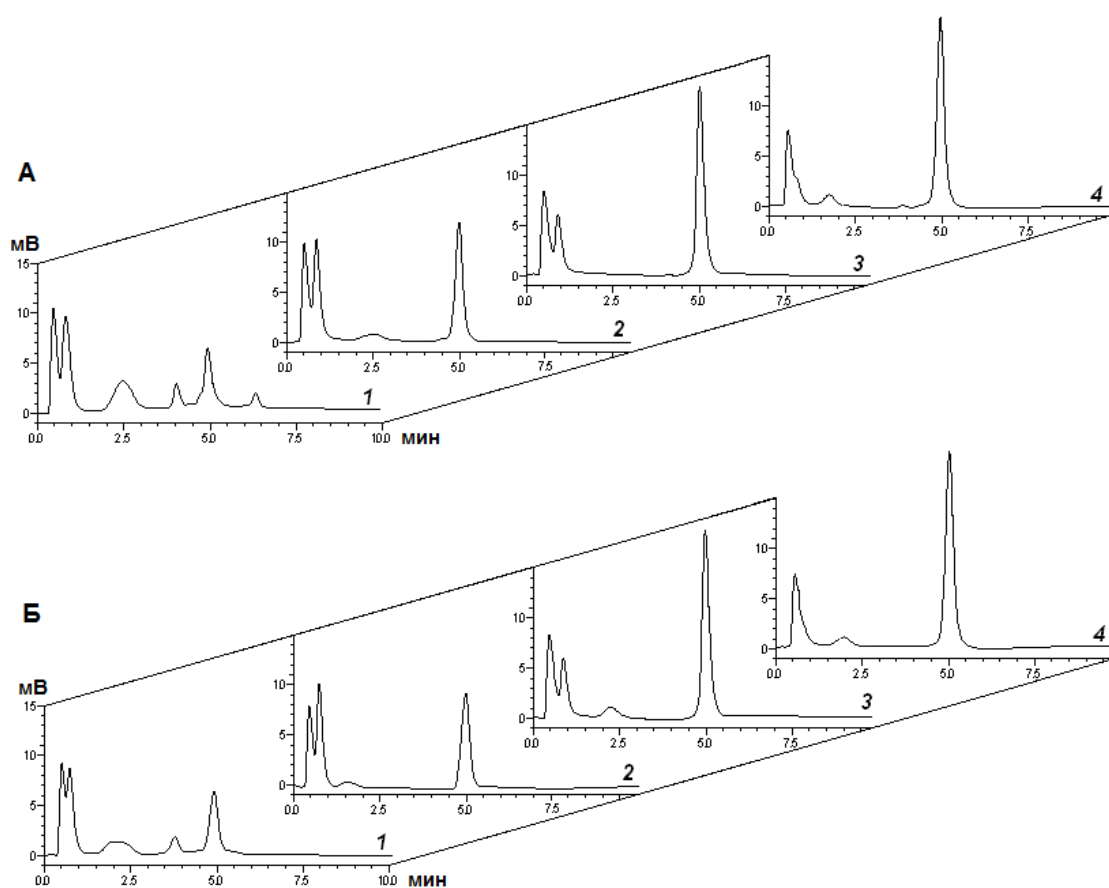


Рисунок 49 – Влияние времени рециркуляции на глубину конверсии поли(С), катализируемой РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок прямым методом (А) и через спейсер (Б).

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 КР<sub>5</sub> (А) и КР<sub>6</sub> (Б), объем раствора поли(С) – 3.0 мл, концентрация раствора поли(С) – 0.25 мг·мл<sup>-1</sup>, скорость подачи раствора субстрата 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>.

Условия ВЭЖХ: см. Рисунок 43.

### 3.5.3. Изучение ферментативной 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, образованными с участием пиримидиновых оснований.

Для оценки эффективности полученных гетерогенных биокатализаторов в качестве реакции сравнения использовали процесс ферментативной деградации РНК в растворе. Реакцию проводили в течение 1, 3, 7 и 30 минут и останавливали путем удаления фермента из реакционной среды. Результаты показали, что полный гидролиз РНК с помощью нативного

фермента протекал в течение 7 минут, что выразалось в идентичности хроматограмм для гидролизатов, полученных в результате более длительного времени (**Рисунок 50**).

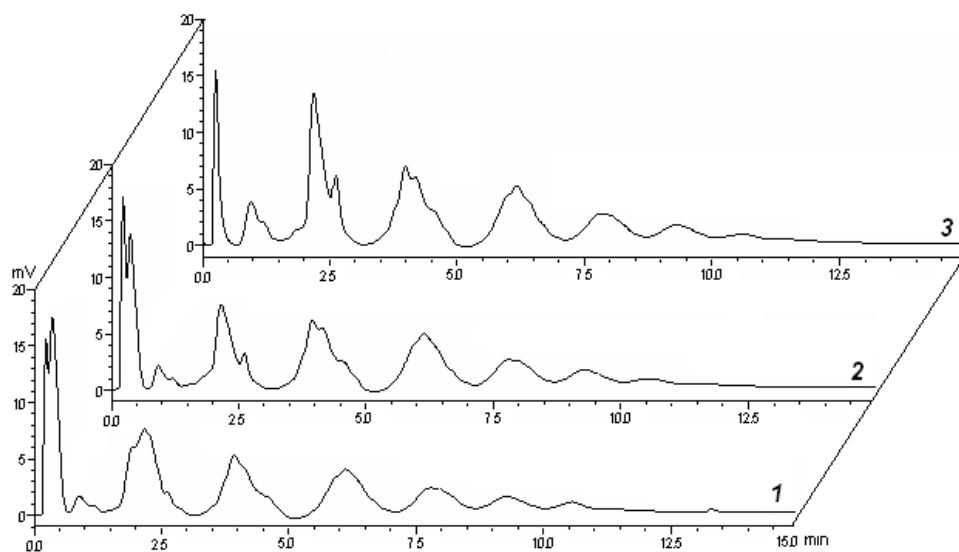


Рисунок 50 – Мониторинг процесса ферментативной деградации РНК в растворе.

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 мочеви́на, элюент Б – 1 М NaCl в элюенте А; скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>; концентрация РНК – 0.1 мг·мл<sup>-1</sup>; объем вводимой пробы – 10 мкл; линейный градиент 0 – 100% элюента Б за 15 минут.

Аналогичным образом проводился мониторинг продуктов гидролиза РНК, полученных с помощью иммобилизованной РНКазы. При этом варьировали такие параметры, как объем вводимой пробы, скорость подачи раствора субстрата и температура реакции.

Как обсуждалось ранее, увеличение скорости потока приводит к сокращению времени контакта фермента с субстратом. Однако в отличие от поли(С), при деградации РНК РНКазой, иммобилизованной на поверхности макропористых монолитных фаз, увеличение скорости потока раствора субстрата не сопровождалось изменением состава получаемых продуктов. Более того, при использовании гетерогенных биокатализаторов (КР<sub>5</sub> и КР<sub>6</sub>), содержащих РНКазу, иммобилизованную различными способами, эффективность гидролиза РНК была практически идентична (Рисунок 51). Установлено, что 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 (Рисунки 50 (3) и 51).

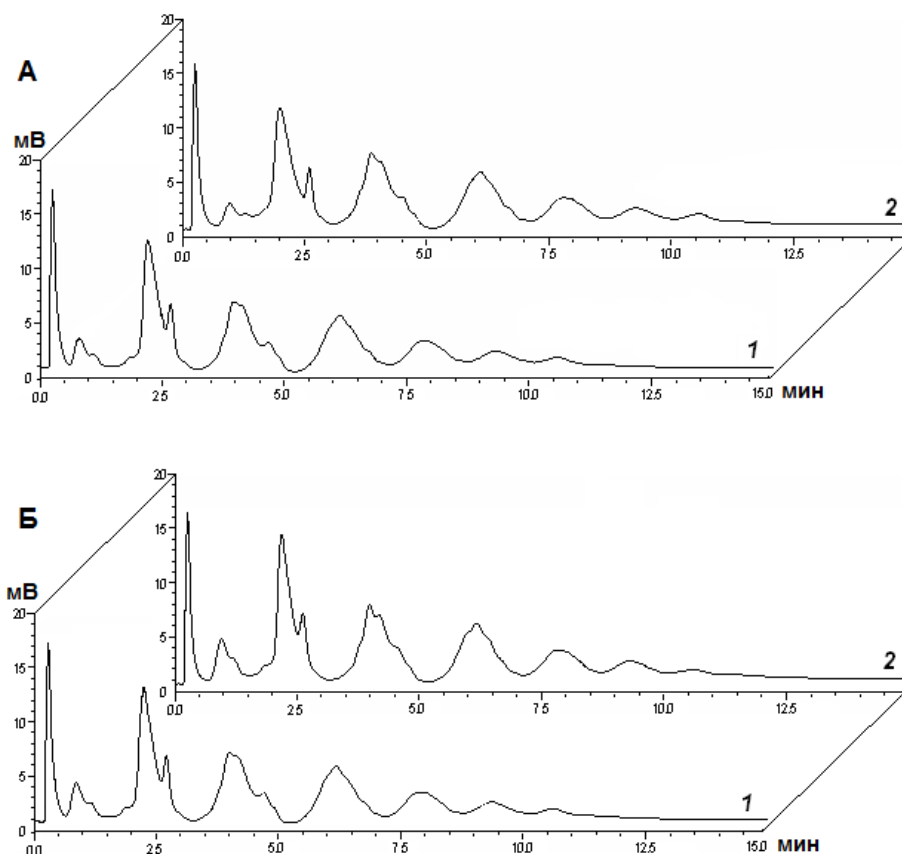


Рисунок 51 – Влияние скорости потока раствора субстрата на эффективность гидролиза РНК, катализируемого РНКазой, иммобилизованной прямым методом (А) и через спейсер (Б).

Обозначения: 1 – скорость потока 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>, 2 – скорость потока 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>.

Условия биокатализа: зональное элюирование, гетерогенные биокатализаторы КР<sub>5</sub> (А) и КР<sub>6</sub> (Б), объем раствора РНК – 0.5 мл, концентрация раствора РНК – 0.1 мг·мл<sup>-1</sup>, температура – 22°C.

Условия ВЭЖХ: см. Рисунок 50.

На Рисунке 52 приведены хроматограммы продуктов гидролиза РНК, полученных при использовании гетерогенных биокатализаторов при постоянной скорости потока раствора субстрата равной 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>, но при различной температуре, а именно 22 и 35°C. Очевидно, что увеличение температуры существенно не влияло на глубину гидролиза РНК. Полученные хроматограммы для обоих гетерогенных биокатализаторов совпадали с хроматограммой полного гидролизата РНК.

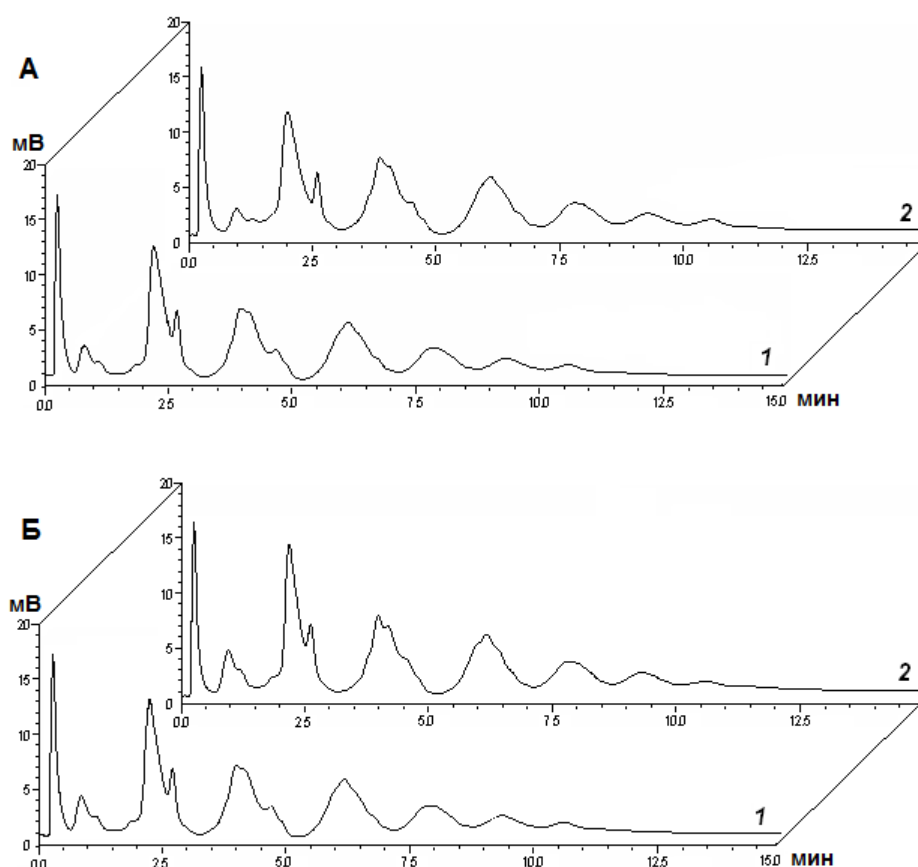


Рисунок 52 – Влияние температуры на эффективность гидролиза РНК с помощью рибонуклеазы А, иммобилизованной прямым методом (А) и через спейсер (Б).

Обозначения: 1 – температура 20°C, 2 – температура 35°C.

Условия биокатализа: зональное элюирование, гетерогенные биокатализаторы КР<sub>5</sub> (А) и КР<sub>6</sub> (Б), объем раствора РНК – 0.5 мл, концентрация раствора РНК – 0.1 мг·мл<sup>-1</sup>, скорость потока раствора субстрата – 1 мл·мин<sup>-1</sup>.

Условия ВЭЖХ: см. Рисунок 50.

#### 3.5.4. Изучение ферментативной деградации ксилана

Также как и в случае рибонуклеазы А для оценки эффективности полученных гетерогенных биокатализаторов проводили мониторинг образующихся в ходе реакции продуктов методом АО ВЭЖХ. Первоначально, на стадии оптимизации хроматографических условий в качестве маркеров были использованы высокомолекулярный субстрат (ксилан) и конечный продукт его деструкции (ксилоза). На Рисунке 53 отражено поведение выбранных стандартов в оптимальных условиях хроматографического процесса. Времена удерживания мономера и полимера составляли соответственно около 3.5 мин для ксилозы и 13 мин для ксилана.

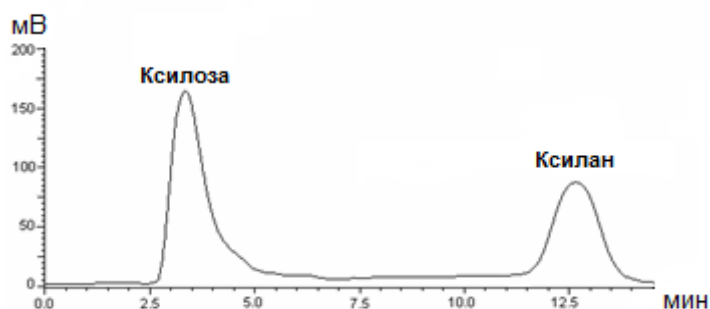


Рисунок 53 – Хроматограммы для ксилана и ксилозы, полученные методом ВЭЖХ с использованием анионообменных монолитных дисков.

Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный диск CIM DEAE (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 10 мМ натрий ацетатный буфер, pH 5.0, элюент Б – 2 М NaCl в элюенте А; скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>; концентрация пробы – 0.1 мг·мл<sup>-1</sup>; объем вводимой пробы – 10 мкл; линейный градиент 0-100% Буфера Б за 15 минут.

Перед изучением процесса каталитической деструкции ксилана с помощью полученных гетерогенных биокатализаторов исследовали данный процесс в растворе. Хроматограммы, отражающие протекание каталитической реакции с участием  $\beta$ -ксилозидазы и  $\beta$ -ксилаказы в растворе, представлены на Рисунках 54 и 55.

