

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ БАЗАЛЬТОВОГО ТУФУ
ЯК НОСІЯ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ГІДРОЛІТИЧНИХ
ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:
студентка 4 курсу, 407 групи
Гуменюк Ліліана Вартанівна

Керівник:
кандидат біологічних наук,
доцент Худа Л. В.

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2025 р.
Зав. кафедрою _____ доцент Волощук О.М.

Анотація

Кваліфікаційна робота присвячена підбору оптимальних параметрів та оцінці ефективності іммобілізації ферментного препарату Протосубтилін ГЗХ А-120 на базальтових туфах. Встановлено, що динамічні умови здійснення іммобілізації не призводять до змін кількості ферментного препарату, адсорбованого на поверхні та в порах носія при 0.5-1- годинній експозиції у порівнянні з статичним методом та зменшують концентрацію ферментного препарату при 3-годинній іммобілізації. Проведення процедури іммобілізації при температурі 30°C збільшує кількість адсорбованого препарату, проте істотно знижує його активність. Рівні протеолітичної, амілолітичної та ліполітичної активностей Протосубтиліну знижені в найбільшій мірі при 3-годинній іммобілізації за 30°C. З огляду на кількість Протосубтиліну, адсорбованого на поверхні та в порах носія, а також ферментативну активність його основних складових оптимальним варіантом є проведення 1-годинної статичної іммобілізації 1% Протосубтиліну при 20°C в 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,4) на базальтовому туфі в кінцевій концентрації 5%.

Ключові слова: іммобілізація, ферментний препарат, базальтовий туф, протеолітична активність, амілолітична активність, ліполітична активність .

Abstract

The qualification work is devoted to the selection of optimal parameters and evaluation of the effectiveness of immobilisation of the enzyme preparation Protosubtilin G3X A-120 on basalt tuffs. It has been established that dynamic immobilisation conditions do not lead to changes in the amount of enzyme preparation adsorbed on the surface and in the pores of the carrier during 0.5-1-hour exposure compared to the static method and reduce the concentration of the enzyme preparation during 3-hour immobilisation. Performing the immobilisation procedure at a temperature of 30°C increases the amount of

adsorbed preparation, but significantly reduces its activity. The levels of proteolytic, amylolytic and lipolytic activities of Protosubtilin are reduced to the greatest extent during 3-hour immobilisation at 30°C. Considering the amount of Protosubtilin adsorbed on the surface and in the pores of the carrier, as well as the enzymatic activity of its main components, the optimal option is to perform 1 hour of static immobilisation of 1% Protosubtilin at 20°C in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) on basalt tuff at a final concentration of 5%.

Keywords: immobilisation, enzyme preparation, basalt tuff, proteolytic activity, amylolytic activity, lipolytic activity.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Імобілізація ферментів як ефективний метод інженерної ензимології	8
1.2 Методи імобілізації ферментів.....	11
1.3 Особливості підбору носіїв для імобілізації ферментів.....	15
1.4 Властивості базальтових туфів як потенційних носіїв для імобілізації.....	16
1.5 Вибір ферментів для імобілізації у кормовиробництві.....	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	20
2.1. Матеріали досліджень	20
2.2. Методи досліджень.....	21
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1 Порівняльний аналіз ефективності статичної та динамічної адсорбційної імобілізації ферментного препарату Протосубтилін на базальтових туфах за різної тривалості процедури	26
3.2 Оцінка впливу температури на ефективність адсорбційної імобілізації ферментного препарату Протосубтилін на базальтових туфах.....	33
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42
ДОДАТКИ	48

Вступ

В природі ферменти часто функціонують асоціюючись з поверхнею клітинних мембран або внутрішньоклітинних структур. Саме такий спосіб їх локалізації сприяє тривалому збереженню каталітичної активності. Використання нативних ферментних препаратів в промисловості є досить обмеженим, що спонукає до пошуку альтернативних методів, які б забезпечували пролонговану активність ферментів. Суть цих методів полягає в прикріпленні ферменту до органічних чи неорганічних носіїв [1].

Методи іммобілізації ферментних препаратів – прогресивний напрям в сучасній біотехнології, адже дає можливість стабілізувати фермент і, як наслідок, підвищити його активність. Також не менш вагомою перевагою цих методів є можливість повторного використання ензимів, в різних біотехнологічних процесах [2].

Важливим етапом іммобілізації є підбір носіїв. Особливий інтерес становить використання природних матриць для іммобілізації, оскільки вони мають ряд переваг: легко доступні, екологічно безпечні, мають низьку собівартість [3]

Досліди, спрямовані на іммобілізацію ферментів саме на природних носіях, набирають значний інтерес у науково-дослідницькій практиці. Вони відкривають перспективи у розвитку нових біотехнологічних галузей, через значне збільшення виходу цільового продукту в певних виробничих процесах і, відповідно, значне зменшення економічних витрат при застосуванні ферментних препаратів [4].

Значна увага приділяється базальтовим туфам, через їх унікальні фізичні та хімічні властивості, адже вони мають високу пористість, що збільшує площу поверхні взаємодії з ензимом, при цьому є хімічно інертними і більш стабільними. Саме ці якості роблять базальтовий туф ідеальним кандидатом у використанні його як носій у процесі іммобілізації [5].

