

УДК 541.64, 547.964, 577.15

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ПРОТОЧНЫХ БИОРЕАКТОРОВ НА ОСНОВЕ МАКРОПОРИСТЫХ МОНОЛИТОВ

Е.Г. Влах^{1,2}, Г.А. Платонова¹, Т.Б. Тенникова^{1,2}

(¹Институт высокомолекулярных соединений РАН; ²Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета; e-mail: vlakh@mail.ru)

Проведена модификация поверхности макропористых монолитных дисков гидролитическими ферментами α -химотрипсином и рибонуклеазой А. На примере реакций гидролиза низко- и высокомолекулярного субстратов изучено влияние способа иммобилизации ферментов, влияние числа альдегидных групп в полимерном спейсере и скорости рециркуляции раствора субстрата на эффективность гетерогенного биокатализа.

Ключевые слова: иммобилизованные ферменты, макропористые монолитные носители, проточный биокатализ, гидролазы.

Хорошо известно, что ферменты нашли широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности, биотехнологии, медицине, биохимическом анализе и т.д. [1–4]. Несмотря на высокую эффективность и специфичность ферментов, использование их в качестве биокатализаторов в растворе имеет ряд ограничений, связанных с высокой стоимостью и лабильностью структуры макромолекулы белка, а также с трудностями их удаления из реакционной среды по окончании каталитического процесса. Указанные недостатки успешно преодолеваются при использовании гетерогенных форм биокатализаторов, т.е. ферментов, иммобилизованных на поверхности твердой фазы [5]. При использовании иммобилизованных ферментов продукты реакции не загрязнены биокатализатором, каталитический процесс легко контролируется, и реакция может быть остановлена на любой стадии. Кроме того, иммобилизованные ферменты демонстрируют более высокую стабильность по сравнению с нативными формами и могут быть многократно использованы.

Применение проточных систем, в которых раствор субстрата циркулирует с постоянной скоростью сквозь слой стационарной фазы, содержащей иммобилизованный фермент, представляет собой один из наиболее используемых способов гетерогенного биокатализа. Очевидно, что эффективность процесса в целом определяется не только свойствами самого фермента, но и свойствами твердой матрицы, а также способом иммобилизации фермента. Из числа существующих твердых фаз для создания проточных каталитических систем необходимо выделить макропористые полиметакрилатные монолитные матрицы, характе-

ризующиеся высокой пористостью и проницаемостью, а также механической и химической стабильностью. В отличие от упакованных колонок, стационарные фазы на основе макропористых сорбентов монолитного типа представляют собой единый гомогенный материал с системой взаимосвязанных проточных пор. Поровая структура определяет одно из основных преимуществ макропористых монолитных колонок, а именно, их высокую проницаемость и, как следствие, доминирование конвективного механизма массопереноса над диффузионным, имеющим место в упакованных колонках [6]. Кроме того, данные стационарные фазы характеризуются низкими значениями рабочего давления в системе, что позволяет проводить динамические процессы при высокой скорости подвижной фазы. Среди прочих достоинств описываемых материалов следует отметить высокую механическую и химическую устойчивость, а также возможность вариации реакционных групп поверхности.

Изначально данный вид материалов был разработан для применения в качестве стационарных фаз в высокоэффективной жидкостной хроматографии [7, 8]. В настоящее время макропористые монолитные стационарные фазы нашли широкое применение в газовой [9] и капиллярной электрохроматографии [10], в качестве платформ биочипов [11], а также в качестве твердых высокопроницаемых сред при создании гетерогенных биокатализаторов. Известен ряд работ по иммобилизации протеиназ на поверхности макропористых полимерных и неорганических (силикатных) монолитных носителей для получения пептидных карт в протеомике [12–16]. Существуют также данные по

получению гетерогенных биокатализаторов на основе монолитов с использованием таких ферментов, как инвертаза [17], глюкозооксидаза [18], лигнин пероксидаза [19], дезоксирибонуклеаза [20], эластаза [21], β -секретаза [22] и пектинлиаза [23]. Большинство из указанных систем тестировалось в режиме зонального элюирования, т.е. в условиях, когда раствор субстрата подается в виде небольшого фиксированного объема, однократно пропускаемого сквозь биореактор.