Так как  $\beta$ -ксилозидаза действует только на 1,4- $\beta$ -гликозидные связи между концевыми сахаридными остатками макромолекулы ксилана, ксилоза является единственным продуктом каталитической реакции. Как видно из полученных хроматограмм (Рисунок 54), в процессе каталитической реакции происходит постепенное уменьшение пика, отвечающего полимеру, в то время как пик, соответствующий ксилозе, со временем увеличивается. Полная деградация ксилана ксилозидазой в растворе занимала около 120 минут.

Поскольку  $\beta$ -ксилаказа является эндогенным ферментом и катализирует деградацию ксилана с образованием набора ксилоолигосахаридов с различной длиной цепи, которые в процессе дальнейшей деградации гидролизуются до мономера (ксилоза). В результате ВЭЖХ мониторинга было показано, что полная деградация ксилана ксиланазой в растворе завершалась в течение 60 минут (Рисунок 55).



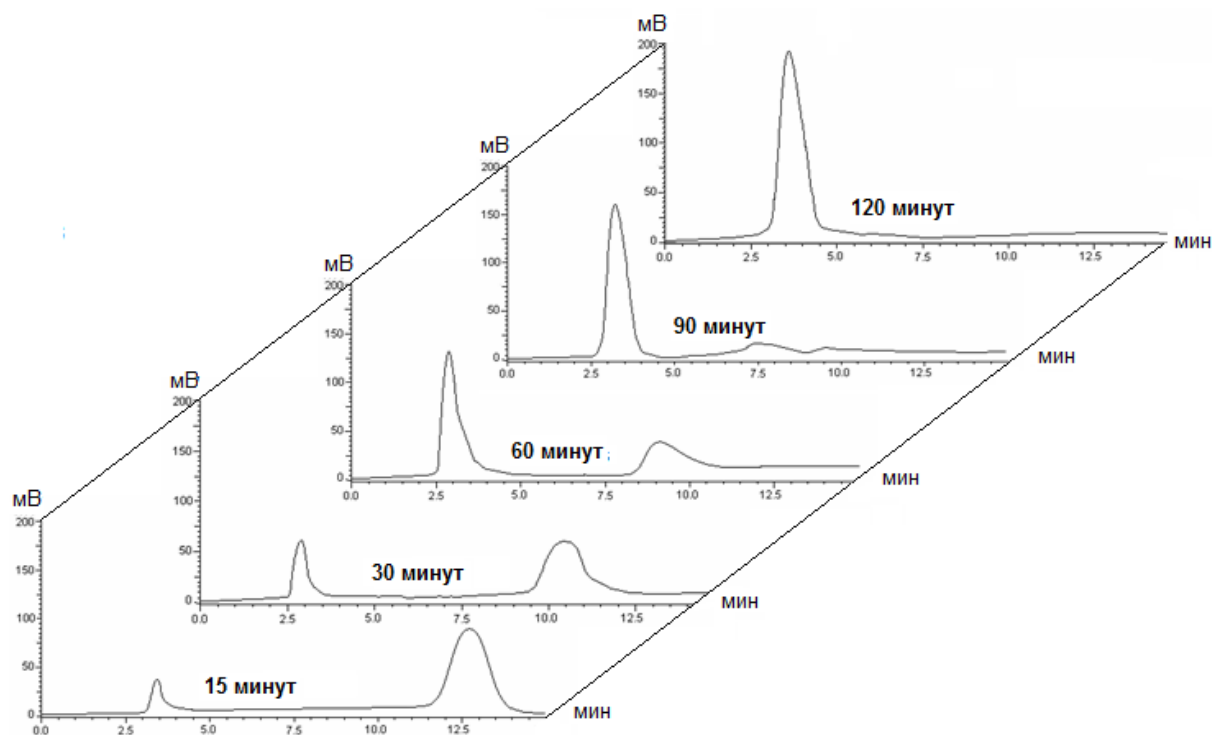


Рисунок 54 – Мониторинг деградации ксилана  $\beta$ -ксилозидазой в растворе методом ВЭЖХ с использованием анионообменных монокристаллических дисков.

*Условия биокатализа:* объем реакционной смеси – 1 мл, количество ксилана в реакционной смеси – 1 мг, количество  $\beta$ -ксилозидазы в реакционной смеси – 0.025 мг, температура – 37°C, время реакции – 150 минут.

*Условия ВЭЖХ:* см. Рисунок 53.

При анализе хроматограмм, полученных для реакции деполимеризации ксилана с помощью гетерогенных биокатализаторов, результаты хорошо соотносились с таковыми, найденными для реакции в растворе, а также с кинетическими параметрами, рассчитанными для данных реакций (см. п. 3.4). На основании подсчета площадей пиков, отвечающих ксилозе, были построены графики, отражающие накопление ксилозы в реакционной смеси в ходе реакции (Рисунок 56). Хроматографический анализ показал, что полная конверсия ксилана в ксилозу при использовании растворенной ксилозидазы протекала более чем за 120 минут. В то же время, при аналогичном соотношении фермент/субстрат полная деструкция ксилана с помощью гетерогенного биокатализатора КК<sub>2</sub> (с низкой загрузкой фермента) завершалась за 90 минут. В течение этого времени степень конверсии ксилана в растворе составляла только 70%. При использовании гетерогенного биокатализатора КК<sub>1</sub> (с высоким содержанием фермента) время полной деполимеризации составило 150 минут.

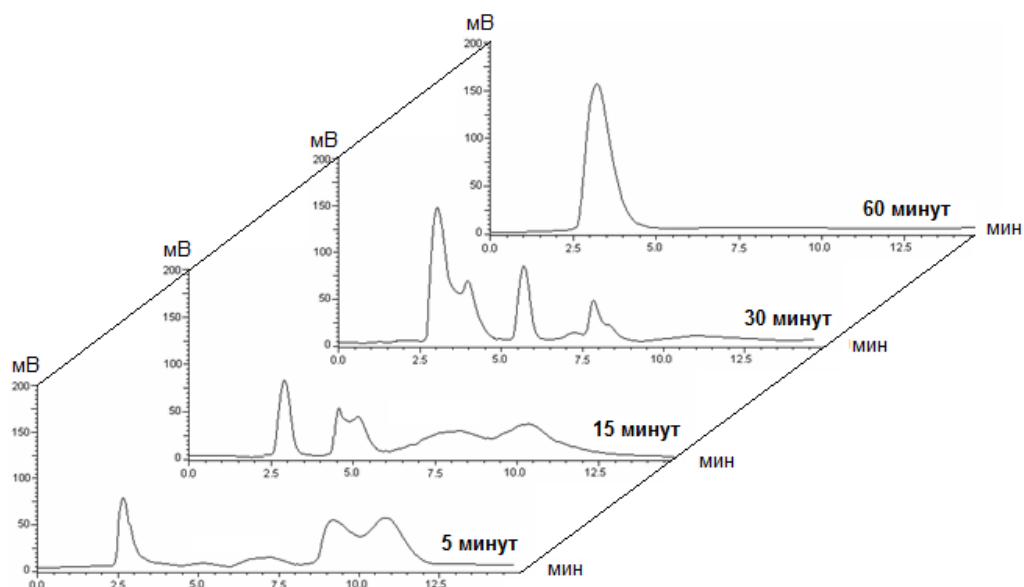


Рисунок 55 – Мониторинг деградации ксилана  $\beta$ -ксилазой в растворе методом ВЭЖХ с использованием анионообменных монолитных дисков.

Условия биокатализа: объем реакционной смеси – 1 мл, количество ксилана в реакционной смеси – 0.5 мг, количество  $\beta$ -ксилозидазы в реакционной смеси – 0.15 мг, температура – 22°C, время реакции – 60 минут.

Условия ВЭЖХ: см. Рисунок 53.

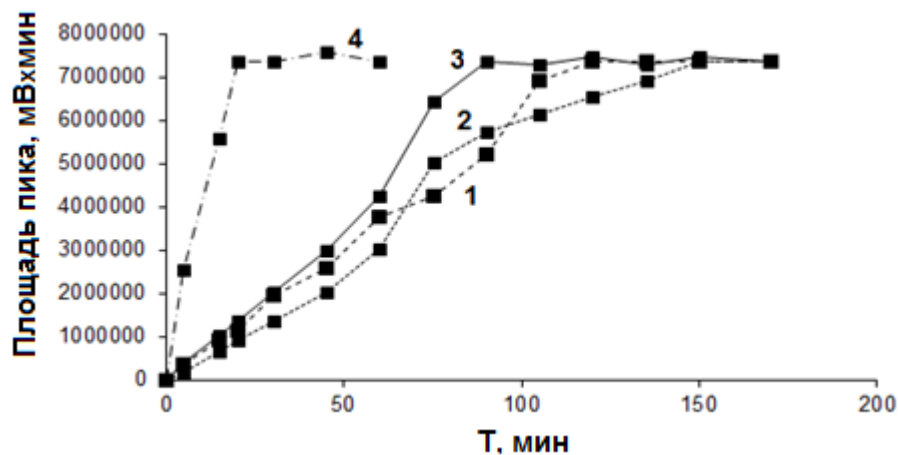


Рисунок 56 – Зависимость площади пика, отвечающего ксилитозе, от времени деградации ксилана  $\beta$ -ксилозидазой.

Обозначения: 1 – деградация ксилана ксилозидазой в растворе; 2 – деградация ксилана с помощью гетерогенного биокатализатора КК<sub>1</sub>; 3 – деградация ксилана с помощью гетерогенного биокатализатора КК<sub>2</sub>; 4 – деградация ксилана с помощью комбинации гетерогенных биокатализаторов ДК<sub>4</sub> + КК<sub>2</sub>.

Условия биокатализа: режим рециркуляции, объем раствора ксилана – 3.0 мл, концентрация раствора ксилана – 1.0 мг·мл<sup>-1</sup>, скорость подачи раствора субстрата 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>, температура – 37°C.

Аналогичный анализ был проведен для обоих гетерогенных биокатализаторов на основе ксиланазы (КК<sub>3</sub> и ДК<sub>4</sub>), а также для реакции в растворе (**Рисунок 57**). 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.

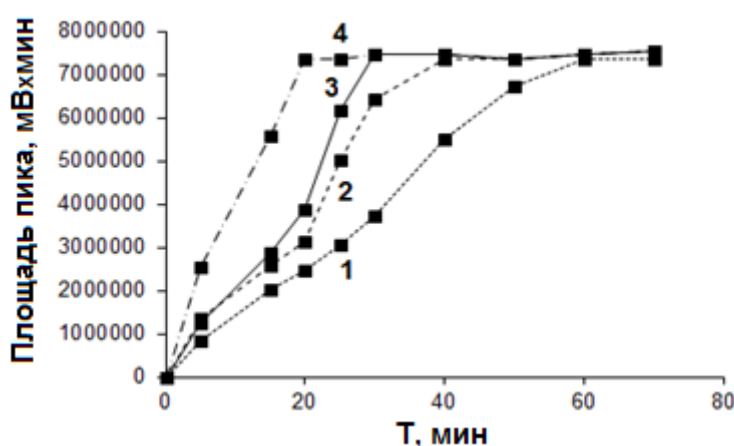


Рисунок 57 – Зависимость площади пика, отвечающего ксилозе, от времени деградации ксилана  $\beta$ -ксилазой.

Обозначения: 1 – деградация ксилана ксиланазой в растворе, 2 – деградация ксилана с помощью гетерогенного биокатализатора КК<sub>3</sub>; 3 – деградация ксилана с помощью гетерогенного биокатализатора ДК<sub>4</sub>; 4 – деградация ксилана с помощью комбинации гетерогенных биокатализаторов ДК<sub>4</sub> + КК<sub>2</sub>.

Условия биокатализа: режим рециркуляции, объем раствора ксилана – 3.0 мл, концентрация раствора ксилана –  $1.0 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , скорость подачи раствора субстрата  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ , температура –  $37^\circ\text{C}$ .

Так как процесс деградации высокомолекулярных соединений занимает довольно длительное время, совместное действие экзо- и эндогидролаз является предпочтительным для более эффективной их деструкции. В частности, для получения ксилозы из ксилана комбинируют действие ксиланазы и ксилозидазы. В данной работе, для повышения эффективности деструкции ксилана была исследована возможность совместного использования двух гетерогенных биокатализаторов, содержащих ксиланазу и ксилозидазу, соответственно. Для этого были выбраны наиболее эффективные гетерогенные биокатализаторы, а именно ДК<sub>4</sub> и КК<sub>2</sub>, которые соединялись последовательно через небольшой переходник, после чего встраивались в хроматографическую систему низкого давления (Рисунок 58).

Субстрат пропускали через обе колонки в режиме рециркуляции в течение определенного времени для достижения полной конверсии ксилана. Таким образом, раствор субстрата сначала протекал сквозь макропористый монолитный диск, содержащий иммобилизо-

ванную ксиланазу, которая расщепляла ксилан до набора ксилоолигосахаридов. Полученные олигомеры затем поступали в колонку, несущую иммобилизованную ксилозидазу, где подвергались дальнейшей деградации. На основе полученных хроматограмм было показано, что полный процесс деградации ксилана при использовании комбинированной системы гетерогенных биокатализаторов (ДК<sub>4</sub> + КК<sub>2</sub>), завершается в течение 20 минут, что было в 2 раза быстрее, чем реакция, катализируемая иммобилизованной ксиланазой (ДК<sub>4</sub>), и в 4.5 раза быстрее, чем деструкция с помощью иммобилизованной ксилозидазы (КК<sub>2</sub>) (Рисунки 56, 57).

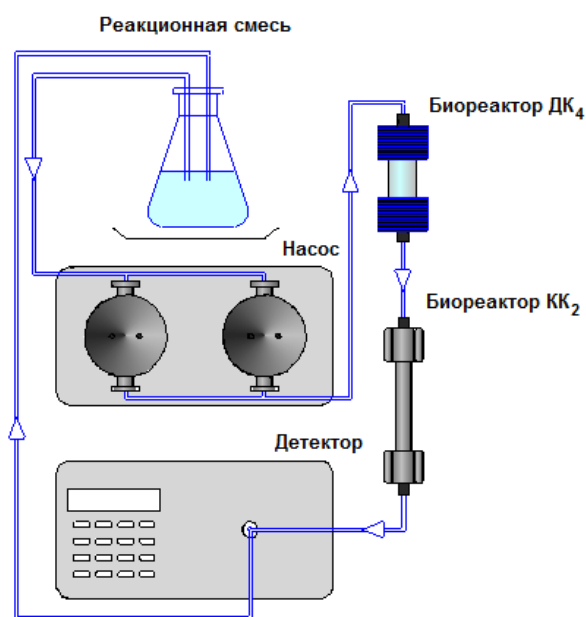


Рисунок 58 – Схема процесса деградации ксилана с использованием двух биореакторов.

### 3.5.5. Изучение ферментативной деградации поли(молочной кислоты)

На первом этапе данной части работы было проведено исследование ряда ферментов для реакции деградации ПМК. В качестве объектов исследования были выбраны несколько видов гидролитических ферментов подкласса эстераз, а именно липазы из различных источников и эстераза. В частности, были использованы липаза из *Candida rugosa*, липаза из поджелудочной железы быков и эстераза из свиной печени.

Во всех случаях соотношение фермент/субстрат поддерживалось одинаковым. Каталитические реакции проводили в условиях, близких к физиологическим, то есть при pH 7.4 и температуре 37°C. В случае использования липазы из *Candida rugosa* был дополнительно приготовлен раствор с повышенным в 10 раз содержанием фермента, а также в буферном растворе с pH 9.0 (pH оптимум). Кроме того, в связи с тем, что ПМК нестабильна при щелочных значениях pH среды и может разлагаться на олигомерные составляющие, была также рассмотрена реакция без участия ферментов в щелочном буферном растворе при pH 9.4.

Анализ продуктов деградации ПМК проводили разработанным методом ВЭЖХ с использованием синтезированной макропористой монолитной колонки на основе сополимера ЛМА-ЭДМА (МЛ<sub>6</sub>). Пример полученных хроматограмм, отражающих протекание процесса деградации ПМК с участием липазы из *Candida rugosa*, представлен на Рисунке 59. На основе анализа полученных хроматограмм очевидно, что по мере деградации ПМК происходит уменьшение содержания полимера в растворе, что выражается в уменьшении площади пика, отвечающего ПМК на хроматограмме (см. область 20.5 мин).