Проте, для отримання оптимальних результатів необхідно детально вивчати закономірності технології іммобілізації ензимів на базальтових туфах, зокрема, оптимальні умови, що будуть забезпечувати активність ферменту та його стабільність.

В сучасному тваринництві та аквакультурі, все більший інтерес викликають методи, які дозволяють покращити якість кормів та підвищити ефективність їх засвоєння. Одним із таких методів є використання іммобілізованих травних ферментів у складі комбікормів. Суть технології заключається в фіксації ферментів на різноманітних носіях, при цьому забезпечуючи їх стабільність і здатність каталізувати реакції.

Іммобілізовані ферменти мають ряд переваг у порівнянні із їх вільними аналогами. Зокрема, такі ензими більш стійкі до коливань температури та рН [6]. Не менш вагомою перевагою є економічна доцільність. Завдяки можливості контрольованого виділення активності, іммобілізовані ферменти забезпечують стабільну дію протягом усього періоду годівлі, що в свою чергу зменшує витрати на корми та кормові добавки

В контексті аквакультурної промисловості особливий інтерес становлять ферментні препарати з протеолітичною активністю, такі як протостубтилін ГЗХ. В складі цього ферментного препарату, окрім протеаз також наявні в меншій кількості й інші ферменти – амілази та ліпази.

Таким чином, іммобілізація травних ферментних препаратів, зокрема Протосубтиліну ГЗХ, дозволила б значно покращити засвоєння білкових компонентів корму, а також зменшила б затрати на його виробництво.

Метою даної роботи був підбір оптимальних параметрів та оцінка ефективності іммобілізації ферментного препарату Протосубтилін ГЗХ А-120 на базальтових туфах. Для виконання мети були поставлені наступні завдання:

1. Здійснити адсорбційну іммобілізацію ферментного препарату Протосубтилін ГЗХ А-120 на подрібненому базальтовому туфі з родовища «Полицьке-2»

2. Оцінити ефективність іммобілізації ферментного препарату на базальтовому туфі за різної тривалості іммобілізації та механічного перемішування

3. Підбрати оптимальну температуру для здійснення процедури іммобілізації ферментного препарату

4. Визначити рівень протеолітичної, амілолітичної та ліполітичної активності іммобілізованих ферментних препаратів за вищевказаних умов.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Імобілізація ферментів як ефективний метод інженерної ензимології

Імобілізовані ферменти є біокатализаторами, які або обмежені фізично, або локалізовані в певному просторі. При цьому такі ензими зберігають здатність каталізувати реакції. Загалом, це інтегрована система, до якої входять, безпосередньо, фермент та матриця, з якою він зв'язується, а також спосіб взаємодії між ними. Такі взаємодії можуть бути як і слабкими – зворотними з утворенням нековалентних зв'язків, так і незворотними – з утворенням ковалентних зв'язків. Залежно від типу імобілізації, фермент може змінювати свої властивості, такі як термостабільність чи здатність до каталізу реакції. [7]

Відповідно імобілізація ферментів – це методичний прийом, при якому молекулу біокатализатора включають у фазу, відокремлену від фази вільного розчину, але здатну обмінюватися з нею молекулами субстрату[2]

Методика імобілізації на твердому носії дає можливість покращити стабільність, як і при безпосередньому застосуванні ферментів, так і при зберіганні. Також дані методи спрощують відділення ензиму від реакційної суміші з можливістю повторного його використання [8].

Ці методи дають можливість використовувати ферменти поза клітинами та організмами, без втрати їхньої каталітичної здатності, що в свою чергу буде забезпечувати високий вихід цільового продукту з мінімальною кількістю відходів на підприємствах.

Імобілізовані системи широко використовуються в багатьох галузях – від харчової і до текстильно-оброблювальної. Наприклад, такий фермент як бета-галактозидазу імобілізують на волокна триацетату целюлози з метою подальшого використання в харчовій промисловості для гідролізу лактози. Такий підхід дозволяє людям із непереносимістю лактози, вживати молочні

продукти. При цьому, такі ферменти можна використовувати повторно, що набагато вигідніше, ніж застосування нативних ферментних препаратів [9].

Також іммобілізовані ферменти складають основу біокаталітичної технології очищення води, яка застосовується у виявленні та утилізації широкого спектру забруднювачів навколишнього середовища. Ці методи базуються на утворенні мікрокапсул із ферментами, які зв'язуються ковалентними зв'язками, саме вони і будуть забезпечувати процес адсорбції. Після чого йде безпосередня очистка вод [7,10].

Якщо говорити про галузь кормовиробництва, то вона є найресурсоємнішою в агропромисловому комплексі. Проте, ефективність використаних ресурсів все ще залишається низькою. Вагома частка поживних речовин не засвоюється тваринами і не бере участі в метаболічних процесах, транзитом виходячи з організму. Відповідно, зростає інтенсивність викидів таких як аміак, метан та фосфати, а вони вже в свою чергу активно забруднюють екосистеми ґрунтів, водойм та повітря. [11]

Одним із рішень цієї проблеми є підвищення засвоєння кормових компонентів. Це, в свою чергу, не тільки зменшить кількість відходів, але й буде стимулювати приріст маси тварини. В такому випадку можна або напряду змішувати ферментні розчини з кормом, або ж іммобілізувати їх на неорганічних твердих носіях. В першому випадку ферментні препарати можуть через чутливість до зовнішніх умов втрачати свою активність, проте в другому така проблема зникає.