Как и в случае нативных ферментов, эффективность биокатализа иммобилизованных форм зависит от условий проведения каталитической реакции (температуры и pH среды). При иммобилизации термическая и pH-стабильность возрастают, что означает расширение интервала значений рабочих температуры и pH, поэтому известные оптимальные параметры для реакции с нативными ферментами могут быть успешно перенесены для проведения гетерогенного биокатализа. В случае иммобилизованных ферментов, в отличие от гомогенного биокатализа, эффективность протекания каталитической реакции зависит от ряда других факторов, в частности, от условий иммобилизации фермента, условий элюирования раствора субстрата сквозь стационарную фазу, а также толщины слоя стационарной фазы.

Влияние способа иммобилизации ферментов на поверхности макропористых монолитных фаз изучено в работе [24]. В частности, авторами были оптимизированы условия ковалентной иммобилизации рибонуклеазы А на поверхности коммерчески доступных макропористых монолитных дисков посредством реакции аминокрупп фермента с эпоксидными или имидазолкарбаматными группами полимерного носителя. Сравнение активности рибонуклеазы, иммобилизованной двумя способами, в реакции гидролиза низкомолекулярного субстрата цитидин-2',3'-циклофосфата показало преимущество иммобилизации через карбаматную связь.

Принципиальными параметрами, оказывающими влияние на эффективность биокатализа в проточном формате, являются режим и скорость подачи раствора субстрата. Помимо проведения биокатализа в режиме зонального элюирования, которое имеет огромное значение при реализации аналитических процессов, возможно также использование режима рециркуляции субстрата сквозь стационарную фазу, содержащую иммобилизованный фермент. Такой подход, в отличие от предыдущего, имеет технологическое значение, так как позволяет перерабатывать большие объемы раствора субстрата и аккумулировать

продукт каталитической реакции. При этом как в первом, так и во втором случае скорость подачи раствора субстрата имеет существенное значение.

На данный момент не существует единой концепции, объясняющей влияние скорости подачи раствора субстрата на эффективность катализа в биореакторах на основе монолитных сорбентов. Так, в работах [25–27] авторы продемонстрировали увеличение эффективности биокатализа с ростом скорости подачи раствора субстрата. Другая группа исследователей [28] показала обратную зависимость. Однако следует отметить, что в обоих случаях раствор субстрата подавался в режиме зонального элюирования.

Цель данной работы – получение гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных дисков, содержащих ковалентно связанные с поверхностью твердой фазы гидролитические ферменты – α -химотрипсин (ХТР) или рибонуклеазу А (РНКаза), изучение кинетических параметров в реакциях гидролиза низко- и высокомолекулярных субстратов в зависимости от способа и условий иммобилизации ферментов, а также изучение влияния скорости подачи раствора низко- и высокомолекулярного субстратов на эффективность гетерогенного биокатализа в режиме рециркуляции.

Экспериментальная часть

Материалы. Для получения проточных гетерогенных биокатализаторов использовали макропористые полиметакрилатные монолитные диски размером 12×3 мм («СІМ Epoxy Disk», «BIA Separations», Словения) и гидролитические ферменты – α -химотрипсин и рибонуклеазу А («Sigma-Aldrich», Германия). В качестве спейсера использовали синтезированный в лаборатории и окисленный периодатом натрия водорастворимый поливинилсахарид – 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозу (ММ 25000, содержание альдегидных групп 11 и 29 мол.%, ок-п-МАГ-11 и ок-п-МАГ-29 соответственно). Синтез и окисление п-МАГ проводили согласно методам, описанным в работе [29]. В качестве специфических субстратов для определения активности α -химотрипсина и рибонуклеазы А использовали соответственно этиловый эфир бензоилтирозина (БТЭЭ) производства «Sigma-Aldrich» (Германия) и высокомолекулярный субстрат – калиевую соль полиуридилевой кислоты (poly(U)) («Reanal», Венгрия).

Иммобилизация ферментов. Иммобилизацию ферментов проводили в статических условиях. Для этого с помощью шприца реакционный

раствор закачивали в колонку, заполняя таким образом поровое пространство сорбента, после чего диск погружали в раствор для иммобилизации. Одностадийную иммобилизацию фермента проводили, инкубируя диск в растворе фермента с концентрацией 3 или 5 мг/мл в 0,01 М Na-боратном буфере (pH 9,4), при температуре 30°C в течение 20 ч.