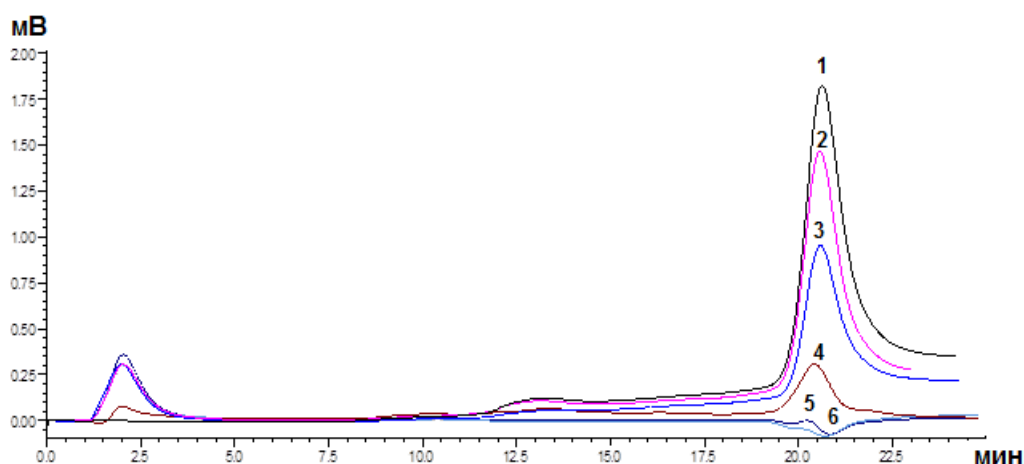


Рисунок 59 – Гидролиз ПМК с помощью липазы из *Candida rugosa*.

Обозначения: 1 – исходный полимер; 2 – деградация ПМК в течение 3 часов; 3 – 8 часов; 4 – 24 часов; 5 – 48 часов; 6 – 72 часа.

Условия ВЭЖХ: 0 – 5 минут – вода, 5 – 25 минут – 0 – 100% ацетонитрила; скорость потока 0.5 мг·мл<sup>-1</sup>; стационарная фаза – монолитная колонка С12 (Мл<sub>6</sub>); петля ввода пробы – 20 мкл; длина волны детектирования 210 нм.

Зависимость площади пика ПМК от времени ее деполимерзации с участием выбранных ферментов представлена на Рисунке 60. Установлено, что в случае липазы из *Candida rugosa* деградация ПМК этим ферментом протекает наиболее эффективно при использовании оптимального для него рН среды, а именно 9.0. При использовании условий, близких к физиологическим, активность фермента существенно снижалась. В отличие от других аналогичных процессов, полной деградации ПМК в течение 72 часов в данном случае достичь не удалось. Однако при увеличении количества фермента в 10 раз удалось достичь удовлетворительных результатов даже при рН 7.4. В случае использования липазы и эстеразы животного происхождения в условиях близких к физиологическим, процесс деградации ПМК протекал удовлетворительно при малом количестве фермента в растворе. В связи с тем, что процесс деградации ПМК в щелочной среде без участия ферментов протекает очень медленно,

им можно пренебречь при изучении гидролиза ПМК с помощью ферментных систем (Рисунок 60 (кривые 5 и 6)).

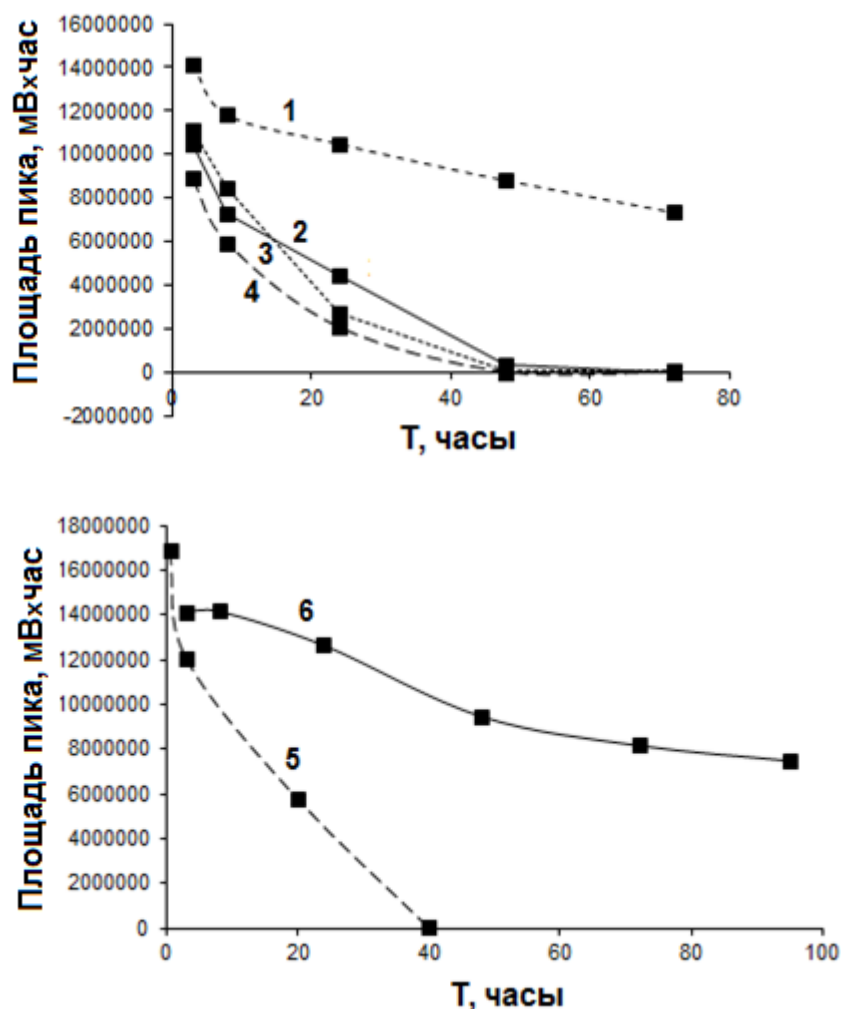


Рисунок 60 – Зависимости количества ПМК в реакционной среде от времени деградации.

Обозначения: 1 – деградация ПМК липазой (*Candida rugosa*)  $m = 40$  мкг, 2 – деградация ПМК липазой (*Pancreatic*)  $m = 40$  мкг; 3 – деградация ПМК липазой (*Candida rugosa*)  $m = 400$  мкг, 4 – деградация ПМК эстеразой  $m = 40$  мкг, 5 – деградация ПМК липазой (*Candida rugosa*)  $m = 40$  мкг; 6 – деградация ПМК в щелочном буфере без ферментов.

Условия биокатализа: объем реакционной смеси 0.4 мл; С (ПМК) = 0.5 мг/мл; pH 7.4 (кривые 1 – 4, 6), pH 9.0 (5);  $T = 37^{\circ}\text{C}$ .

Дополнительно, была рассчитана степень деградации ПМК при протекании реакции в течение 24 часов (Рисунок 61). На основе полученных данных, очевидно, что наибольшей эффективностью в биодеструкции ПМК характеризовались эстераза и липаза животного происхождения. Таким образом, для получения гетерогенного биокатализатора была выбрана эстераза.

Исследование свойств гетерогенного биокатализатора в реакции гидролиза ПМК проводили в режиме рециркуляции раствора субстрата сквозь стационарную фазу с иммобили-

зованным ферментом. Реакцию проводили при комнатной температуре при скорости потока раствора субстрата  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$ . На основании анализа хроматограмм, иллюстрирующих процесс деградации ПМК ферментами во времени, для исследования кинетических характеристик фермента было выбрано время реакции 5 часов. По завершении реакции полученные продукты анализировали разработанным методом ВЭЖХ. По данным, полученным при об-счете площадей пиков на хроматограммах, была построена кривая Михаэлиса-Ментен. Зна-чения константы Михаэлиса и активности иммобилизованного и свободного фермента, а также каталитическая константа и соотношение  $k_{cat}/K_M$  были оценены при линеаризации по-лученной кривой гидролиза по методу Хейнса. Рассчитанные значения кинетических пара-метров для нативного и иммобилизованного фермента сведены в Таблицу 21.

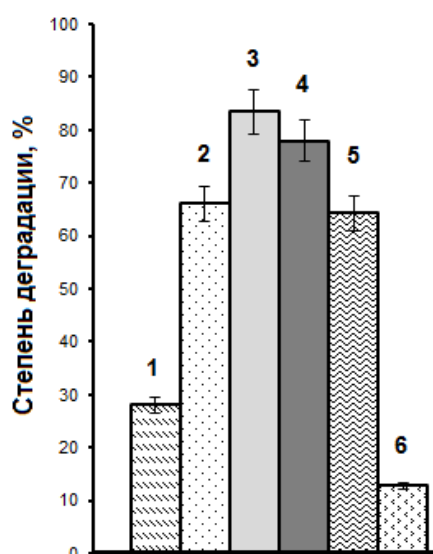


Рисунок 61 – Степень деградации ПМК за 24 часа каталитической реакции.

Обозначения: см. Рисунок 60.

Условия биокатализа: см. Рисунок 60.

Таблица 21 – Кинетические параметры гидролиза ПМК, катализируемого нативной и иммобилизованной эстеразой

Условия реакции: метод рециркуляции субстрата, концентрация субстрата варьировалась интервале  $0.1\text{--}1.60 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ , температура  $37^\circ\text{C}$ , объем реакционной смеси – 3 мл, скорость потока подвижной фазы (10 мМ фосфатный, pH 7.5)  $1.0 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$

Биокатализатор	$K_M$ , мМ	$A_{y0}$ , мкмоль $\cdot$ мин $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$	$k_{cat}$ , мин $^{-1}$	$k_{cat}/K_M$ , мин $^{-1}$ $\cdot$ мМ $^{-1}$
Эстераза в растворе	0.15	940	152	1013
Иммобилизованная эстераза (ДЭ <sub>1</sub> )	0.11	596	96	878

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 наблюдалось падение активности иммобилизованного фермента и значения  $k_{cat}$  на 37%, а соотношения  $k_{cat}/K_M$  на 17%.

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

В последнее время создание методических тандемов, совмещающих химический и аналитический процессы, вызывает огромный интерес широкого круга исследователей. Очевидно, что при объединении хроматографических методов анализа продуктов с процессом биоконверсии возникает, во-первых, возможность *on-line* контроля протекания каталитической реакции, а, во-вторых, возможность сокращения времени процесса в целом.

#### **3.6.1. Разработка хроматографического биокаталитического реактора на основе рибонуклеазы А**

Рибонуклеаза А является одним из широко востребованных в биотехнологии ферментов, используемым для удаления примесей РНК при производстве рекомбинантных продуктов, а также в фармацевтической промышленности с целью получения препаратов терапевтического уровня чистоты. Как упоминалось ранее, использование иммобилизованных ферментов представляет собой более технологичный способ применения биокатализа в промышленности.

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. С этой целью биореактор 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 62).

Разработанные ранее оптимальные условия деградации полирибонуклеотидов, а также разработанные методы хроматографического анализа позволили комбинировать данные индивидуальные стадии в один процесс. Так как буферные растворы для гидролиза высокомолекулярного субстрата поли(С) и анализа продуктов его деградации были одинаковы, процесс протекал в две стадии: (1) деструкция субстрата и (2) разделение продуктов методом градиентной анионообменной хроматографии.



На Рисунке 63 приведены хроматограммы ферментативной деградации поли(С), подтверждающие высокую эффективность разработанного метода. Выход целевого продукта, цитидин-3'-монофосфата, составлял 91 и 95% для прямой иммобилизации (КР<sub>5</sub>) и иммобилизации через спейсер (КР<sub>6</sub>), соответственно. Загрузка раствора субстрата в количестве 100 и 300 мкл показала, что при данных объемах процесс гидролиза протекал практически одинаково.

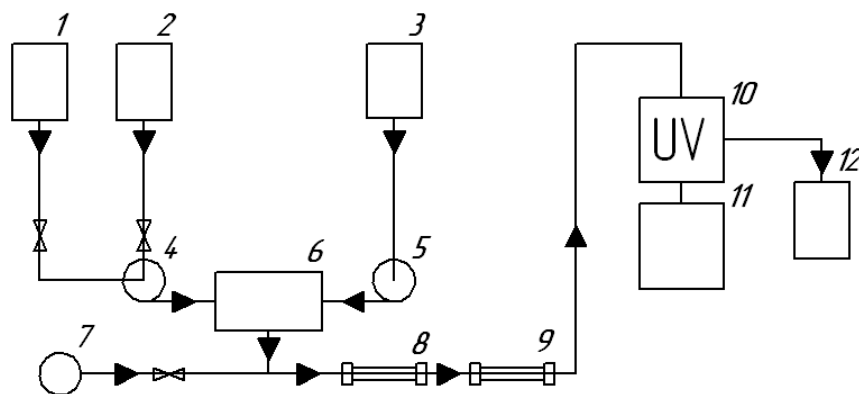


Рисунок 62 – Схема хроматографического реактора для биокатализа и *on-line* мониторинга продуктов реакции.

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.

Так же, как и в случае гидролиза поли(С), аналогичный процесс был разработан для деструкции РНК. В противоположность поли(С), где один и тот же буферный раствор используется как для стадии биокатализа, так и для стадии анализа, в случае РНК буферные растворы для гидролиза и сепарации имели различный состав. Вследствие этого, в случае деструкции РНК *on-line* процесс проводили в три этапа: (1) деградация РНК в буферном растворе А (элюент А), (2) уравнивание хроматографической системы буферным раствором для разделения (элюент Б) и (3) градиентное элюирование продуктов деградации РНК (элюент В).

Оптимальные условия деградации РНК и ВЭЖХ-мониторинга продуктов были использованы в качестве сравнения для оценки эффективности *on-line* процесса. Было показано, что эффективность биокаталитического и сепарационного процессов в условиях *on-line* процесса была одинакова для обоих гетерогенных биокатализаторов (КР<sub>5</sub> и КР<sub>6</sub>) и совпадала с таковой для *off-line* варианта анализа (Рисунок 64). Также как и при деструкции поли(С), увеличение количества загружаемого раствора субстрата от 100 до 300 мкл не приводило к качественным различиям в хроматограммах, характеризующих *on-line* процесс.

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. Модельная смесь содержала белок (БСА), РНК и ДНК. Хроматограммы, иллюстрирующие разделение исходной модельной смеси и гидролизата РНК, полученного при обработке данной смеси РНКазой в растворе, представлены на Рисунке 64. Вследствие того, что РНК расщепляется значительно быстрее, чем поли(С) как нативным, так и иммобилизованным ферментом, можно было предположить, что деструкция РНК в режиме зонального элюирования может быть достигнута и с помощью гетерогенного биокатализатора в форме диска. Таким образом, в случае гетерогенного биокатализа использовали как колонки (КР<sub>5</sub>, КР<sub>6</sub>), так и диски (ДР<sub>1</sub>, ДР<sub>2</sub>), содержащие иммобилизованную РНКазу.