У дослідженні, метою якого було порівняти вигодовування курчат, кормами із нормальною кількістю поживних речовин з кормами, в яких занижена їх кількість, але в складі присутні фермент амілаза у вільному та інкапсульованому стані, було встановлено, що показники конверсії корму та його засвоєння значно покращувались в групах з кормом, в складі якого був ферментний препарат. Більше того, приріст маси тіла в групах з інкапсульованим та вільним ферментом був на рівні із не дієтичним кормом. Варто зазначити, що використання інапсульованого ферменту виявилось

набагато кращим у порівнянні навіть з кормом, в якому був замішаний фермент у вільному стані, що дає можливість значно здешевити процес вигодовування тварин [12].

Безпосередню процедуру іммобілізації умовно можна поділити на кілька послідовних стадій.

На першому етапі потрібно вибрати сам фермент і його джерело. Це можуть бути ферменти як рослинного, тваринного походження, так і мікробного, також для здійснення процедури іммобілізації можна використовувати вже готові ферментні препарати [13].

Наступним кроком є підбір матриці – носія ензиму. Це може бути як природній, так штучний матеріал, різноманітні волокна, мембрани, скло, силікагелі, глина, величезна кількість полісахаридів та білків.

Носії для іммобілізації ферментів повинні відповідати ряду вимог, які будуть забезпечувати ефективність і стабільність ферментних систем. До них належать: висока хімічна стійкість та механічна міцність, можливість отримання їх у різних формах, гідрофільність, легка активація, велика площа поверхні для зв'язування з ензимами та низька собівартість. Комплекс цих характеристик визначає придатність носія до іммобілізації в умовах конкретного технологічного процесу, створюючи умови не тільки для збереження активності ферменту, а й економічну доцільність його використання [14].

Третій крок - з'єднання ензиму із самою матрицею. Зв'язування біокатализатора з носієм може відбуватись як оборотним так і не оборотним способом на рисунку 1 зображено класифікацію методів іммобілізації за типом взаємодії з носієм. Саме тип взаємодії буде визначати стабільність, а в подальшому придатність іммобілізованої системи до використання.

1.2 Методи іммобілізації ферментів

Ефективність процедури іммобілізації напряду залежить від способів прикріплення ферменту до поверхні матриці. Загалом, іммобілізувати ензими можна двома методами: це може бути або фізична (ізоляція молекули ензиму в інертному матеріалі), або хімічна іммобілізація (модифікація самого ферменту) (рис. 1.1.)[14].