Иммобилизация ферментов через промежуточный спейсер включала несколько стадий:

1) предварительная функционализация поверхности ГМА-ЭДМА полимерного носителя аминогруппами;

2) ковалентное прикрепление полимерного спейсера посредством реакции его альдегидных групп с аминогруппами сорбента;

3) связывание фермента с поверхностью матрицы путем взаимодействия аминогрупп белка и остаточных после связывания с сорбентом альдегидных групп полимера;

4) восстановление образующихся альдиминных связей и остаточных альдегидных групп боргидридом натрия.

Для проведения реакции аминирования монолитный диск инкубировали в 10 мл 25%-го водного раствора аммиака при температуре 40°C в течение 5 ч. После функционализации и охлаждения реакционной системы диск промывали в динамическом режиме последовательно 10 мл воды, 5 мл 1 М раствора NaCl, снова большим объемом воды и 0,01 М Na-фосфатным буферным раствором (ФБ; pH 7,0). Для тонкой очистки буферных растворов использовали мембраны с диаметром пор 0,25 мкм («Владипор», Россия).

Аминированный диск погружали в 1,3 мл раствора альдегидсодержащего сополимера с концентрацией 0,45 мг/мл в 0,01 М ФБ (pH 7,0). Поровое пространство диска было предварительно заполнено тем же реакционным раствором, для чего через диск, встроенный в хроматографическую систему с помощью специального картриджа, пропускали 0,5 мл раствора окисленной п-МАГ. Реакцию проводили при температуре 22°C в течение 1,5 ч.

Перед иммобилизацией α -химотрипсина и рибонуклеазы А диски, содержащие полимерный спейсер, промывали 0,01 М Na-боратным буферным раствором (pH 8,4). Иммобилизацию ферментов проводили так же, как и в случае полимерного спейсера, но концентрация белка в 0,01 М Na-боратном буферном растворе (pH 8,4) составляла 3 или 5 мг/мл.

На заключительной стадии диски инкубировали в 1 мл раствора боргидрида натрия в воде

с концентрацией 2 мг/мл в течение 1 ч при температуре 22°C. После завершения реакции диск промывали 0,01 М Na-фосфатным буферным раствором (pH 7,4). Анализ исходного, промывного и оставшегося после проведения иммобилизации растворов проводили одновременно. Содержание фермента в растворах определяли спектрофотометрически по методу Лоури–Фолина. Массу иммобилизованного лиганда вычисляли по схеме: (количество лиганда в исходном растворе (мг) + количество в объеме порового пространства (мг)) – количество лиганда в растворе после иммобилизации (мг) – количество лиганда в промывном растворе (мг).

Определение активности ферментов. Гидролазное расщепление БТЭЭ проводили в режиме рециркуляции раствора субстрата с разной концентрацией через диск, содержащий иммобилизованный химотрипсин (рис. 1). Растворы субстрата готовили следующим образом: 1,75 мл раствора БТЭЭ в метаноле (50 мас.%) с концентрацией в интервале 0,1–3,0 мг/мл разбавляли 1,75 мл 0,05 М Трис-HCl буфера (pH 7,8). Объем рециркулируемого раствора составлял 3,5 мл. Реакцию проводили в течение 6 мин при температуре 22°C. Скорость подачи раствора субстрата, регулируемая настройками перистальтического насоса «Masterflex Console Drive», с головкой «Easy-Load II Model 77201-60» («Cole-Parmer Instrument Company», США), составляла 1,0 мл/мин. Для количественного определения продуктов реакции использовался

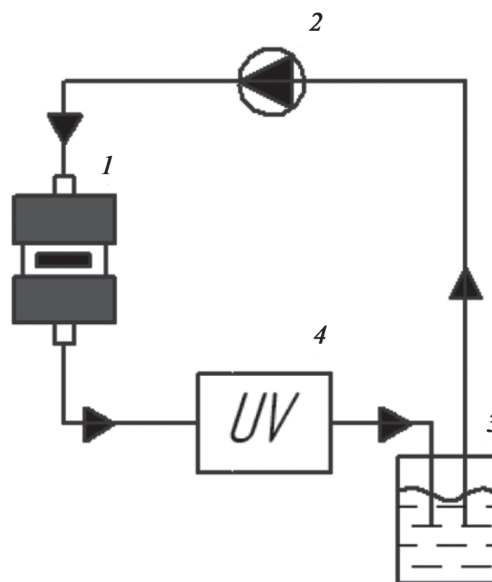


Рис. 1. Схема биореактора: 1 – монолитный диск, содержащий иммобилизованный фермент, и встроенный в картридж-держатель, 2 – насос, 3 – раствор субстрата, 4 – анализатор

ли спектрофотометр «UVmini-1240» («Shimadzu», Япония) при длине волны 256 нм.