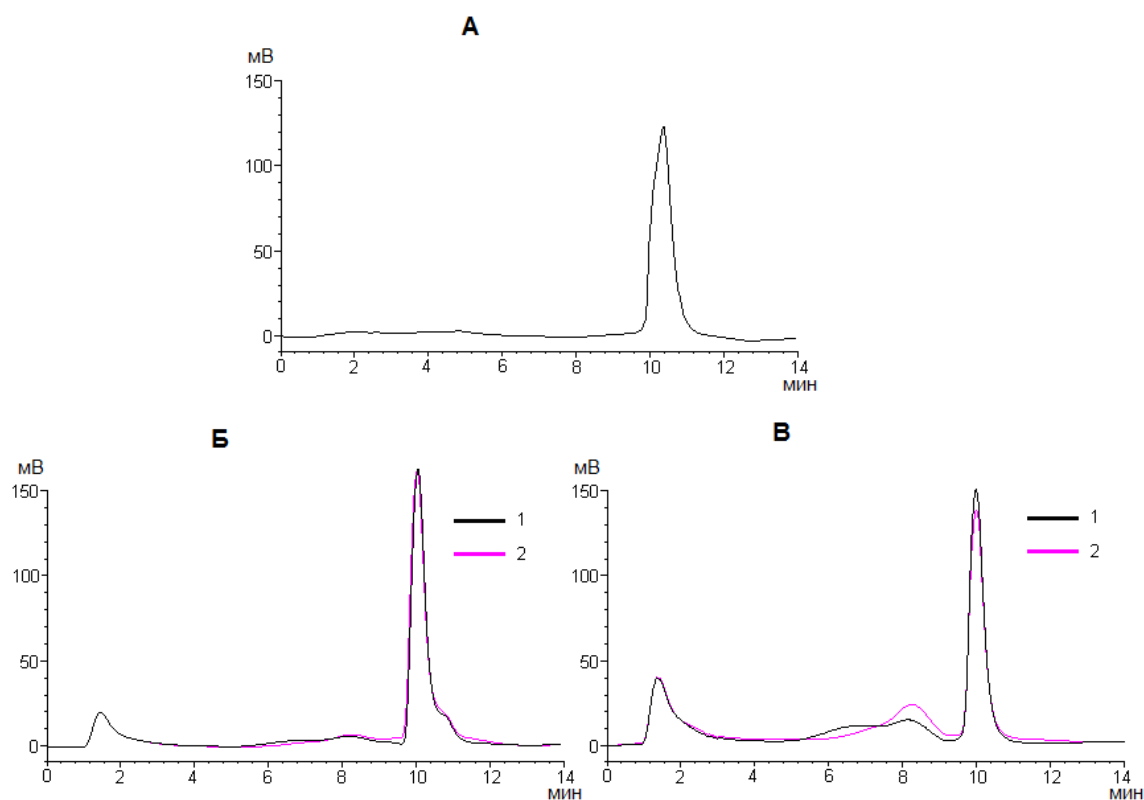


Рисунок 63 – Деградация поли(С) и *on-line* мониторинг продуктов реакции.

Обозначения: А – анализ продукта реакции, протекающей в растворе (эксперимент сравнения), В – анализ продуктов, полученных с использованием гетерогенных биокатализаторов КР<sub>5</sub> (1) и КР<sub>6</sub> (2), В – анализ продуктов, полученных с использованием гетерогенных биокатализаторов ДР<sub>1</sub> (1) и ДР<sub>2</sub> (2).

Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный СИМ DEAE диск (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, элюент Б – 1 М NaCl в элюенте А; скорость потока подвижной фазы – 0.5 мл·мин<sup>-1</sup>, концентрация поли(С) – 0.125 мг·мл<sup>-1</sup>, объем раствора субстрата – 100 мкл; градиент: 0–5 минут – элюент А (каталитическая реакция), 5–35 минут – линейный градиент 0-100% элюент Б (разделение продуктов).

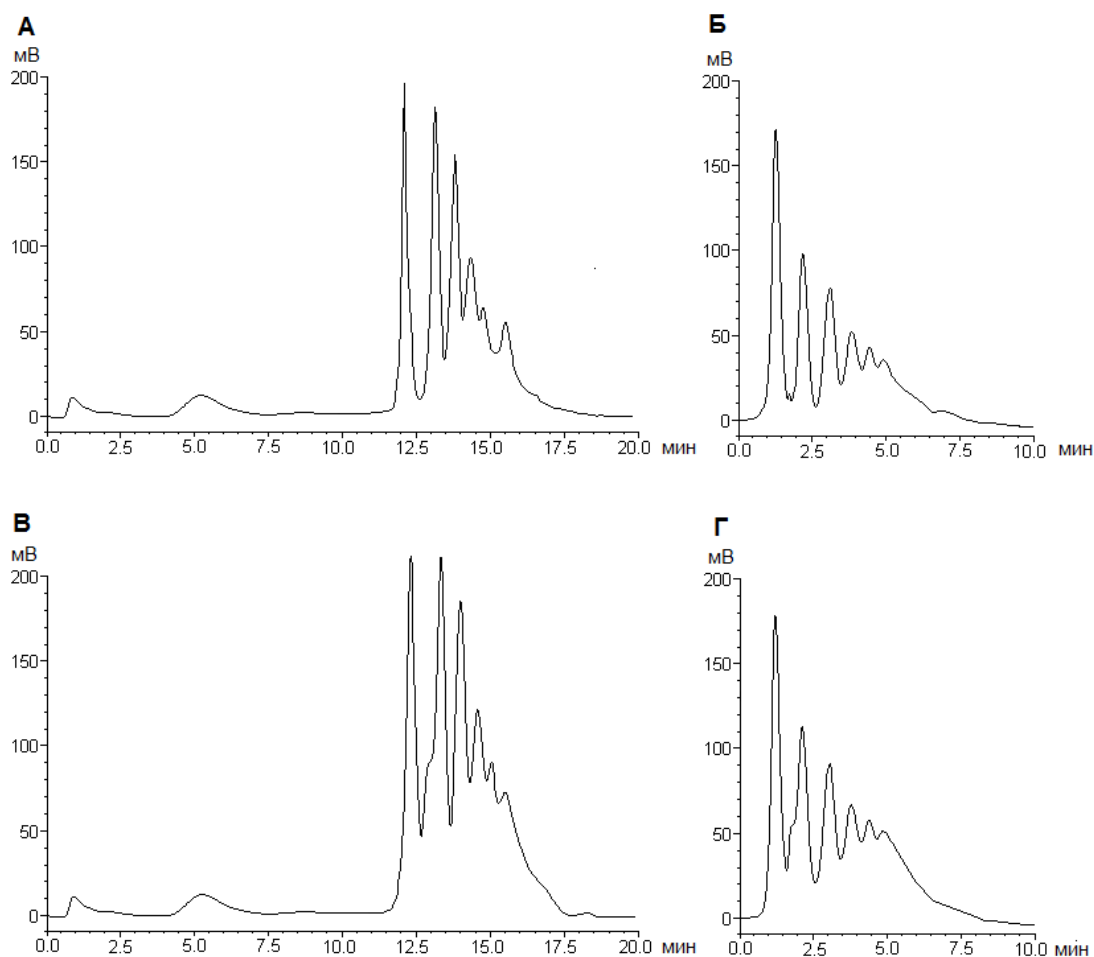


Рисунок 64 – Деградация РНК и *on-line* мониторинг продуктов реакции.

Обозначения: *A, B* – прямая иммобилизации фермента; *B, Г* – иммобилизация через спейсер; *A, B* – *on-line* мониторинг образующихся продуктов; *B, Г* – *off-line* анализ продуктов.

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, элюент Б – 7 М раствор мочевины в элюенте А, рН 7.5, элюент В – 1 М NaCl в элюенте Б; градиент (А, Б) : 0–5 минут – элюент А (каталитическая реакция); 5 - 10 минут – уравнивание стационарной фазы элюентом Б; 10 - 20 минут – линейный градиент 0-100% элюентом В (разделение продуктов); градиент (В, Г): 0 - 10 минут – линейный градиент 0-100% элюент В (разделение продуктов); скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>; количество загружаемой РНК – 0.1 мг в 100 мкл.

На Рисунках 66 и 67 представлены хроматограммы, иллюстрирующие проведение процессов биокатализа и ВЭЖХ мониторинга продуктов реакции в *off-* и *on-line* режимах для гетерогенных биокатализаторов в форме колонок и дисков, соответственно. Анализируя полученные хроматограммы, во всех случаях можно констатировать исчезновение пика, отвечающего нативной РНК, и появление серии пиков, отвечающих набору образующихся после деградации РНК олигонуклеотидов. Более того, можно констатировать практически полную идентичность *off-* и *on-line* хроматограмм.

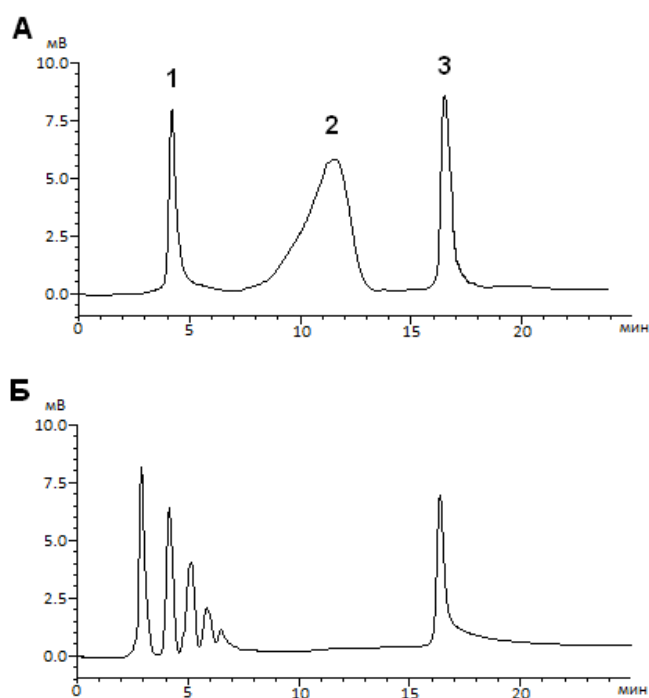


Рисунок 65 – Хроматограммы компонентов модельной биологической смеси (А) и продуктов деструкции РНК, полученных в ходе реакции в растворе (Б).

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-НСl, 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<sup>-1</sup>; объем вводимой пробы – 100 мкл; скорость потока подвижной фазы – 1.0 мл·мин<sup>-1</sup>.

Сравнение хроматограмм, полученных для биокаталитических систем на основе колонок и дисков, позволяет заключить, что при использовании гетерогенных биокатализаторов в форме дисков, процесс протекает не полностью. В частности, в данном случае наблюдается присутствие выраженного «горба» в области 6-8 минут для *off-line* и 16-18 минут для *on-line* процесса. Данный результат может объясняться необходимостью большей длины стационарной фазы с иммобилизованным ферментом для реализации более полного расщепления высокомолекулярного субстрата в режиме зонального элюирования. При использовании диска с РНКазой, иммобилизованной через макромолекулярный спейсер, в гидролизате наблюдается присутствие большего количества низкомолекулярных фрагментов (увеличение высоты первых трех пиков), из чего можно сделать заключение о более эффективном протекании каталитической реакции. Стоит отметить, что эффект введения спейсера нивелируется при увеличении длины слоя твердой фазы, т.е. при использовании монолитных колонок.

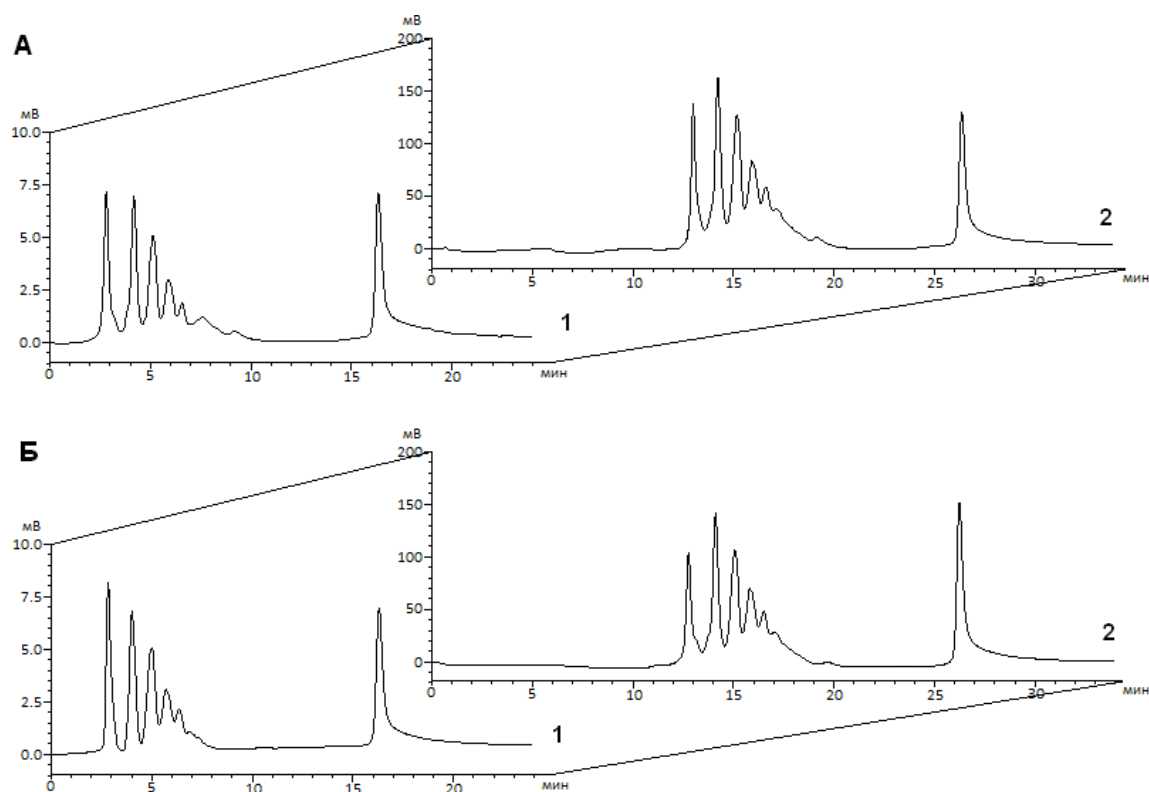


Рисунок 66 – Деструкция РНК рибонуклеазой А, иммобилизованной на поверхности монолитных колонок.

Обозначения: А – гетерогенный биокатализатор КР<sub>5</sub>, Б – гетерогенный биокатализатор КР<sub>6</sub>; 1 – *off-line* анализ, 2 – *on-line* анализ.

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Трис-НСl, 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 65.

Таким образом, было показано, что полученные гетерогенные биокатализаторы оказались эффективны для деструкции РНК в многокомпонентной смеси, причем остальные компоненты не оказывали влияния на процесс биоконверсии целевого компонента. Наиболее эффективными для данного процесса при использовании зонального введения субстрата оказались гетерогенные биокатализаторы в форме колонок.

Исследованные каталитические системы характеризовались высокой стабильностью. Активность иммобилизованной РНКазы определялась повторно для каждого образца реактора через 6 месяцев, включающих более 200 циклов гидролиза. Причем использование достаточно агрессивных подвижных фаз, например, элюента, содержащего 7 моль·л<sup>-1</sup> мочевины и 1 моль·л<sup>-1</sup> NaCl, не приводило к падению активности иммобилизованного фермента.

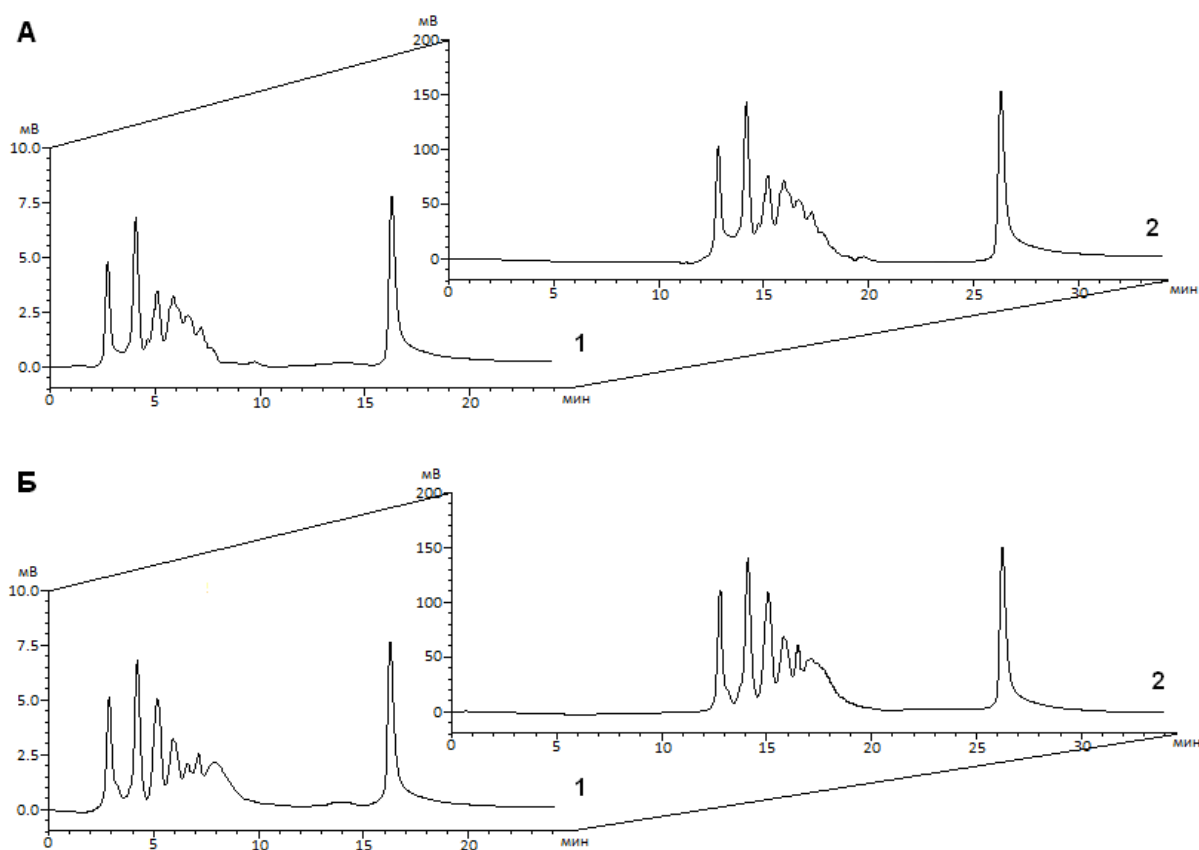


Рисунок 67 – *Off-* и *on-line* мониторинг процесса деструкции РНК, катализируемой РНКазой, иммобилизованной на поверхности монолитных дисков.