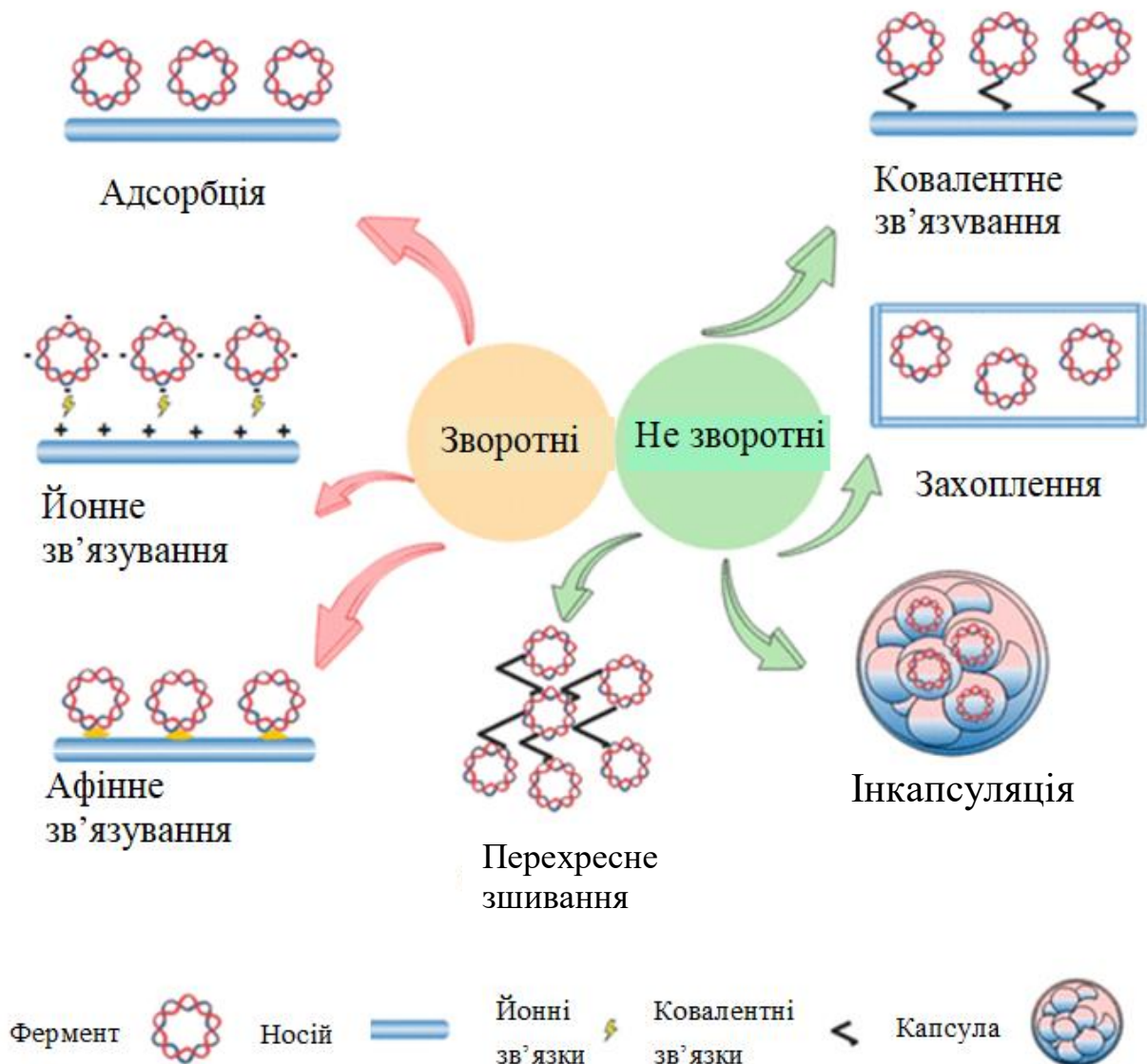


Рис. 1.1 Методи іммобілізації ферментів, засновані на здатності до зв'язку [15]

Хімічний метод іммобілізації базується на створенні ковалентних зв'язків із різними функціональними групами на поверхні молекули ензиму.

В такій спосіб утворюються більш стабільні системи. При цьому фермент із носієм з'єднуються не зворотно, що може викликати порушення в здатності ферменту до каталізу. Саме через при в хімічній іммобілізації важливо щоб, в процесі створенні ковалентних зв'язків брали тільки ті функціональні групи, які є не важливими для перебігу ферментативного процесу [14].

Таким чином згідно дослідження Almulaiku, Y. Q. та його колег, було іммобілізовано фермент лакказу на штучно синтезованих та модифікованих полімерних композитах на основі хітозану та альгінату. Даний метод підсилював ковалентне з'єднання біокаталізатора з носієм. При цьому іммобілізований фермент відзначався кращою термостабільністю зберігаючи від 48% до 67% активності при 70°C, в той час як його нативний аналог, за тих самих умов проявляв лише 29% активності. За таких умов фермент зберігав до 81% активності після десяти циклів використання та до 75% при тривалому зберіганні. Також, збільшилась і максимальна швидкість реакції, проте варто зазначити, що ковалентне зшивання призвело до часткової втрати спорідненості ензиму до субстрату. [16]

До цього ж типу з'єднання можна віднести Cross-linking або зшивання. Він також відноситься до незворотних способів іммобілізації ферментів, при цьому не потребують носія, тому цей метод також називають іммобілізацією без носія. В цьому випадку сам фермент виступає для себе матрицею, таким чином мінімізується втрата ферменту, при цьому отримують чистий препарат, усуваючи переваги і недоліки, пов'язані з носіями.

Суть цього методу полягає в зшиванні молекул ферменту між собою за дії спеціальних багатофункціональних реагентів. Найчастіше для здійснення процедури зшивання використовується глутаральдегід, який є дешевим і доступним, він реагує з аміногрупами ферментів, утворюючи стійкі міжмолекулярні зшивки [17].

Слід зазначити, що іммобілізація ферментів шляхом ковалентного зав'язування є не зворотнім процесом, оскільки створюються дуже міцні

ковалентні зв'язки. Основна проблема такого методу полягає в зшиванні молекул, при якому можуть пошкодитись функціонально важливі групи.

Натомість фізичні методи є зворотними, зв'язки утворені між ферментом і матрицею слабкі, таким чином фермент може вільно дифундувати з площі поверхні носія в реакційне середовище і навпаки. Це є одночасно як перевагою даного методу, так і недоліком. Фізичні методи можуть базуватися на процесі адсорбції або механічній іммобілізації. При адсорбційній іммобілізації ензим утримується на поверхні матриці за рахунок електростатичних, гідрофобних та водневих зв'язків, тип зв'язка забезпечується природою самого носія і функціональними групами молекули ензиму. В той час як, механічний спосіб базується на включенні ферменту в гель, це можуть бути мікрокапсули, волокна та мембрани.

До основних способів фізичної іммобілізації можна віднести: адсорбцію на нерозчинному носії, яка базується на слабких взаємодіях, включення в пори гелю, завдяки яким ензим утримується всередині матриці, відділення ферменту мембраною від реакційного середовища та включення у двофазне середовище.[3]

При адсорбційній іммобілізації фермент зв'язується із нерозчинним у воді носієм, при цьому розділити ці дві фази можна за допомогою центрифугування або фільтрації. Адсорбція не забезпечує міцного зв'язку ферменту з матрицею. Процес адсорбції здійснюється, або за рахунок контакту молекул ферменту з поверхнею матриці через електростатичну взаємодію між зарядженими групами, або через неспецифічні гідрофобні контакти. Наприклад, при рН, близькому до ізоелектричної точки ферменту, можуть утворюватися міцні комплекси з протилежними носіями заряду. Іонна сила розчину, полярність середовища і температура також відіграють важливу роль.