В случае рибонуклеазы poly(U) растворяли в буферном растворе, содержащем 0,05 М трис-HCl (рН 8,0), 2М ЭДТА, 2 М NaCl; интервал концентраций от 0,03 до 0,30 мг/мл; объем раствора составлял 3,5 мл. Реакцию проводили в течение 20 мин. После гидролиза низкомолекулярный продукт реакции отделяли ультрафильтрацией через мембраны 1 кДа. Оптическую плотность раствора, содержащего уридинмонофосфат, измеряли при длине волны 262 нм. Концентрацию раствора и содержание продукта реакции рассчитывали, используя калибровочную зависимость.

Расчет значений констант Михаэлиса (K_M) и максимальной скорости реакции каталитического расщепления субстрата ($V_{\text{макс}}$) осуществляли графическим способом по методу Лайнуивера–Бэрка, т.е. путем построения зависимости скорости реакции гидролиза от концентрации субстрата с последующей линейризацией полученной кривой в обратных координатах [25]. Для обработки экспериментальных данных использовали компьютерную программу Origin 6.0. Удовлетворительными считали результаты, когда коэффициент регрессии R^2 находился в интервале 0,98–0,99.

Результаты и обсуждение

Ковалентную иммобилизацию ферментов на поверхности макропористых монолитных носителей осуществляли двумя методами: методом прямой иммобилизации за счет реакции аминокислотных групп белка с эпоксидными группами носителя; посредством введения промежуточного макромолекулярного спейсера, содержащего высокорекреационные альдегидные группы. В отличие от первого одностадийного метода, второй

представлял собой многоступенчатый процесс, включающий аминирование сополимера ГМА-ЭДМА, ковалентную иммобилизацию ок-пМАГ посредством реакции его альдегидных групп с аминокислотными группами сорбента, иммобилизацию фермента за счет взаимодействия аминокислотных групп белка и остаточных после связывания с сорбентом альдегидных групп полимера, а также восстановление образующихся альдиминных связей и остаточных альдегидных групп боргидридом натрия.

На примере иммобилизованного химотрипсина исследовано влияние способа иммобилизации, количества иммобилизованного фермента, а также количества альдегидных групп в макромолекуле спейсера на активность иммобилизованного фермента. Данные по количеству иммобилизованного химотрипсина в расчете на диск (0,2 г) представлены в табл. 1.

Согласно табл. 1, для всех форм иммобилизованного химотрипсина значения констант Михаэлиса очень близки и лежат в интервале от 0,7 до 1,3 мМ. При этом удельная активность, а следовательно, и число оборотов фермента (k_3), имеющее значение при расчете эффективности биокатализа (k_3/K_M) [30], для химотрипсина, иммобилизованного через макромолекулярный спейсер, оказались существенно выше, чем для биокатализатора, присоединенного непосредственно к поверхности твердой фазы. Более низкие значения удельной активности в случае фермента, иммобилизованного прямым методом, безусловно, связаны со стерическими затруднениями, возникающими вследствие жесткого закрепления химотрипсина на поверхности твердого носителя. В то же время локализация фермента на гибком спейсере обеспечивает большую доступность его активного центра для молекул субстрата, что

Таблица 1

Кинетические параметры гидролиза БТЭЭ иммобилизованной протеазой α -химотрипсином (скорость рециркуляции раствора субстрата 1,0 мл/мин)

Способ иммобилизации	m , мг/диск	K_M , мМ	A , мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	k_3 , мин ⁻¹	k_3/K_M
Прямая иммобилизация	0,9	0,7	1,4	35	50
Прямая иммобилизация	2,1	1,0	1,6	39	39
Иммобилизация через ок-п-МАГ-11	0,8	1,4	6,7	159	114
Иммобилизация через ок-п-МАГ-11	1,4	1,2	5,1	123	103
Иммобилизация через ок-п-МАГ-29	1,3	1,1	4,3	102	92

выражается в более высоких значениях эффективности биокатализа.