Обозначения: *A* – гетерогенный биокатализатор ДР<sub>1</sub>, *B* – гетерогенный биокатализатор ДР<sub>2</sub>; 1 – *off-line* анализ, 2 – *on-line* анализ.

Условия ВЭЖХ: см. Рисунок 66.

### 3.6.2. Разработка хроматографического биокаталитического реактора на основе ксиланолитических ферментов

Ксилоза является одним из востребованных в промышленности сырьевых ресурсов при получении, например, ксилита, ароматических продуктов или кормов для животных. Однако все известные способы ее образования из ксилансодержащего сырья включают в себя обработку химическими реагентами, нейтрализацию полученной смеси, а также последующую многостадийную очистку получаемого продукта. Альтернативным вариантом является ферментативная деградация ксилана при использовании гетерогенных биокатализаторов.

Для проведения процесса деградации ксилана с последующим *on-line* анализом продуктов биокаталитической реакции была получена система, состоящая из комбинации двух гетерогенных биокатализаторов ДК<sub>4</sub> и КК<sub>2</sub>, несущих иммобилизованные  $\beta$ -ксиланазу и  $\beta$ -ксилозидазу, в совокупности с аналитическим диском. Монолитные колонки были последовательно встроены в систему ВЭЖХ с помощью коротких капиллярных адаптеров, как пока-

зано на Рисунке 68. Разработанные ранее оптимальные условия проведения хроматографического анализа продуктов каталитической реакции были успешно адаптированы для *on-line* процесса.

Так как *on-line* мониторинг проводился в условиях зонального элюирования субстрата, полного гидролиза ксилана достичь не удалось. Тем не менее, было показано, что 20 минутный процесс, реализованный согласно представленной на Рисунке 68 схеме, позволил достичь 47%-го выхода ксилозы, а также получить смесь ксилоолигосахаридов (Рисунок 68).

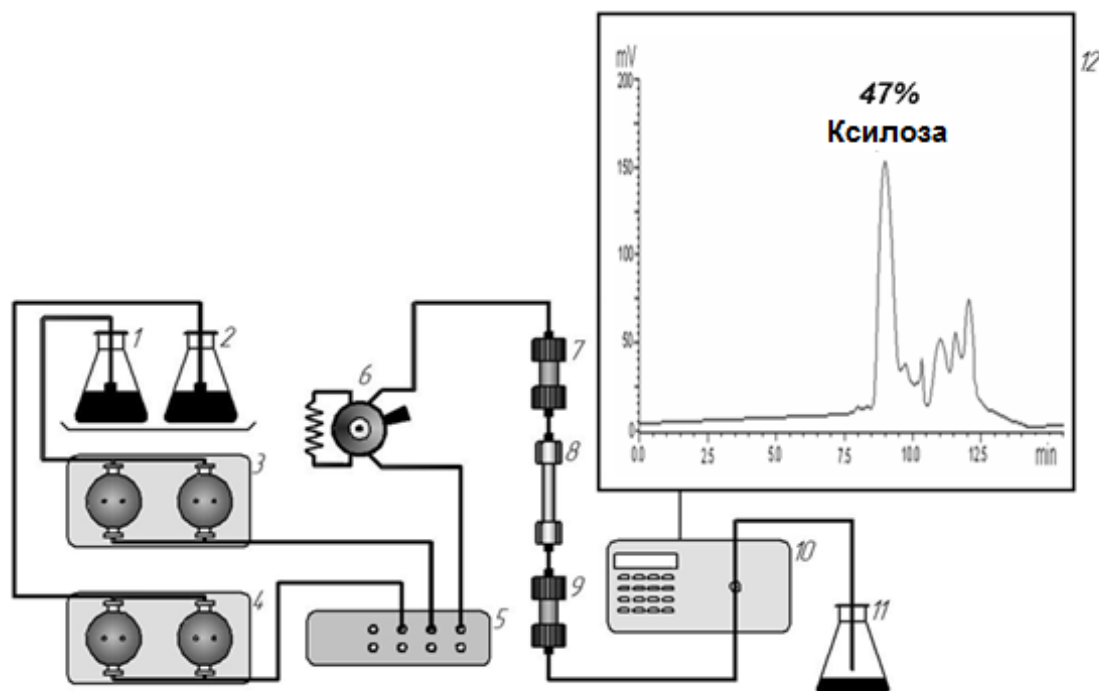


Рисунок 68 – Схема установки для *on-line* проведения процесса деградации ксилана с помощью системы гетерогенных биокатализаторов.

Обозначения: 1, 2 – элюенты; 3, 4 – насосы; 5 – смеситель; 6 – инжектор; 7 –  $\beta$ -ксилазная диск IMER; 8 –  $\beta$ -ксилозидазная колонка IMER; 9 – аналитический CIM DEAE диск; 10 – УФ-детектор; 11 – сток; 12 – хроматограмма *on-line* процесса.

Условия ВЭЖХ: стационарная фаза – монолитный диск CIM DEAE (диаметр 12 мм, толщина 3 мм); подвижная фаза: элюент А – 20 мМ Na-ацетатный буфер, pH 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 –  $1.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

Стоит отметить, что активность ксиланазы, иммобилизованной на поверхности монолитного диска, и ксилозидазы, ковалентно связанной с поверхностью монолитной колонки, была повторно измерена спустя пять месяцев после получения гетерогенных биокатализаторов и их непрерывного применения (более 150 циклов). При этом снижение активности для иммобилизованной ксилозидазы составляло 7%, а для ксиланазы – 5%, что, безусловно, мо-

жет быть оценено как незначительное, а полученные гетерогенные биокатализаторы могут быть охарактеризованы как высокостабильные.

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

Поли(молочная кислота) является биоразлагаемым, биосовместимым, алифатическим полиэфиром. ПМК применяется для производства экологически чистой биоразлагаемой упаковки, одноразовой посуды, средств личной гигиены. Ввиду своей биосовместимости, данный полимер также широко применяется в медицине, для производства хирургических нитей и штифтов, а также в системах доставки лекарств. ПМК была выбрана в качестве модели биodeградируемого полимера для оценки возможности применения гетерогенного биокатализа для изучения процессов биodeградации материалов медицинского назначения. 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. Графики, иллюстрирующие процесс биodeградации наночастиц, представлены на Рисунке 69.

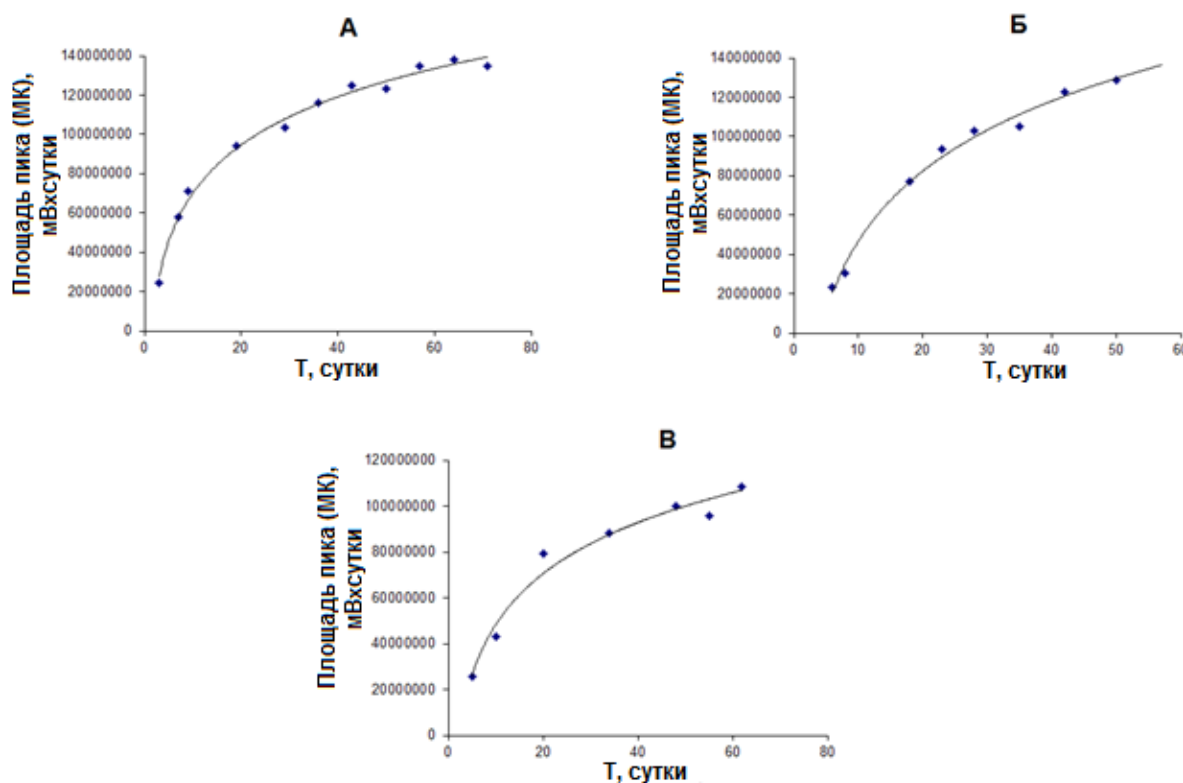


Рисунок 69 – Графики зависимости площади пика, отвечающего молочной кислоте, от времени протекания каталитической реакции: (А) деградация наночастиц нативной эстеразой, (Б) деградация наночастиц иммобилизованной эстеразой, (В) деградация наночастиц в плазме крови.



Степень деградации наночастиц на основе ПМК оценивали посредством расчета выделившейся в ходе реакции молочной кислоты, которую отделяли из реакционной среды методом ультрафильтрации. Анализ полученных продуктов проводили разработанным методом АО ВЭЖХ. В противоположность ПМК, полная деградация которой происходит в течение 2-3 дней, процесс биodeградации наночастиц на основе ПМК как в искусственной среде, так и в плазме крови занимает около 50 дней. Данный результат можно объяснить плотной упаковкой полимерных молекул в составе частиц, в результате чего ферменту необходимо последовательно расщеплять сначала внешний слой полимерной частицы, а затем уже внутреннюю часть микросферы. Кроме того, использование стабилизаторов в процессе получения частиц создает дополнительный барьер, препятствующий образованию специфического комплекса фермент-субстрат на начальных стадиях процесса.

На основе полученных графиков можно заключить, что выбранные модельные условия, как с участием нативного, так и иммобилизованного фермента, позволили получить сопоставимые результаты, хорошо коррелирующие с процессом естественной деградации полимера в плазме крови человека. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность применения разработанных гетерогенных каталитических систем в процессах изучения деградации биополимеров медицинского назначения.

## 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 выразилось 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 ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Kuraishi, C. Transglutaminase: Its utilization in the food industry/ C. Kuraishi, K.Yamazaki, Y. Susa // *Food Rev. Int.* - 2001. - V.17. - P. 221–246.
- [2] Collar, C. Effects of enzyme associations on bread dough performance. A response surface analysis/ C. Collar, J. C. Martinez, P. Andreu, E. Armero // *Food Sci. Technol. Int.* - 2000. - V. 6.- P. 217–226.
- [3] Liang, J.F. Biomedical application of immobilized enzymes / J.F. Liang, Y.T. Li, V.C.Yang // *J. Pharm. Sci.* - 2000. - V. 89. - P. 979–990.
- [4] Lei, X.G. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection / X.G. Lei, C. H. Stahl // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*- 2001. - V.57. - P. 474–481.
- [5] Schmid, J. Industrial biocatalysis today and tomorrow / J. Schmid, S. Dordick, B. Hauer, Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt // *Nature.* - 2001. - V. 409. - P. 258–268.
- [6] Диксон, М. Ферменты. В 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб - В. - Пер. с англ. - М.: Мир, 1982. - 1 т.
- [7] Хохлов, А.С. Химические регуляторы биологических процессов / А.С. Хохлов, Ю. А. Овчинников. - М.: Знание, 1969. - С. 144.
- [8] Волькенштейн, М. В. К теории ферментативного катализа /М. В. Волькенштейн, Р. Р. Догондзе, А. К. Мадумаров, З. Д. Урушадзе, Ю.И.Харкац // *Молекулярная Биология.* -1972. - Т. 6, № 3. - С. 431—439.
- [9] Диксон, М. Ферменты. В 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб - В. - Пер. с англ. - М.: Мир, 1982. - 2 т.
- [10] Розенгарт, В. И. Ферменты - двигатели жизни / В. И. Розенгарт. - М.:Наука, 1983 - С.160.
- [11] Браунштейн, А.Е. Номенклатура ферментов / А.Е. Браунштейн - М.: ВИНТИ, 1979. - С. 321.
- [12] Фершт, Э. Структура и механизм действия ферментов. Пер. с англ. / Э.Фершт. - М.: Мир, 1980. - С. 432.
- [13] Schwender, J. Plantmetabolicnetworks / J. Schwender. - NewYork: Springer, 2009. - P. 331.
- [14] Северин, Е.С. Биохимия: Учеб. для вузов / Е.С. Северин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. - С. 779.
- [15] Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry / A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox.- New York: Worth Publishers, 1993. - P. 1013.

- [16] Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme / E. Fischer // *Angew. Chemie.* -1894. - V. 27. - P. 2985–2993.
- [17] Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis / D. E. Koshland // *Proc. Natl. Acad. Sci.* -1958. - V. 44. - P. 98–104.
- [18] Березин, И. В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И.В. Березин, А.А. Клёсов. - М.: Наука, 1974. - С. 324.
- [19] Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics* / A. Cornish-Bowden. - London: Portland Press, 2004. - P. 422.
- [20] Maini, P.K. A Century of Enzyme Kinetics: Reliability of the  $K_M$  and  $V_{MAX}$  estimates/ P.K. Maini and S. Schnell // *Comments Theor. Biol.* - 2003. - V. 8. - P. 169–187.
- [21] Tischer, W. *Immobilized Enzymes: Methods and Applications* / W. Tischer, F. Wedekind. - 1999. - V. 200. - P. 95-126.
- [22] Березин, И.О. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы. В 2 т./ И.О. Березин. - М.: Наука, 1976. - 1 т.
- [23] Brena, B. Immobilization of enzymes: a literature survey / B. Brena, P. González-Pombo, F. Batista-Viera // *Immobil. Enzym. Cells.* -2013. - V. 1051. - P. 15–31.
- [24] Klibanov, M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts / M. Klibanov // *Science.* - 1983. - V. 219. - P. 722–727.
- [25] Туркова, Я. Аффинная хроматография. Пер. с англ. / Я. Туркова. - М.: Мир, 1980. - С. 472.
- [26] Klibanov, M. Enzyme stabilization by immobilization / M. Klibanov // *Anal. Biochem.* - 1979. - V. 93. - P. 1–25.
- [27] Barrias, C.C. Adsorption of a therapeutic enzyme to self-assembled monolayers: Effect of surface chemistry and solution pH on the amount and activity of adsorbed enzyme / C.C. Barrias, M.C.L. Martins, M.C.S. Miranda, M.A. Barbosa // *Biomaterials* - 2005. - V. 26. - P. 2695–2704.
- [28] Albertini, V.P. Performance of invertase immobilized on glass-ceramic supports in batch bioreactor / V.P. Albertini, P.G. Cadena, J.L. Silva, G. Nascimento, L.S. Reis, V.N. Freire, R.P. Santos, J.L. Martins, B.S. Cavada, R.P.J. Neto, M.C.B. Pimentel, C.R. Martínez, L.F. Porto, J.L. Lima Filho // *Chem. Eng. J.* - 2012. - V. 187. - P. 341–350.
- [29] Cruz, J.C. Conformational changes and catalytic competency of hydrolases adsorbing on fumed silica nanoparticles: II. Secondary structure / J.C. Cruz, P.H. Pfromm, J.M. Tomich, M.E. Rezac // *Colloids Surf. B Biointerfaces* - 2010. - V. 81.- P. 1–10.