Фізична іммобілізація є не менш ефективною за хімічну. Відповідно до проаналізованих досліджень, іммобілізація шляхом адсорбції ферменту фосфоліпаза D на композитному носії, синтезованому на основі магнітних

наночастинок ферум(3)оксиду, демонструвало високу термостабільність із збереженням активності ферменту. Дані композити володіють магнітними властивостями, що в свою чергу, спрощує процедуру відділення наночастинок від реакційної суміші. Не менш вагомими є показники активності ферменту. За оптимальних умов вихід продукту зріс майже до 96%, що на 22% перевищує показник вільного ферменту, при цьому загальна продуктивність зросла майже в два рази. Даний метод іммобілізації також дає можливість використовувати фермент повторно, згідно дослідження навіть після десяти циклів використання, ензим зберігає понад 78% активності, що свідчить про стабільність системи і перспективу використання адсорбційної іммобілізації в промислових масштабах [18].

Існує кілька методів для створення іммобілізованих препаратів за допомогою адсорбції[14].

Перший метод - статичний полягає в тому, що матрицю додають у водний розчин із ферментом, після чого суміш залишають на певний час без перемішування. В основі методу лежить явище довільної дифузії ферменту, завдяки цьому він прикріплюється до матриці з подальшою адсорбцією [17].

Наступний метод – динамічний, суть методу схожа з попереднім але при цьому використовується перемішування.

Іншим методом є електроосадження, яке передбачає використання двох електродів, що занурюють в розчин ферменту, на одному з яких тонким шаром нанесений сам носій (адсорбент). Так як на поверхні ферменту наявні заряджені групи, то за дії електричного струму вони переміщуються в розчині й осаджуються на поверхні адсорбенту.

Останній метод – нанесення ферменту на носій в колонці. Колонку попередньо наповнюють майбутньою матрицею, потім через неї пропускають розчин ферменту, самі молекули повинні рухатись так, щоб утворювся так званий «кип'ячий шар» [19]

Вибір методу іммобілізації зазвичай залежить від конкретного завдання, властивостей ферменту, умов роботи (температура, рН,

середовище) та економічної доцільності. Ефективність використання ферменту в промислових або лабораторних масштабах залежить від відповідного методу.

1.3 Особливості підбору носіїв для іммобілізації ферментів

Найважливішим етапом в процесі іммобілізації є правильний підбір матриці, вона повинна відповідати всім вимогам, які були перелічені вище. Саме властивості матриці будуть визначати кількість молекул ензиму, які будуть з нею зв'язуватись, при цьому забезпечувати стабільність ензиму і зберігати його активність [20].

Існує досить широкий спектр матриць для фізичної іммобілізації, але всіх їх можна розділити на дві категорії – органічні (полімерні) носії та неорганічні.

Органічні матриці як низькомолекулярні, так і високомолекулярні, за походженням можуть бути природні або синтетичні.

Природні в свою чергу поділяються на три основні групи: полісахаридні, білки, ліпіди [21]

Природні полімери або біополімери, такі як хітозан, агароза та целюлоза, отримують із живих організмів і широко використовуються завдяки своїй біосумісності, і високій здатності до біодеградації, низькій токсичності та високій спорідненості з ферментами [22]. В свою чергу синтетичні полімерні носії розділяють на різні групи відповідно до їхньої хімічної будови головного ланцюга макромолекули. Такі матриці часто використовують у вигляді макропористих та мікропористих станів, до них відносять іонообмінники типу дауекса та амберліта, які представлені у вигляді гранул кополімерів стиролу та дивініл бензолу. Синтетичні полімери, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ) і полівініловий спирт (ПВС), є синтетичними і цінуються за їх високу універсальність, легку функціональність для конкретних застосувань, структурну стабільність і здатність захищати біомолекули від деградації, тим самим підвищуючи їх стійкість [22,23].

Гібридні матриці, що складаються із суміші неорганічних і органічних матеріалів, утворюють особливий комплекс, які комбінують в собі властивості обох компонентів.

Неорганічні носії, можуть бути представлені різними металами, або їх оксидами, різноманітними видами глини, синтетичними кремнезевими сорбентами, керамікою та іншими природними матеріалами [21].

1.4 Властивості базальтових туфів як потенційних носіїв для іммобілізації

Територія західної частини України багата на відклади вулканічних туфів. Вони складають цілу провінцію алюмосилікатної та іншої сировини з можливими унікальними адсорбційними або іонообмінними властивостями. На території України туфи утворюють вулканоуламковий покрив площею приблизно 200 тис. км² і середньою потужністю 100 м. Їхні ресурси оцінюються понад мільярд тонн, що свідчить про важливість туфів як потенційної сировини для регіону [24].