Сравнение эффективности биокатализа химотрипсина, иммобилизованного в практически равных количествах (1,3 и 1,4 мг/диск) с использованием окисленной п-МАГ, содержащей 11 и 29 мол.% альдегидных групп, показывает, что активность немного выше в случае спейсера п-МАГ-11. Полученный результат может быть связан с тем, что избыток высокорекреационных групп в структуре полимера способствует многоточечному связыванию молекулы фермента, т.е. более сильному сшиванию цепей полимерного спейсера ферментом, что может сопровождаться частичным искажением конформации биокатализатора.

Увеличение количества иммобилизованного фермента для обоих типов биокатализаторов (полученных прямой иммобилизацией и посредством введения промежуточного спейсера)

не способствовало увеличению эффективности гетерогенного биокатализа. Вероятно, данный результат может быть связан с возникновением стерических затруднений при взаимодействии фермента с субстратом вследствие локализации на поверхности избыточного количества макромолекул.

Таким образом, при получении гетерогенных биокатализаторов на основе рибонуклеазы А в качестве спейсера была выбрана окисленная п-МАГ, содержащая 11 мол.% альдегидных звеньев. Иммобилизацию фермента проводили так, чтобы емкость гетерогенного биокатализатора не превышала 1 мг фермента в расчете на объем монолитного диска. Данные по количеству иммобилизованной рибонуклеазы и суммарные результаты по расчету кинетических параметров гидролиза $\text{pOy}(U)$ иммобилизованной рибонуклеазой приведены в табл. 2. Как и в случае гетероген-

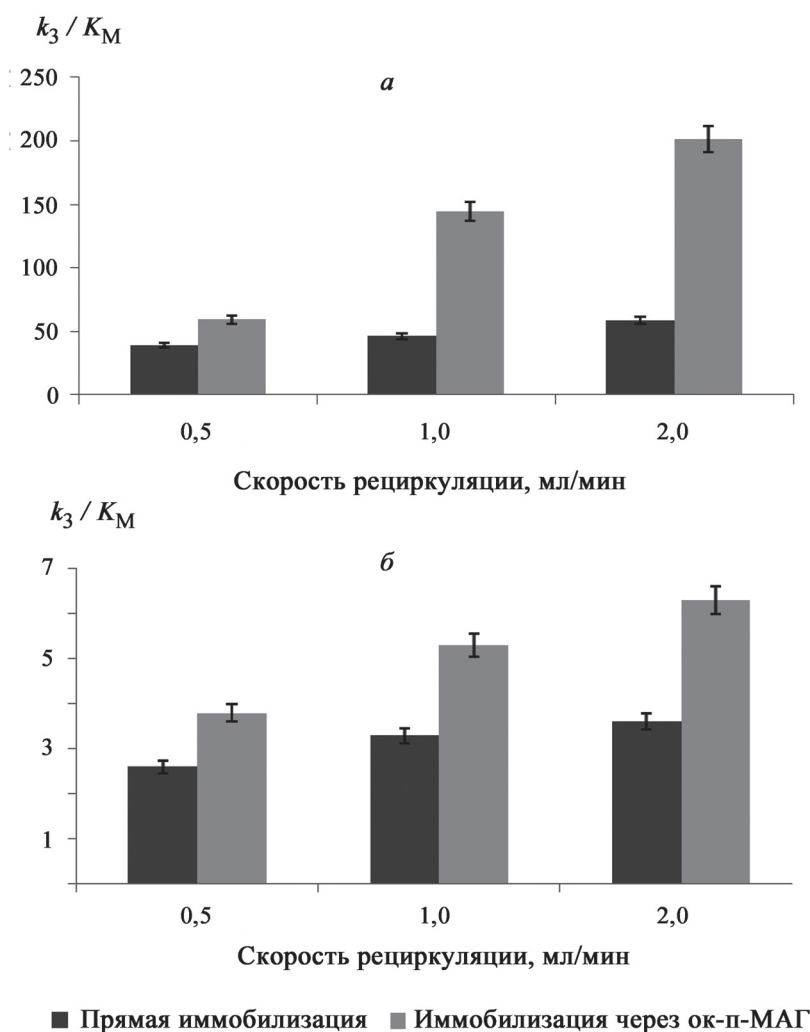


Рис. 2. Зависимость эффективности биокатализа от скорости рециркуляции субстрата через макропористые монолитные диски, содержащие иммобилизованные α -химотрипсин (а) и рибонуклеазу А (б)