- [30] Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 1998. - С. 704.
- [31] Bernfeld, P. Antigens and Enzymes Made Insoluble By Entrapping Them Into Lattices of Synthetic Polymers / P. Bernfeld, J. Wan // *Science* - 1963. - V. 142. - P. 678–679.
- [32] Wadiak, D.T. Kinetic behavior of microencapsulated beta-galactosidase / D.T. Wadiak, R.G. Carbonell // *Biotechnol. Bioeng.* - 1975. - V. 17. - P. 1157–1181.
- [33] Cabral, J.M.S. Immobilization studies of whole microbial cells on transition metal activated inorganic supports / J.M.S. Cabral, J.M. Novais, J.F. Kennedy // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1986. - V. 23. - P. 157–162.
- [34] Means, G.E. Chemical modifications of proteins: history and applications / G.E. Means, R.E. Feeney // *Bioconjug. Chem.* - 1990. - V. 1. - P. 2–12.
- [35] Vlakh, E.G. Flow-through immobilized enzyme reactors based on monoliths: I. Preparation of heterogeneous biocatalysts / E.G. Vlakh, T.B. Tennikova // *J. Sep. Sci.* - 2013. - V. 36. - P. 110–127.
- [36] Perfetti, R.B. The chemical modification of papain with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide / R.B. Perfetti, C.D. Anderson, P.L. Hall // *Biochemistry* - 1976. - V. 15. - P. 1735–1743.
- [37] Matyash, L.F. Modification of carboxyl groups in pepsin / L.F. Matyash, O.G. Ogloblina, V.M. Stepanov // *Eur. J. Biochem.* - 1973. - V. 35. - P. 540–545.
- [38] Hermanson, G.T. Immobilised affinity ligand techniques / G.T. Hermanson, A.K. Mallia, P.K. Smith. - New York: Academic Press, 1992. - P. 454.
- [39] Османов, В.К. Инженерная энзимология: Уч. пос. / В.К. Османов, О.В. Бирюкова, А.В. Борисов, Г.Н. Борисова, Ж.В. Мацулевич. - Нижний Новгород: Изд. - во Нижегородской государственной медицинской академии, 2005. - С. 74.
- [40] Penzol, G. Use of dextrans as long and hydrophilic spacer arms to improve the performance of immobilized proteins acting on macromolecules / G. Penzol, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, L. Rodes, J.M. Guisan // *Biotechnol. Bioeng.* - 1998. - V. 60. - P. 518–523.
- [41] Guiseley, K.B. Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization / K.B. Guiseley // *Enzyme Microb. Technol.* - 1989. - V. 11. - P. 706–716.
- [42] Tosa, T. Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix / T. Tosa, T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida, I. Chibata // *Biotechnol. Bioeng.* - 1979. - V. 21. - P. 1697–1709.

- [43] Gerbsch, N. New processes and actual trends in biotechnology / N. Gerbsch, R. Buchholz // *FEMS Microbiol. Rev.* - 1995. - V. 16. - P. 259–269.
- [44] Itoyama, K. Lipoprotein lipase immobilization onto porous chitosan beads / K. Itoyama, S. Tokura, T. Hayashi // *Biotechnol. Prog.* - 2008. - V. 10. - P. 225–229.
- [45] Vorlop, K.D. Entrapment of microbial cells in chitosan / K.D. Vorlop, J. Klein // *Methods Enzymol.* - 1987. - V. 135. - P. 259–268.
- [46] Porath, J. Immobilization of enzymes to agar, agarose, and sephadex support / J. Porath, R. Axén // *Methods Enzymol.* - 1976. - V. 44. - P. 19–45.
- [47] Kohn, J. The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins / J. Kohn, M. Wilchek // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 1984. - V. 9. - P. 285–305.
- [48] Gemeiner, P. Biochemical engineering of biocatalysts immobilized on cellulosic materials / P. Gemeiner, V. Stefuca, V. Bales // *Enzyme Microb. Technol.* - 1993. - V. 15. - P. 551–566.
- [49] Carleysmith, S.W. Kinetic Behavior of Immobilized Penicillin Acylase / S.W. Carleysmith, P. Dunnill, M.D. Lilly // *Biotechnol. Bioeng.* - 1980. - V. 22. - P. 735 - 756.
- [50] Koilpillai, L. Immobilization of penicillin G acylase on methacrylate polymers / L. Koilpillai, R. Gadre, S. Bhatnagar, R.C. Raman, S. Ponrathnam, K K. Kumar, G.R. Ambekar, J.G. Shewale // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* - 1990. - V. 42. - P. 173–182.
- [51] Scouten, W.H. Solid phase biochemistry, analytical and synthetic aspects / W.H. Scouten. - New York: Wiley, 1983. - P. 796.
- [52] Burtreau, N. Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase / N. Burtreau, S. Burton, R.R. Crichton // *FEBS Lett.* - 1989. - V. 258. - P. 185–189.
- [53] Richards, F.M. Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent / F.M. Richards, J.R. Knowles // *J. Mol. Biol.* - 1968. - V. 37. - P. 231–233.
- [54] Magario, I. Non-porous magnetic micro-particles: Comparison to porous enzyme carriers for a diffusion rate-controlled enzymatic conversion / I. Magario, X. Ma, A. Neumann, C. Syltatk, R. Hausmann // *J. Biotechnol.* - 2008. - V. 134. - P. 72–78.
- [55] Jabbari, S. Specificity enhancement towards phenolic substrate by immobilization of laccase on surface plasmon resonance sensor chip / S. Jabbari, B. Dabirmanesh, K. Khajeh // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2015. - V. 121. - P. 32 - 36.
- [56] Liu, J. Reversed Phase Monolithic Column Based Enzyme Reactor for Protein Analysis / J. Liu, F.-J. Wang, Z.-B. Zhang, H.-F. Zou // *Chin. J. Anal. Chem.* - 2013. - V. 41. - P. 10 - 14.

[57] Nichele, V. Beta-Galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance / V. Nichele, M. Signoretto, E. Ghedini // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2011. - V. 71. - P. 10 - 15.

[58] Rodrigues, M. Cerqueira, M.R.F. Use of poly(methyl methacrylate)/polyethyleneimine flow microreactors for enzyme immobilization / M. Rodrigues, M.R.F. Cerqueira, M.S.F. Santos, R.C. Matos, I.G.R. Gutz, L. Angnes // *Microchem. J.* - 2015. - V. 118. P. 231–237.

[59] González-Sáiz, J.M. Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters / J.M. González-Sáiz, C. Pizarro // *Eur. Polym. J.* - 2001. - V. 37. - P. 435–444.

[60] Unger, K.K. W Evaluation of advanced silica packings for the separation of biopolymers by high-performance liquid chromatography II. Performance of non-porous monodisperse 1.5- $\mu\text{m}$  Silica beads in the separation of proteins by reversed-phase gradient elution high-performance liquid chromatography / K.K. Unger, G. Jilge, J.N. Kinkel, M.T.W. Hearn // *J. Chromatogr.* - 1986. - V. 359. - P. 61-72.

[61] Janzen, R. Evaluation of advanced silica packings for the separation of biopolymers by high-performance liquid chromatography. IV. Mobile phase and surface-mediated effects on recovery of native proteins in gradient elution on non-porous, monodisperse 1.5-microns / R. Janzen, K.K. Unger, H. Giesche, J.N. Kinkel, M.T. Hearn // *J. Chromatogr.* - 1987. - V. 397. - P. 81–89.

[62] Horváth, C. Band spreading in liquid chromatography: General plate height equation and a method for the evaluation of the individual plate height contributions / C. Horváth, H.-J. Lin // *J. Chromatogr. A* - 1978. - V. 149. - P. 43–70.

[63] Hashimoto, T. Non-porous hydrophilic resin-based packings for the separation of biopolymers / T. Hashimoto // *J. Chromatogr.* - 1991. - V. 544. - P. 257–265.

[64] Fulton, S.P. Very High Speed Separation of Proteins with a 20- $\mu\text{m}$  Reversed-Phase Sorbent / S.P. Fulton, N.B. Afeyan, N.F. Gordon, F.E. Regnier // *J. Chromatogr.* - 1991. - V. 547. - P. 452–456.

[65] Li, Y. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization / Y. Li, F. Gao, W. Wei, J.B. Qu, G.H. Ma, W.Q. Zhou // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2010. - V. 66. - P. 182–189.

[66] Iwata, H. Adsorption characteristics of an immobilized metal affinity membrane / H. Iwata, K. Saito, S. Furusaki, T. Sugo, J. Okamoto // *Biotechnol. Prog.* - 1991. - V. 7. - P. 412–418.



- [67] Leonard, M. New packing materials for protein chromatography / M. Leonard // *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* - 1997. - V. 699. - P. 3–27.
- [68] Scheper, T. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* / T. Scheper, R. Freitag. - Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. - P. 255.
- [69] Li, W.C. Protein separation using non-porous sorbents / W.C. Li // *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* - 1997. - V. 699. - P. 29–45.
- [70] Chen, H. High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins / H. Chen, C. Horváth // *J. Chromatogr. A* - 1995. - V. 705. - P. 3–20.
- [71] Afeyan, N.B. Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of biomolecules: Perfusion chromatography / N.B. Afeyan, N.F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S.P. Fulton, Y.B. Yang, and F.E. Regnier // *J. Chromatogr.* - 1990. - V. 519. - P. 1–29.
- [72] Horvath, J. High-Performance Protein Separations with Novel Strong Ion-Exchangers / J. Horvath, E. Boschetti, L. Guerrier, N. Cooke // *J. Chromatogr. A* - 1994. - V. 679. - P. 11–22.
- [73] Liao, J.-L. Continuous beds for standard and micro high-performance liquid chromatography / J.-L. Liao, R. Zhang, S. Hjertén // *J. Chromatogr. A* - 1991. - V. 586. - P. 21–26.
- [74] Tennikova T.B. High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation / T.B. Tennikova, F. Svec, B.G. Belenkii // *J. Liq. Chromatogr.* - 1990. - V. 13. - P. 63–70.
- [75] Liao J.L. Preparation of continuous beds derivatized with one-step alkyl and sulfonate groups for capillary electrochromatography / J.L. Liao, N. Chen, C. Ericson, S. Hjertén // *Anal. Chem.* - 1996. - V. 68. - P. 3468–3472.
- [76] Tennikova, T.B. High-performance membrane chromatography: Highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes / T.B. Tennikova, F. Svec // *J. Chromatogr.* - 1993. - V. 646. - P. 279–288.
- [77] Josic, D. High-performance membrane chromatography and plasma membrane proteins of serum / D. Josic, J. Reusch // *J. Chromatogr. A* - 1992. - V. 590. - P. 59–76.
- [78] Podgornik, A. Application of Very Short Monolithic Columns for Separation of Low and High Molecular Mass Substances / A. Podgornik, M. Barut, S. Jaksa, J. Jancar, A. Strancar // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* - 2002. - V. 25. P. 3099–3116.
- [79] Maksimova, E. HPLC analysis of synthetic polymers on short monolithic columns / E. Maksimova, E. Vlakh, E. Sinitsyna, T. Tennikova, // *J. Sep. Sci.* - 2013. - V. 36. - P. 3741–3749.

- [80] Vodopivec, M. A Podgornik, M Berovic, A Strancar Berovic, M. Characterization of CIM monoliths as enzyme reactors / M. Vodopivec, A. Podgornik, M. Berovic, A. Strancar // *J. Chromatogr. B* - 2003. - V. 795. - P. 105–113.
- [81] Jungbauer, A. Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology / A. Jungbauer, R. Hahn // *J. Sep. Sci.* - 2004. - V. 27. - P. 767–778.
- [82] Okay, O. Macroporous copolymer networks / O. Okay // *Progress in Polymer Science* - 2000. - V. 25. - P. 711-779.
- [83] Svec, F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation / F. Svec // *J. Chromatogr. A* - 2010. - V. 1217. - P. 902–924.
- [84] Merhar, M. Methacrylate monoliths prepared from various hydrophobic and hydrophilic monomers. Structural and chromatographic characteristics / M. Merhar, A. Podgornik, M. Barut, M. Žigon, A. Štrancar // *J. Sep. Sci.* - 2003. - V. 26. - P. 322–330.
- [85] Courtois, J. Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation / J. Courtois, E. Bystrom, K. Irgum // *Polymer*. - 2006. - V. 47. - P. 2603–2611.
- [86] Vlakh, E.G. Preparation of methacrylate monoliths / E.G. Vlakh, T.B. Tennikova // *J. Sep. Sci.* - 2007. - V. 30. - P. 2801–2813.
- [87] Peters, B.E.C. Rigid Macroporous Polymer Monoliths / B.E.C. Peters, F. Svec, J.M.J. Frechet // *Adv. Mater.* - 1999. - V. 11. - P. 1169–1181.
- [88] Svec, F. Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of Molded Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis / F. Svec, J.M.J. Frechet // *Chem. Mater* - 1995. - V. 7. - P. 707–715.
- [89] Sinitsyna, E.S. New platforms for 3-D microarrays: Synthesis of hydrophilic polymethacrylate monoliths using macromolecular porogens / E.S. Sinitsyna, Y.N. Sergeeva, E.G. Vlakh, N.N. Saprikina, T.B. Tennikova // *React. Funct. Polym.* - 2009. - V. 69. - P. 385–392.
- [90] Cooper, A.I. Synthesis of molded monolithic porous polymers using supercritical carbon dioxide as the porogenic solvent / A.I. Cooper, A.B. Holmes // *Adv. Mater.* - 1999. - V. 11. - P. 1270–1274.
- [91] Hebb, A.K. Synthesis of porous cross-linked polymer monoliths using 1,1,1,2-tetrafluoroethane as the porogen / A.K. Hebb, K. Senoo, A.I. Cooper // *Compos. Sci. Technol.* - 2003. - V. 63. - P. 2379–2387.
- [92] Svec, F. Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers / F. Svec, J.M.J. Frechet // *Macromolecules* - 1995. - V. 28. - P. 7580–7582.