Відповідно до визначення IUGS, туф це порода, утворена в результаті вулканічної діяльності, при цьому в складі містить не менше 75% вулканічного попелу із розміром часточок до 2 мм. Але на разі загально прийнятий термін «туф» частіше використовують з метою опису будь-якої породи вулканічного походження, що в свою чергу має містити понад 75% пірокластів (уламки кристалів, скла, гірських порід) різних за розміром[25]. Туфи можна класифікувати на базальтові, андезитові, ліпаритові та інші [26]. У промисловості , базальт може використовуватися у формі литого базальту, волокон та композитів[27]

Базальтові туфи – мінерали, утворені в результаті вулканічної активності. Їх хімічний склад та структура дуже близька до цеолітів. Вони володіють високою хімічною, механічною та термічною стійкостями. [13]

Хімічний склад базальтових туфів родовища «Полицьке-2» (у відсотках оксидів за масою). [28]

SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	SO ₃
67,44	1,75	12,82	10,14	0,09	5,02	0,46	0,94	1,06	0,16	0,11

Базальтові туфи родовища «Полицьке-2» є кремнеземистими алюмосилікатними породами з незначним вмістом лужних елементів, що забезпечує їм високу хімічну стійкість та пористу структуру. Їх мінералогічний склад надає матеріалу механічної міцності та здатності до адсорбції. Туфи мають властивості, типові для природних кремнеземів: гідроксильні групи на поверхні, здатність утворювати водневі зв'язки з полярними молекулами, наявність структурної води та негативно заряджену поверхню. Усе це забезпечує їм здатність до йонного обміну, що дозволяє класифікувати туфи як природні катіонообмінники. До складу породи входять також мікроелементи, такі як цинк, мідь, кобальт і нікель, при цьому токсичних хімічних елементів не виявлено, що робить матеріал безпечним для використання. Відповідно, завдяки пористості, розвиненій питомій поверхні та хімічному складу, базальтові туфи мають потенціал для використання в медицині як ентеросорбенти, та можуть виступати в якості носіїв для ліків або ферментів [28]

1.5 Вибір ферментів для іммобілізації у кормовиробництві

Широкий спектр ферментів, які забезпечують перетворення органічних речовин в екосистемах, можуть бути синтезовані мікроорганізмами. Саме тому ферменти мікробного походження знайшли широке використання в харчовій промисловості та кормовиробництві. Варто зазначити, що більша

частина сучасних ферментних препаратів представляють собою комплекс, в якому окрім провідної активності присутні і додаткові. Це забезпечує розширення функціональних властивостей препарату.

Також не менш важливим є те, що ефективність ферментних препаратів у виробничих процесах залежить не лише від типу каталізованої реакції, а й від фізико-хімічних параметрів середовища (рН, температура, стабільність активності, наявність активаторів чи інгібіторів). Ще одним фактором, який обов'язково треба враховувати, є ступінь очищення, наявність допоміжних чи баластних речовин та інших параметрів, що впливають на технологічні процеси, безпеку та економічну доцільність.[31]

Використання ферментних препаратів в сучасному тваринництві є досить поширеною практикою. Вони сприяють кращому засвоєнню поживних речовин, завдяки ефективному розщепленню полімерних кормових компонентів. В свою чергу, тварина швидше росте та набирає масу [26]

Відповідно до корму, який використовується для вигодівлі, можна підібрати ферментні препарати, які будуть сприяти кращому засвоєнню поживних речовин. Якщо говорити про комбікорма, що використовуються в промисловій аквакультури, то варто звернути увагу на ферментні препарати, які переважно володіють протеолітичною активністю, так як більше 50% корму складає білок.[32] В цьому контексті особливий інтерес становить використання Протосубтиліну ГЗХ.

Протосубтилін - комплексний ферментний препарат, який продукується мікробною культурою *Bacillus subtilis* [30] Даний ферментний препарат, а саме субтилізин, який входить в його склад, забезпечує гідроліз, впершу чергу, білків до пептидів та амінокислот [27].

В таблиці наведені оптимальні умови для підтримки активності ферментного препарату Протосубтилін ГЗХ:

Протосубтилін ГЗХ використовуюють у різноманітних галузях включаючи фармацевтику, харчову та хімічну промисловість. Оскільки це комплексний ферментний препарат, до його складу окрім субтилізину входять β -глюканази, ксиланази та целюлази, то сукупність всіх ферментів чинять загальний ефект на цільовий продукт гідролізу

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали досліджень

Для виконання даної роботи використовували такі матеріали:

В якості матриці – подрібнений до 2 мм, термічно неактивований базальтовий туф з родовища «Полицьке-2», в якості іммобілізованого матеріалу – ферментні препарати Протосубтилін ГЗХ.

Використовували 1% розчин ферментного препарату, який розчиняли у 0,05 М фосфатному буфері з рН 7,4.

Іммобілізацію здійснювали шляхом інкубації 1 г базальтового туфу з 20 мл розчину ферментного препарату. Витримування здійснювали в трьох варіантах умов: статичне — без перемішування; динамічне — з перемішуванням на лабораторному шейкері зі швидкістю 40 обертів за хвилину; статичне при контрольованій температурі +30 °С. Тривалість контакту ферменту з носієм у кожному варіанті становила 0,5, 1 та 3 години. Після завершення інкубації суміші піддавали центрифугуванню при 3000 об/хв протягом 10 хвилин для відокремлення нерозчинного компонента — туфу — від рідкої фази. Надосадову рідину збирали та використовували для оцінки залишкової кількості білка з метою визначення ефективності іммобілізації.

Кількісний аналіз білка в розчинах до та після іммобілізації проводили за методом Лоурі за довжини хвилі 750 нм.