Т а б л и ц а 2

Кинетические параметры гидролиза poly(U) рибонуклеазой А (скорость рециркуляции раствора субстрата 1,0 мл/мин)

Способ иммобилизации	m , мг/диск	K_M , мМ	A , мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	k_3 , мин ⁻¹
Прямая иммобилизация	1,0	2,6	0,6	8,5
Иммобилизация через ок-п-МАГ-11	0,8	4,9	1,9	25,7

ных биокатализаторов на основе химотрипсина, константа Михаэлиса и удельная активность иммобилизованной рибонуклеазы в реакции фосфолиза poly(U) имеют ту же тенденцию – обе величины возрастают в случае иммобилизации фермента через промежуточный макромолекулярный спейсер.

Для исследования влияния скорости рециркуляции субстрата на эффективность его ферментативного гидролиза проведена серия экспериментов по расщеплению низкомолекулярного субстрата БТЭЭ химотрипсином и высокомолекулярного субстрата poly(U) рибонуклеазой А при скорости рециркуляции 0,5; 1,0 и 2,0 мл/мин. Соответствующие зависимости представлены на рис. 2. Согласно полученным данным, увеличение скорости потока раствора субстрата сквозь тонкий слой стационарной фазы, несущей иммобилизованный фермент, способствовало заметному возрастанию эффективности гетерогенного биокатализа. Этот чрезвычайно важный результат можно объяснить тремя факторами:

1) увеличением диффузионной подвижности молекул субстрата, находящихся в подвижной фазе, при условии 100%-го конвективного потока сквозь стационарный слой [31];

2) отсутствием диффузионных затруднений при образовании специфической пары фермент-

субстрат и реализацией ферментативного процесса во временной шкале, близкой к наблюдаемой в растворе;

3) быстрым и беспрепятственным отводом от локализованного на поверхности реакционного центра образующегося продукта, что приводит к сдвигу равновесия в сторону его образования.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показывают, что макропористые носители монолитного типа могут быть использованы для конструирования эффективных ферментных реакторов. Установлено, что во всех случаях активность ферментов, иммобилизованных через полимерный спейсер, была выше по сравнению с прямой иммобилизацией на поверхности твердой фазы. При этом для обоих ферментов максимально эффективными были биокатализаторы, полученные с использованием в качестве спейсера п-МАГ-11. Изучение влияния скорости рециркуляции раствора субстрата на эффективность гетерогенного биокатализа в интервале 0,5–2,0 мл/мин позволило обнаружить рост эффективности ферментативного гидролиза независимо от способа прикрепления фермента.

Авторы выражают признательность Dr. Aleš Štrancar и фирме «BIA Separations» (Любляна, Словения) за предоставленные СИМ-диски.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Санкт-Петербургского государственного университета (№ 0.37.682.2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collar C., Martinez J.C., Andreu P., Armero E. // Food Sci. Technol. Int. 2000. Vol. 6. N 3. P. 217.
2. Martins M.B.F., Simoes S.I.D., Supico A., Cruz M.E.M. et al. // Int. J. Pharm. 1996. Vol. 142. N 1. P. 75.
3. Luque de Castro M.D., Herrera M.C. // Biosens. Bioelectron. 2003. Vol. 18. N 2–3. P. 279.
4. Schmidt A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A. et al. // Nature. 2001. Vol. 409. N 1. P. 258.
5. Brena B.M., Batista-Viera F. // Immobilization of Enzymes and Cells. Ch. 2 / Methods in Biotechnology (Ed. J.M. Guisan). Totowa, 2006. P. 16.
6. Rodrigues A., Mata V., Zabka M., Pais L. // Flow and mass transfer. Ch. 15 / Monolithic Materials: preparation, properties and application (Eds. T. Tennikova, Z. Deyl, F. Svec). Elsevier, Amsterdam, 2003. P. 325.
7. Tennikova T., Svec F. // J. Chromatogr. A. 1993. Vol. 646. N 1. P. 279.
8. Vlach E., Tennikova T. B. // J. Chromatogr. A. 2009. Vol. 1216. N. 13. P. 2637.
9. Kurganov A. // Anal. Chim. Acta 2013. Vol. 775. N 1. P. 25.
10. Eeltink S., Svec F. // Electrophoresis 2007. Vol. 28. N 1. P. 137.
11. Rober M., Walter J., Vlach E., Stahl F. et al. // Anal. Chim. Acta 2009. Vol. 644. N 1. P. 95.
12. Dulay M., Baca Q.J., Zare R.N. // Anal. Chem. 2005. Vol. 77. N 14. P. 4604.