- [93] Trojer, L. High capacity organic monoliths for the simultaneous application to biopolymer chromatography and the separation of small molecules / L. Trojer, C.P. Bisjak, W. Wieder, G.K. Bonn // *J. Chromatogr. A* - 2009. - V. 1216. - P. 6303–6309.
- [94] Baeuml, F. Improvement of the long-term stability of polyimide-coated fused-silica capillaries used in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography / F. Baeuml, T. Welsch // *J. Chromatogr. A* - 2002. - V. 961. - P. 35–44.
- [95] Cabral, J.-L. Pore size characterization of monolith for electrochromatography via atomic force microscopy studies in air and liquid phase / J.-L. Cabral, D. Bandilla, C.D. Skinner // *J. Chromatogr. A* - 2006. - V. 1108. - P. 83–89.
- [96] Фридрихсберг, Д.А. Курс коллоидной химии / Д.А. Фридрихсберг. - Л.: Химия, 1974. - С. 352.
- [97] Brunauer, S. Gases in Multimolecular Layers / S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller // *J. Am. Chem. Soc.* - 1938. - V. 60. - P. 309–319.
- [98] Svec, F. Monolithic materials: preparation, properties and applications / F. Svec, T.B. Tennikova, Z. Deyl. - Amsterdam: Elsevier, 2003. - P. 325 – 350.
- [99] Strancar, A. Convective interaction media: polymer-based supports for fast separation of biomolecules / A. Strancar, M. Barut, A. Podgornik, P. Koselj, D. Josic, A. Buchacher // *LC-GC Int* - 1998. - V. 11. - P. 660-670.
- [100] Hjerten, S. High-performance chromatofocusing of proteins on compressed continuous beds with improved properties / S. Hjerten, J. Mohammad, J.L. Liao // *Biotechnol. Appl. Biochem.* - 1992. - V. 15. - P. 247 - 256.
- [101] Podgornik, A. Construction of large-volume monolithic columns / A. Podgornik, M. Barut, A. Strancar, D. Josic, T. Koloini // *Anal. Chem.* - 2000. - V. 72. - P. 5693–5699.
- [102] Hahn, R. Mass transfer properties of monoliths / R. Hahn, M. Panzer, E. Hansen, J. Mollerup, A. Jungbauer // *Sep. Sci. Technol.* - 2002. - V. 37. - P. 1545–1565.
- [103] Hall, T. Preparative and analytical chromatography of pegylated myelopoietin using monolithic media / T. Hall, D.C. Wood, C.E. Smith // *J. Chromatogr. A* - 2004. - V. 1041. - P. 87–93.
- [104] Žmak, P.M. Transfer of gradient chromatographic methods for protein separation to Convective Interaction Media monolithic columns / P.M. Žmak, H. Podgornik, J. Jančar, A. Podgornik, A. Štrancar // *J. Chromatogr. A* - 2003. - V. 1006. - P. 195–205.
- [105] Yamamoto, S. Retention studies of DNA on anion-exchange monolith chromatography. Binding site and elution behavior / S. Yamamoto, M. Nakamura, C. Tarmann, A. Jungbauer // *J. Chromatogr. A* - 2007. - V. 1144. - P. 155–160.

[106] Giovannini, R. High-performance membrane chromatography of supercoiled plasmid DNA / R. Giovannini, R. Freitag, T. B. Tennikova // *Anal. Chem.* - 1998. - V. 70. - P. 3348–3354.

[107] Влах, Е.Г. Монолитные полимерные сорбенты для высокоэффективного хроматографического анализа синтетических полимеров / Е.Г. Влах, Е.Ф. Максимова, Т.Б. Тенникова // *Высокомолекулярные Соединения* - 2013. - V. 55. - P. 209–217.

[108] Zakaria, P. Latex-Coated Polymeric Monolithic Ion-Exchange Stationary Phases. 2. Micro-Ion Chromatography / P. Zakaria, J.P. Hutchinson, N. Avdalovic, Y. Liu, P.R. Haddad // *Anal. Chem.* - 2005. - V. 77. - P. 417–423.

[109] Svec, F. Monolithic materials: preparation, properties and applications / F. Svec, T.B. Tennikova, Z. Deyl. - Amsterdam: Elsevier, 2003. - P. 325 – 350.

[110] T. Tennikova, M. Bleha, B. Belenkii, F. Svec. US Pat. 4.923.610, 1990.

[111] T. Tennikova, M. Bleha, B. Belenkii, F. Svec. US Pat. 4.952.349, 1990.

[112] Svec, F. Polymeric separation media for chromatography of biopolymers in a novel shape. Macroporous membranes. / F. Svec, T.B. Tennikova // *J. Bioact. Compat. Polym.* - 1991. - V. 6. - P. 393-405.

[113] Liapis, A.I. Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths: Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles / A.I. Liapis, J.J. Meyers, O.K. Crosser // *J. Chromatogr. A* - 1999. - V. 865. - P. 13–25.

[114] Huang, X. Surface-alkylated polystyrene monolithic columns for peptide analysis in capillary liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry / X. Huang, S. Zhang, G.A. Schultz, J. Henion // *Anal. Chem.* - 2002. - V. 74. - P. 2336–2344.

[115] Calleri, E. Evaluation of a monolithic epoxy silica support for penicillin G acylase immobilization / E. Calleri, G. Massolini, D. Lubda, C. Temporini, F. Loiodice, G. Caccialanza // *J. Chromatogr. A* - 2004. - V. 1031. - P. 93–100.

[116] Lin, Z. Preparation of phenylboronic acid-silica hybrid monolithic column with one-pot approach for capillary liquid chromatography of biomolecules / Z. Lin, H. Huang, S. Li, J. Wang, X. Tan, L. Zhang, G. Chen // *J. Chromatogr. A* - 2013. - V. 1271. - P. 115–123.

[117] Guryča, V. Porous polyacrylamide monoliths in hydrophilic interaction capillary electrochromatography of oligosaccharides / V. Guryča, Y. Mechref, A. K. Palm, J. Michálek, V. Pacáková, M. V. Novotný // *J. Biochem. Biophys. Methods* - 2007. - V. 70. - P. 3–13.

[118] Svec, F. Monolithic materials: preparation, properties and applications / F. Svec, T.B. Tennikova, Z. Deyl. - Amsterdam: Elsevier, 2003. - P. 325 – 350.

[119] Gunasena, D.N. Neutral, charged and stratified polar monoliths for hydrophilic interaction capillary electrochromatography / D.N. Gunasena, Z. El Rassi // *J. Chromatogr. A* - 2013. - V. 1317. P. 77–84.

[120] Azzouz, I. Feasibility of the preparation of silica monoliths for gas chromatography: Fast separation of light hydrocarbons / I. Azzouz, A. Essoussi, J. Fleury, R. Haudebourg, D. Thiebaut, J. Vial // *J. Chromatogr. A* - 2015. - V. 1383. - P. 127–133.

[121] Svec, F. Less common applications of monoliths. III. Gas chromatography / F. Svec, A.A. Kurganov // *J. Chromatogr. A* - 2008. - V. 1184. - P. 281–295.

[122] Liu, X. Preparation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid imprinted organic-inorganic hybrid monolithic column and application to selective solid-phase microextraction / X. Liu, Q. Zhu, H. Chen, L. Zhou, X. Dang, J. Huang // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* - 2014. - V. 951–952. - P. 32–37.

[123] Bagheri, H. High-throughput micro-solid phase extraction on 96-well plate using dodecyl methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate monolithic copolymer / H. Bagheri, A. Es'haghi, A. Es'haghi, E. Mohammadkhani // *Anal. Chim. Acta* - 2013. - V. 792. - P. 59–65.

[124] Maksimova, E.F. Methacrylate-based monolithic layers for planar chromatography of polymers / E.F. Maksimova, E.G. Vlakh, T.B. Tennikova // *J. Chromatogr. A* - 2011. - V. 1218. - P. 2425–2431.

[125] Krajnc, P. Hydroxy-derivatised emulsion templated porous polymers (PolyHIPEs): Versatile supports for solid and solution phase organic synthesis / P. Krajnc, N. Leber, J.F. Brown, N.R. Cameron // *React. Funct. Polym.* - 2006. - V. 66. - P. 81–91.

[126] Podgornik, A. Convective Interaction Media (CIM) - Short layer monolithic chromatographic stationary phases / A. Podgornik, A. Štrancar // *Biotechnol. Annu. Rev.* - 2005. - V. 11. - P. 281–333.

[127] Abou-Rebyeh, H. Carrier membrane as a stationary phase for affinity chromatography and kinetic studies of membrane-bound proteins / H. Abou-Rebyeh, F. Korber, K. Schubert-Rehberg, J. Reusch, Dj. Josic // *J. Chromatogr. B* - 1991. - V. 566. - P. 341–350.

[128] Petro, M. Immobilization of trypsin onto 'molded' macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography / M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet // *Biotechnol. Bioeng.* - 1996. - V. 49. - P. 355–363.

[129] Peterson, D.S. Enzymatic microreactor-on-a-chip: Protein mapping using trypsin immobilized on porous polymer monoliths molded in channels of microfluidic devices / D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Fréchet // *Anal. Chem.* - 2002. - V. 74. - P. 4081–4088.

[130] Krenkova, J. Highly efficient enzyme reactors containing trypsin and endoproteinase lysc immobilized on porous polymer monolith coupled to ms suitable for analysis of antibodies / J. Krenkova, N.A. Lacher, F. Svec // *Anal. Chem.* - 2009. - V. 81. - P. 2004–2012.

[131] Temporini, C. Chymotrypsin immobilization on epoxy monolithic silica columns: Development and characterization of a bioreactor for protein digestion / C. Temporini, E. Calleri, D. Campèse, K. Cabrera, G. Félix, G. Massolini // *J. Sep. Sci.* - 2007. - V. 30. - P. 3069–3076.

[132] Luo, Q. High-performance affinity chromatography for characterization of human immunoglobulin G digestion with papain / Q. Luo, X. Mao, L. Kong, X. Huang, H. Zou // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* - 2002. - V. 776. - P. 139–147.

[133] Josić, D. Use of compact, porous units with immobilized ligands with high molecular masses in affinity chromatography and enzymatic conversion of substrates with high and low molecular masses / D. Josić, H. Schwinn, A. Štrancar, A. Podgornik, M. Barut, Y.P. Lim, M. Vodopivec // *J. Chromatogr. A* - 1998. - V. 803. - P. 61–71.

[134] Geiser, L. In-line system containing porous polymer monoliths for protein digestion with immobilized pepsin, peptide preconcentration and nano-liquid chromatography separation coupled to electrospray ionization mass spectroscopy / L. Geiser, S. Eeltink, F. Svec, J.M.J. Fréchet // *J. Chromatogr. A* - 2008. - V. 1188. - P. 88–96.

[135] Bartolini, M. Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholinesterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery / M. Bartolini, V. Cavrini, V. Andrisano // *J. Chromatogr. A* - 2005. - V. 1065. - P. 135–144.

[136] Bartolini, M. Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholinesterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor / M. Bartolini, V. Cavrini, V. Andrisano // *J. Chromatogr. A* - 2007. - V. 1144. - P. 102–110.

[137] Bartolini, M. Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies / M. Bartolini, V. Cavrini, V. Andrisano // *J. Chromatogr. A* - 2004. - V. 1031. - P. 27–34.

[138] Lozano, P. Bioreactors based on monolith-supported ionic liquid phase for enzyme catalysis in supercritical carbon dioxide / P. Lozano, E. García-Verdugo, R. Piamtongkam, N. Karbass, T. De Diego, M.I. Burguete, S.V. Luis, J.L. Iborra // *Adv. Synth. Catal.* - 2007. - V. 349. - P. 1077–1084.

[139] Kawakami, K. Development of a silica monolith microbioreactor entrapping highly activated lipase and an experiment toward integration with chromatographic separation of chiral esters / K. Kawakami, D. Abe, T. Urakawa, A. Kawashima, Y. Oda, R. Takahashi, S. Sakai // *J. Sep. Sci.* - 2007. - V. 30. - P. 3077–3084.

[140] Yao, C. Immobilization of trypsin on sub-micron skeletal polymer monolith / C. Yao, L. Qi, W. Hu, F. Wang, G. Yang // *Anal. Chim. Acta* - 2011. - V. 692. - P. 131–137.

[141] Roginskii, S.Z. Experimental setup to study catalysts by combined pulse microcatalytic and ESR spectroscopic methods / Roginskii S.Z., Yanovskii M.I., Gaziev G.A. // *Dokl Akad Nauk SSSR* - 1961. - V. 140. - P. 1125 - 1127.

[142] Purnell, J. H. New developments in gas chromatography / J. H. Purnell. - New York: Wiley-Interscience, 1973. - P. 187.

[143] Meurer, M. Dynamic simulation of a simulated moving-bed chromatographic reactor for the inversion of sucrose / M. Meurer, U. Altenhöner, J. Strube, A. Untiedt, H. Schmidt-Traub // *Starch/Staerke* - 1996. - V. 48. - P. 452–457.

[144] Mazzotti, M. Dynamics of a chromatographic reactor: sterification catalyzed by acidic resins / M. Mazzotti, B. Neri, D. Gelosa, M. Morbidelli // *Ind Eng Chem Res* - 1997. - V. 36. - P. 3163–3172.

[145] Sircar, S. Liquid-Phase Sorption-Enhanced Reaction Process / S. Sircar, M.B. Rao // *AIChE Journal* - 1999. - V. 45. - P. 2326–2332.

[146] Ganetsos, G. Preparative and production scale chromatography / G. Ganestos, P.E. Barker. - New York: Marcel Dekker, 1993. - P. 786.

[147] Ganetsos, G. Preparative and production scale chromatography / G. Ganestos, P.E. Barker. - New York: Marcel Dekker, 1993. - P. 786.

[148] Shieh, M.T. Saccharification of modified starch to maltose in a semi-continuous counter-current chromatographic reactor-separator / M.T. Shieh, P.E. Barker // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* - 1995. - V. 63. - P. 125–134.

[149] Takeuchi, K. Experimental Studies of a Chromatographic Moving Bed Reactor / K. Takeuchi, Y. Uruguchi // *J. Chem. Eng. Jpn* - 1977. - V. 10. - P. 455-460.

[150] Petroulas, T. Analysis and performance of a countercurrent moving-bed chromatographic reactor / T. Petroulas, R. Aris, R.W. Carr // *Chem. Eng. Sci.* - 1985. - V. 40. - P. 2233–2240.

[151] Bjorklund, M.C. The simulated countercurrent moving bed chromatographic reactor: a catalytic and separative reactor / M.C. Bjorklund, R.W. Carr // *Catal. Today* - 1995. - V. 25. P. 159–168.

[152] Fricke, J. Effect of process parameters on the performance of a Simulated Moving Bed chromatographic reactor / J. Fricke, M. Meurer, J. Dreisörner, H. Schmidt-Traub // *Chem. Eng. Sci.* - 1999. - V. 54. - P. 1487–1492.

- [153] Migliorini, C. Analysis of simulated moving-bed reactors / C. Migliorini, M. Fillinger, M. Mazzotti, M. Morbidelli // *Chem. Eng. Sci.* - 1999. - V. 54. - P. 2475–2480.
- [154] Dünnebier, G. Optimal design and operation of simulated moving bed chromatographic reactors / G. Dünnebier, J. Fricke, K.U. Klatt // *Ind. Eng. Chem. Res.* - 2000. - V. 39. - P. 2290–2304.
- [155] Barker, P.E. Bioreaction-separation on continuous chromatographic systems / P.E. Barker, G. Ganetsos, J. Ajongwen, F. Akintoye // *Chem. Eng. J.* - 1992. - V. 50. - P. B23–B28.
- [156] Zafar, I. An experimental and computational study of a biochemical polymerisation reaction in a chromatographic reactor separator / I. Zafar, P.E. Barker // *Chem. Eng. Sci.* - 1988. - V. 43. - P. 2369–2375.
- [157] Ching, C. Simulated moving-bed reactor: application in bioreaction and separation / C. Ching, Z. Lu // *Ind. Eng. Chem. Res.* - 1997. - V. 36. - P. 152–159.
- [158] Ganetsos, G. Preparative and production scale chromatography / G. Ganestros, P.E. Barker. - New York: Marcel Dekker, 1993. - P. 786.
- [159] Mensah, P. Adsorptive control of water in esterification with immobilized enzymes. Continuous operation in a periodic counter-current reactor / P. Mensah, G. Carta // *Biotechnol. Bioeng.* - 1999. - V. 66. - P. 137–146.
- [160] Migliorini, C. Regioselective enzymatic diol esterification in batch and fixed-bed adsorptive reactors: Experiments and modeling / C. Migliorini, J.P. Meissner, M. Mazzotti, G. Carta // *Biotechnol. Prog.* - 2000. - V. 16. - P. 600–609.
- [161] Wu, J.C. Enhancement of penicillin G hydrolysis using penicillin acylase to 6-aminopenicillanic acid by simultaneous chromatographic separation / J.C. Wu, Z.M. He, Z.W. Han, K.T. Yu // *Biotechnol. Lett.* - 2000. - V. 22. - P. 1959–1962.
- [162] Dong, Y. Improved method for the routine determination of acetylcholine and choline in brain microdialysate using a horseradish peroxidase column as the immobilized enzyme reactor / Y. Dong, L. Wang, D. Shangguan, R. Zhao, G. Liu // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* - 2003. - V. 788. - P. 193–198.
- [163] Liu, J.-X. Effect of combination of extracts of ginseng and ginkgo biloba on acetylcholine in amyloid beta-protein-treated rats determined by an improved HPLC / J.-X. Liu, W.-H. Cong, L. Xu, J.-N. Wang // *Acta Pharmacol. Sin.* - 2004. - V. 25. - P. 1118–1123.
- [164] Wessels, D. Determination of aldehydes in foods by HPLC-biosensor coupling / D. Wessels, H. Erdmann, R. Galensa // *Lebensmittelchemie* - 1996. - V. 50. - P. 103–104.