Для оцінки кількості ферменту, що був адсорбований на поверхні туфу, здійснювали зворотну десорбцію. З цією метою тведу фазу промивали 100 мл дистильованої води за для позбавлення білкових структур які погано прикріпились. Сам процес десорбції проводили з використанням 0,4 М натрій хлориду[33] та витримували суміш протягом 1 години. Після повторного центрифугування надосадову рідину відбирали для подальшого аналізу.

Ферментативну активність протеаз у вихідному, залишковому та десорбованому розчинах визначали за модифікованим методом Ансона з використанням казеїну як субстрату.

Активність амілаз оцінювали за колориметричним методом Каравея, який базується на гідролізі крохмалю та подальшому аналізі його залишкової кількості за інтенсивністю взаємодії з йодом.

Активність ліпаз визначали за стандартною методикою, що передбачає гідроліз тригліцеридів очищеної маслинової олії. Загальна ефективність іммобілізації оцінювалась за зменшенням білка в розчині після контакту з носієм, а також за збереженням каталітичної активності кожного з ферментів після іммобілізації та десорбції.

2.2. Методи досліджень

Визначення протеолітичної активності модифікованим методом Ансона

Протеолітичну активність визначали за модифікованим методом Ансона при рН 7,4 з використанням казеїну як субстрату. Метод ґрунтується на гідролізі білка під дією протеаз із утворенням пептидів та вільних амінокислот, зокрема тирозину, кількість якого визначається колориметрично після реакції з реактивом Фоліна. За одиницю протеолітичної активності приймається така кількість ферменту, яка за 1 хвилину при температурі 30 °С перетворює казеїн у розчинні у трихлороцтовій кислоті продукти, що відповідає утворенню 1 мкмоль тирозину.

Для оцінки протеолітичної активності для кожного зразка готували три проби – дослідну, контрольну та холосту.

В дослідну пробу вносили 0,125 мл 2 % розчину казеїну та 0,250 мл досліджуваного розчину ферменту. Після цього витримували проби при 30 °С на водяній бані протягом 30 хв. По завершенню інкубації, реакцію зупиняли шляхом додавання до проби 0,5 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти.

Для приготування контрольної проби вносили 0,125 мл 2% розчину казеїну, 0,250 мл досліджуваного розчину ферментного препарату та одразу припиняли реакцію шляхом додавання 0,5 мл 5 % розчину трихлороцтової

кислоти. Після цього пробу також відправляли на інкубацію при 37°C на пів години.

Після здійснення інкубації всі проби центрифугували протягом 15 хв при 3 000 g для осадження білкових молекул. Із надосадової рідини відбирали по 0,5 мл, додавали 2,5 мл 0,5 М розчину Na₂CO₃ та 0,5 мл реактиву Фоліна (розведеного 1:1). Суміш ретельно перемішували і залишали в темному місці на інкубацію протягом 30 хв.

Колориметричне вимірювання проводили за довжини хвилі 670 нм у кюветах із товщиною шару 10 мм відносно холостої проби. Для її приготування в 0,5 мл 0,05М фосфатного буфера рН 7,4, додавали 2,5 мл натрій карбоната та 0,5 мл реактиву Фоліна (розведеного 1:1 з водою).

Отримані результати використовували для розрахунку протеолітичної активності шляхом побудови калібрувального графіка за стандартом тирозину.

Розрахунок проводили за формулою:

$$ПА = \frac{D * 0,1 * V_{із\ тхо}}{0,25 * V_{поч} * 30 * мг \frac{білку}{мл}}$$

D – величина оптичної щільності, $D_{дос.} - D_{кон.}$;

$V_{із\ тхо}$ – 0,5 мл;

$V_{дос.}$ – об'єм розчину ферменту, 0,25 мл;

30 – час інкубації при 30° С, хв;

0, 25 – коефіцієнт екстинкції розчину тирозину концентрацією 0,1 мкмоль/мл [34]

Визначення вмісту загального білку за методом Лоурі

Методика визначення загальної кількості білка за Лоурі базується на реакції реактиву Фоліна – Чокальтеу з тирозином та триптофаном в складі білкових компонентів. Комплекс з видимим спектром поглинання утворюється внаслідок двох незалежних реакцій: біуретової реакції купрум-

іонів з пептидними зв'язками в лужному середовищі та реакції відновлення фосфатмолібденової та фосфатвольфрамової солей, які входять до складу реактиву Фоліна.

Для оцінки вмісту білка в зразках ми підготовлювали дослідні та одну холосту пробу.

В дослідну пробу додавали 0,1 мл досліджуваного розчину ферментного препарату, 0,9 мл води та 2 мл реактиву С після чого суміш струшували та витримували протягом 10 хв, після додавали 0,2 мл реактиву Е, та витримували 30 хв в темному місці.

В контрольну пробу додавали 1 мл води та 2 мл реактиву С.

Колориметрували при $\lambda=750$ нм в кюветах з товщиною поглинаючого світлошару 0,5 мм. Розрахунок проводили за калібрувальною кривою з використанням бичачого сироваткового альбуміну [35].