13. Krenkova J., Bilkova Z., Foret F. // J. Sep. Sci. 2005, Vol. 28. N 14. P. 1675.
14. Duan J., Liang Z., Yang C., Zhang J. et al. // Proteomics 2006. Vol. 6. N 2. P. 412.
15. Peterson D.S., Rohr T., Svec F., Frechet J.M.J. // Anal. Chem. 2007. Vol. 79. N 11. P. 4081.
16. Krenkova J., Lacher N., Svec F. // Anal. Chem. 2009. Vol. 81. N 5. P. 2004.
17. Josic D., Schwinn H., Strancar A., Podgornik A. et al. // J. Chromatogr. A 1998. Vol. 803. N 1. P. 61.
18. Vodopivec M., Brcovic M., Jancar J., Podgornik A. et al. // Anal. Chim. Acta 2000. Vol. 407. N 1. P. 105.
19. Podgornik H., Podgornik A. // Enzyme Microbiol. Technol. 2002. Vol. 31. N 6. P. 855.
20. Bencina M., Bencina K., Strancar A., Podgornik A. // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1065. N 1. P. 83.
21. Lim Y.-P., Josic D., Callanan H., Brown J. et al. // J. Chromatogr. A 2005. Vol. 1065. N 1. P. 39.
22. Mancini F., Naldi M., Cavrini V., Andrisano V. // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1175. N 2. P. 217.
23. Delattre C., Michaud P., Vijayalakshmi M.A. // J. Chromatogr. B. 2008. Vol. 861. N 2. P. 203.
24. Bencina M., Bencina K., Strancar A., Podgornik A. // J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1160. N 1. P. 176.
25. Nicoli R., Gaud N., Stella C., Rudaz S. et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. Vol. 48. N 2. P. 398.
26. Calleri E., Temporini C., Perani E., Stella C. et al. // J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1045. N 1. P. 99.
27. Duan J., Sun L., Zhang J., Wang H. et al. // J. Chromatogr. A. 2006. Vol. 1106. N 1. P. 165.
28. Bartolini M., Cavrini V., Andrisano V. // J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1031. N 1. P. 27.
29. Korzhikov V.A., Diederichs S., Nazarova O.V., Vlach E.G. et al. // J. Appl. Polym. Sci. 2008. Vol. 108. N 4. P. 2386.
30. Eisenthal R., Danson M.J., Hough D.W. // Trends in Biotechnology. 2007. Vol. 25. N 6. P. 247.
31. Rodrigues A.E. // J. Chromatogr. B. 1997. Vol. 699. N 1. P. 47.

Поступила в редакцию 01.12.15

PREPARATION AND STUDY OF FLOW-THROUGH BIOREACTORS BASED ON MACROPOROUS MONOLITHS

E.G. Vlach^{1,2}, G.A. Platonova¹, T.B. Tennikova^{1,2}

(¹Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences; ²Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University)

The modification of surface of macroporous monolithic disks with hydrolytic enzymes, e.g. α -chymotrypsin and ribonuclease A, has been described. The influence of the enzyme immobilization approach, amount of the aldehyde groups in the polymer spacer as well as flow rate of substrate solution recirculation on the efficiency of heterogeneous biocatalysis was explored using as examples the reactions of hydrolysis both low and macromolecular substrates.

Key words: immobilized enzymes, macroporous monolithic carriers, flow-through biocatalysis, hydrolases.

Сведения об авторах: Влах Евгения Георгиевна – ст. науч. сотр. лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ИВС РАН и межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии СПбГУ, доцент, канд. хим. наук (vlakh@mail.ru); Платонова Галина Александровна – науч. сотр. лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ИВС РАН, канд. хим. наук (gplaton@mail.ru); Тенникова Татьяна Борисовна – гл. науч. сотр. лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ИВС РАН и зав. лаб. межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии СПбГУ, профессор, докт. хим. наук (tennikova@mail.ru).