[165] Den Hollander J.L. Non-separating effects in a centrifugal partition chromatographic reactor for the enzymatic production of L-amino acids / J.L. Den Hollander, W.W. Yiu, K.C.M. Luyben, L.A.M. Van der Wielen // *Chem. Eng. Sci.* - 1999. - V. 54. - P. 3207–3215.

[166] Barabino, R.C. Coupled reactions of immobilized enzymes and immobilized substrates: Clinical application as exemplified by amylase assay / R.C. Barabino, D.N. Gray, M.H. Keyes // *Clin. Chem.* - 1978. V. 24. - P. 1393–1398.

[167] Ngo, T.T. Bioanalytical applications of immobilized enzymes / T.T. Ngo // *Int. J. Biochem* - 1979. - V. 1. - P. 459-465.

[168] Румянцева, Г.Н. Биокатализ: Концепция и практическое использование / Г.Н. Румянцева, Н.И. Дунченко.– М.:ДеЛиПринт, 2010. – С. 118.

[169] Chu, L. Treatment of domestic wastewater by using a microaerobic membrane bioreactor / L. Chu, X. Zhang, F. Yang, X. Li // *Desalination* - 2006. - V. 189. - P. 181–192.

[170] Wang, Y., Hoss, U., Shah, R.W., Jenn-hann, L., Van, A., William, P., Cochran, Patent 20080026473 US, 2008..

[171] Allen, J.R., Cranley, P.E., Danowski, K.L., McIntyre, J.A., Shick, R.A., Rosner, B.M., Sun, L. Patent 20080004542 US, 2008.

[172] Gabel, D., Edwards, K., Awad, D. Patent 07/098968 WO, 2007.

[173] Chang , T.M.S. Artificial Cells / T.M.S., Chang. - IL: Charles C. Thomas Publ., Springfield, 1972. - P. 207.

[174] Torchilin, V.P. Immobilised enzymes as drugs / V.P. Torchilin // *Adv. Drug Deliv. Rev.* -1988. - V.1. - P. 270 - 277.

[175] Chang, T.M. Methods for the therapeutic applications of immobilized enzymes / T.M. Chang // *Methods Enzymol.*- 1976. - V. 44. - P. 676–698.

[176] Messing, R. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors / R. Messing. - Amsterdam: Elsevier, 1975. - P. 232.

[177] Raines, R.T. Ribonuclease A / R.T. Raines // *Chem. Rev.* -1998. - V. 98. - P. 1045–1066.

[178] Richardson, J.S. The anatomy and taxonomy of protein structure / J.S. Richardson // *Adv. Protein Chem.* - 1981. - V. 34. - P. 167–339.

[179] Shimotakahara, S. NMR structural analysis of an analog of an intermediate formed in the rate-determining step of one pathway in the oxidative folding of bovine pancreatic ribonuclease A: Automated analysis of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N resonance assignments for wild-type and [C65S, C72S] mutant forms / S. Shimotakahara, C.B. Ríos, J.H. Laity, D.E. Zimmerman, H.A. Scheraga, G.T. Montelione // *Biochemistry* - 1997. - V. 36. - P. 6915–6929.

- [180] Barnard, E.A. Biological function of pancreatic ribonuclease / E.A. Barnard // *Nature*. - 1969. - V.221. - P.340-344.
- [181] D'Alessio Ribonucleases: structure and functions / G. D'Alessio, J.F. Riordan. - New York: Academic Press, 1997. - P. 587.
- [182] Rains R.T. Active Site of Ribonuclease A / R.T.Rains // *Nucleic Acids and Molecular Biology* - 2004. - V. 13. - P.19-32.
- [183] Horák, D. Properties of rnase a immobilized on magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres / D. Horák, B. Rittich, J. Šafář, A. Španová, J. Lenfeld, M.J. Beneš // *Biotechnol. Prog.* - 2001. - V. 17. - P. 447–452.
- [184] Hina, Y. Stabilization of pancreatic ribonuclease A by immobilization on Sepharose-linked antibodies that recognize the labile region of the enzyme / Y. Hina, M. Owais, D.N. Rao, M. Saleemuddin // *Biochim. Biophys. Acta* - 2001. - V. 1548. - P.114-120.
- [185] Reddy, L.G. Preparation and properties of RNase T2 immobilized on concanavalin A-sepharose / L.G. Reddy, V. Shankar // *Appl. Biochem. Biotechnol* - 1989. - V. 22. - P. 237–246.
- [186] Battistel, E. Thermodynamics of immobilized ribonuclease A / E. Battistel, D. Bianchi // *Pure Appl. Chem.* - 1991. - V. 63. - P. 1483–1490.
- [187] Benčina, M. Preparation and characterisation of ribonuclease monolithic bioreactor / M. Benčina, J. Babič, A. Podgornik // *J. Chromatogr. A* - 2007. - V. 1144. - P. 135–142.
- [188] Dilokpimol, A. Enzymatic synthesis of beta-xylosyloligosaccharides by transxylosylation using two beta-xylosidases of glycoside hydrolase family 3 from *Aspergillus nidulans* FGSC A4 / A. Dilokpimol, H. Nakai, C.H. Gotfredsen, M. Appeldoorn, M.J. Baumann, N. Nakai, H.A. Schols, M.A. Hachem, B. Svensson // *Carbohydr. Res.* - 2011. - V. 346. - P. 421–429.
- [189] Biely, P. Microbial xylanolytic systems / P. Biely // *Trends Biotechnol.* - 1985. - V. 3. - P. 286–290.
- [190] McCarter, J.D. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis / J.D. McCarter, S.G. Withers // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 1994. - V. 4. - P. 885–892.
- [191] Collins, T. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases / T. Collins, C. Gerday, G. Feller // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2005. V. 29. - P. 3–23.
- [192] Linder, M. The roles and function of cellulose-binding domains / M. Linder, T.T. Teeri // *J. Biotechnol.* - 1997. - V. 57. - P. 15–28.
- [193] Luthi, E. Cloning, sequence analysis, and expression of genes encoding Xylan-degrading enzymes from the thermophile *Caldocellum saccharolyticum* / E. Luthi, D.R. Love, J. McAnulty, C. Wallace, P.A. Caughey, D. Saul, P.L. Bergquist // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1990. - V. 56. - P. 1017–1024.

- [194] Herrmann, M.C. The beta-D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase / M.C. Herrmann, M. Vrsanska, M. Jurickova, J. Hirsch, P. Biely, C.P. Kubicek // *Biochem. J.* - 1997. - V. 321. - P. 375–381.
- [195] Williams, S.J. Glycosyl fluorides in enzymatic reactions / S.J. Williams, S.G. Withers // *Carbohydr. Res.* - 2000. - V. 327. P. 27–46.
- [196] Maalej-Achouri, I. Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase / I. Maalej-Achouri, M. Guerfali, A. Gargouri, H. Belghith // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2009. - V. 59. - P. 145–152.
- [197] Guerfali, M. Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* beta-xylosidase and its use for xylose and xylooligosaccharides production / M. Guerfali, I. Maalej, A. Gargouri, H. Belghith // *J. Mol. Catal. B Enzym.*, - 2009. - V. 57. - P. 242–249.
- [198] Delcheva, G. Performance of *Aspergillus niger* B 03 beta-xylosidase immobilized on polyamide membrane support / G. Delcheva, G. Dobrev, I. Pishtiyski // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2008. - V. 54. - P. 109–115.
- [199] Cano, À. Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their composition using design of experiments / À. Cano, E.A. Moschou, S. Daunert, J. Coello, C. Palet // *Bioprocess Biosyst. Eng.* - 2006. - V. 29. - P. 261–268.
- [200] Roy, I. Immobilization of xylan-degrading enzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68 on the smart polymer Eudragit L-100 / I. Roy, A. Gupta, S.K. Khare, V.S. Bisaria, M.N. Gupta // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2003. - V. 61. - P. 309–313.
- [201] Benassi, V.M. Immobilization and biochemical properties of a  $\beta$ -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity / V.M. Benassi, T.M. Da Silva, B.C. Pessela, J.M. Guisan, C. Mateo, M.S. Lima, J.A. Jorge, M.D.L.T.M. Polizeli // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2013. - V. 89. - P. 93–101.
- [202] Cygler, M. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins / M. Cygler, J.D. Schrag, J.L. Sussman, M. Harel, I. Silman, M.K. Gentry, B.P. Doctor // *Protein Sci.* - 1993. - V. 2. - P. 366–382.
- [203] Satoh, T. Current progress on esterases: from molecular structure to function / T. Satoh, P. Taylor, W.F. Bosron, S.P. Sanghani, M. Hosokawa, B.N. La Du // *Drug Metab. Dispos.* - 2002. - V.30. - P. 488–493.
- [204] Satoh, T. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions / T. Satoh, M. Hosokawa // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1998. - V. 38. - P. 257–288.

[205] Peña-Montes, C. Immobilization and biochemical properties of the enantioselective recombinant NStcI esterase of *Aspergillus nidulans* / C. Peña-Montes, M.E. Mondragón-Tintor, J.A. Castro-Rodríguez, I. Bustos-Jaimes, A. Navarro-Ocaña, A. Farrés // *Enzyme Res.* - 2013. - V. 2013. - P. 11.

[206] Fernandez-Lafuente, R. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment / R. Fernandez-Lafuente, D.A. Cowan, A.N.P. Wood // *Enzyme Microb. Technol.* - 1995. - V. 17. - P. 366–372.

[207] Alex, D. Esterases immobilized on aminosilane modified magnetic nanoparticles as a catalyst for biotransformation reactions / D. Alex, A. Mathew, R.K. Sukumaran // *Bioresour. Technol.* - 2014. - V. 167. - P. 547–550.

[208] He, F. Immobilization of feruloyl esterases on magnetic nanoparticles and its potential in production of ferulic acid / F. He, S. Zhang, X. Liu // *J. Biosci. Bioeng.* - 2015. - V. 120. - P. 330-334.

[209] Jeong, J. Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on gold-coated magnetic nanoparticles / J. Jeong, T.H. Ha, B.H. Chung // *Anal. Chim. Acta* - 2006. - V. 569. - P. 203–209.

[210] Shaw, S.-Y. Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles / S.-Y. Shaw, Y.-J. Chen, J.-J. Ou, L. Ho // *Enzyme Microb. Technol.* - 2006. - V. 39. - P. 1089–1095.

[211] Torres, P. Characterization and application of a sterol esterase immobilized on polyacrylate epoxy-activated carriers (Dilbeads<sup>TM</sup>) / P. Torres, A. Datla, V.W. Rajasekar, S. Zambre, T. Ashar, M. Yates, M.L. Rojas-Cervantes, O. Calero-Rueda, V. Barba, M.J. Martínez, A. Ballesteros, F.J. Plou // *Catal. Commun.* - 2008. - V. 9. - P. 539–545.

[212] Wang, P.Y. Hydrolytic resolution of (R,S)-3-hydroxy-3-phenylpropionates by esterase from *Klebsiella oxytoca*: Effects of leaving alcohol, covalent immobilization and aqueous pH / P.Y. Wang, S.W. Tsai // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2009. - V. 59. - P. 70–75.

[213] Heilmann, S.M. Azlactone-reactive polymer supports for immobilizing synthetically useful enzymes: Part I. Pig liver esterase on dispersion polymer supports / S.M. Heilmann, G.J. Drtina, L.C. Haddad, J.K. Rasmussen, B.N. Gaddam, J.J. Liu, R.T. Fitzsimons, D.D. Fansler, J.R. Vyvyan, Y.N. Yang, T.J. Beauchamp // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2004. - V. 30. - P. 33–42.

[214] Lowry, O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biological Chem.* - 1951. - V. 193. - P. 265 - 275.

[215] Sinitsyna, E.S. Hydrophilic methacrylate monoliths as platforms for protein microarray / E.S. Sinitsyna, E.G. Vlach, M.Y. Rober, T.B. Tennikova // *Polymer* - 2011. - V. 52. - P. 2132–2140.

[216] Geiser, L. Stability and repeatability of capillary columns based on porous monoliths of poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) / L. Geiser, S. Eeltink, F. Svec, J.M.J. Fréchet // *J. Chromatogr. A* - 2007. - V. 1140. - P. 140–146.

[217] Kasper, C. Fast isolation of protein receptors from Streptococci G by means of macroporous affinity disks / C.Kasper, L.Meringova, R.Freitag, T.Tennikova // *J Chrom B.* - 1998. - V.65. - P. 65 – 72.

[218] Наканиси, К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / К. Наканиси. - М: Мир, 1965. - С. 440.

[219] Влах, Е.Г. Создание монолитных аффинных сорбентов для выделения активаторов плазминогена. Дис. к - та.хим.наук / Е.Г.Влах. – СПб., 2005. – С.153.

[220] Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques / G.T. Hermanson. - Amsterdam: Elsevier, 1996. - P. 1146.

[221] Temporini, C. Optimization of a trypsin-bioreactor coupled with high-performance liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry for quality control of biotechnological drugs / C. Temporini, E. Perani, F. Mancini, M. Bartolini // *J Chrom A.* - 2006. - V.1120. - P. 121 – 131.

[222] McGinnis, A.C. Chromatographic methods for the determination of therapeutic / A.C. McGinnis, B. Chen, M.G. Bartlett / *J. Chromatogr. B* - 2012. - V. 883–884. - P. 76–94.

[223] Tener, G.M. Ion-exchange chromatography in the presence of urea / G.M. Tener // *Methods in Enzymology* - 1967. - V. 12. - P. 398-404.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность и признательность своему научному руководителю к.х.н., доценту Влах Евгении Георгиевне за предложенную интересную тему исследовательской работы, чуткое руководство и помощь на всех этапах ее выполнения. Отдельно хочется поблагодарить второго научного руководителя Д.О. Виноходова, а также д.х.н., проф. кафедры МБТ СПбГТИ(ТУ) А.И. Гинака за курирование в течение обучения в аспирантуре.

Особые слова благодарности хочется адресовать д.х.н., проф. Т.Б. Тенниковой за предоставленную возможность работы в Лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ИВС РАН, теплое отношение, а также за полезные советы и ценные дискуссии.

Огромную признательность хочется выразить к.ф.-м.н., ст.н.с. Е.М. Ивановой и заведующему лаборатории механики полимеров и композиционных материалов ИВС РАН В.Е. Юдину за помощь в исследовании полученных сополимеров методом сканирующей электронной микроскопии, а также сотрудникам лаборатории энзимологии Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Федеральное государственное бюджетное учреждение Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова) к.х.н. А.А. Кульминской, и м.н.с. К. Боброву за предоставление для работы ксиланолитических ферментов и помощь в работе с ними.

Также хочется поблагодарить сотрудников Лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ИВС РАН, в особенности к.х.н. Е.С. Синицыну, к.х.н. М.Л. Левит, к.х.н. В.А. Коржикова, за дружеское участие и моральную поддержку.

Автор также благодарит зарубежных партнеров из фирмы VIA Separations за сотрудничество и помощь в исследовании синтезированных образцов методом интрузионной ртутной порометрии и предоставление монолитных CIM Epoxy и CIM DEAE дисков.