Визначення загальної амілолітичної активності за методикою

Каравея

Метод ґрунтується на здатності α -амілази гідролізувати крохмаль, внаслідок чого зменшується інтенсивність забарвлення йод-крохмального комплексу. Зниження оптичної щільності прямо пропорційне активності ферменту.

Для визначення активності амілази готували дві проби для кожного зразка, дослідну та контрольну.

Перед аналізом реагенти витримували 30 хв при кімнатній температурі, потім готували робочий розчин йоду шляхом розведення основного розчину в 10 разів, субстратно – буферний розчин готували із змішуванням 1% розчину крохмалю і буфером у співвідношенні 1:24.

Для приготування дослідної та контрольної проби в пробірку додавали 0,5 мл субстратно-буферного розчину та ставили на водяну баню при 37°C, та інкубували протягом 5 хв, всі наступні реактиви додавали вже у водяній бані. Далі в дослідну пробі додавали 0,01 мл досліджуваного розчину

ферментного препарату, та витримували 7,5 хв і дослід і контроль. По завершенню часу витримки в контрольну пробу додавали 0,01 мл ферментного розчину. І в дослідну і в контрольну проби додавали 4 мл. Води та 0,5 мл робочого розчину йоду

Для аналізу використовували фотоелектроколориметрування при довжині хвилі 640 нм в кюветах з довжиною шару поглинання 10мм.

Розрахунок активності здійснюється за формулами:

$$A \text{ Амілази (діастази)}, \frac{\text{г}}{\text{год} \cdot \text{л}} = \frac{E_{\text{холост}} - E_{\text{дослід}}}{E_{\text{холост}}} * 160,0, \text{ де}$$

160,0 – коефіцієнт перерахунку на кількість крохмалю в грамах, гідролізованого в аналізованій рідині в 1 л за 1 год інкубації;

$E_{\text{дослід}}$ – оптична густина дослідної проби, од. екстинції;

$E_{\text{холост}}$ – оптична густина холостої проби, од. екстинції [36].

Уніфікований метод визначення активності ліпази

Визначення активності ліпази ґрунтується на здатності ферменту гідролізувати тригліцериди, які знаходяться в складі маслинової олії, з утворенням вільних жирних кислот. Метод є колориметричним та дозволяє кількісно оцінити активність ферменту за зміною оптичної густини реакційної суміші в ультрафіолетовій області спектру.

Перед початком аналізу всі реактиви необхідно довести до робочої температури — 37 °С. У пробірку додавали 3 мл робочого розчину оливкової олії та 0,1 мл досліджуваного ферментного розчину. Суміш інкубуваоаи протягом 2 хвилин при температурі 37 °С у водяній бані або термостаті. Після інкубації вимірювали оптичну густина розчину в кюветі з товщиною шару 10 мм на довжині хвилі 340 нм відносно дистильованої води.

Після першого вимірювання пробірку повертали у термостат ще на 5 хвилин, після чого повторно вимірювали оптичну густина за тих самих умов. Різниця між показниками дозволяє розрахувати активність ліпази.

Розрахунок здійснювали за формулою:

$$ЛА \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{хв} * \text{л}} \right) = \frac{\Delta E * 170 * 3 * 1000}{E_k * 1000 * 0.1}, \text{де}$$

ΔE - зміна екстинкції дослідної проби за 1 хв;

170 - концентрація маслинової олії в робочій емульсії (мкмоль/л), за якої екстинкція дорівнює приблизно 1;

E_k - екстинкція робочої емульсії маслинової олії (170 мкмоль/л);

3/1 000 - об'єм робочої емульсії маслинової олії у літрах;

1000/0,1 - коефіцієнт перерахунку на 1 л гомогенату [36].

Статистичну обробку даних здійснювали із використанням критерію непараметричної статистики Манна-Уїтні. Різницю вважали достовірною за умов $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Порівняльний аналіз ефективності статичної та динамічної адсорбційної іммобілізації ферментного препарату Протосубтилін на базальтових туфах за різної тривалості процедури

Як відомо, процедура адсорбційної іммобілізації передбачає змішування наважки ферменту та носія, проведення інкубації та, надалі, відокремлення нерозчинної матриці від розчинного ферментного препарату фільтруванням або центрифугуванням.

В нашому дослідженні іммобілізацію ферментного препарату Протосубтилін здійснювали адсорбційним способом, за різних фізичних умов, на твердій природній матриці – подрібнених цеолітах з родовища «Полицьке-2». Тривалість контакту ферменту з носієм у кожному варіанті становила 0,5, 1 та 3 години. Для оцінки ефективності іммобілізації нами було використано два підходи:

1. Оцінка вмісту загального білку, присутнього у розчині, до та після процедури іммобілізації.

Враховуючи те, що в розчині, окрім ферментного препарату не містяться інші білки, вміст білка співвідноситься з кількістю ферментного препарату, присутнього у розчині. При цьому вважали, що чим більше білку залишається в розчині, тим менш ефективно ензим зв'язується з носієм.

2. Оцінка активності ферментного препарату в розчині до та після процедури іммобілізації.

У ідеальному випадку іммобілізація ферментів не має призводити до втрати їх каталітичної активності, проте сама процедура іммобілізації – дуже чутлива до дії різних факторів (температура, рН, розмір пор носія тощо), які можуть спричинити зниження ферментативної активності. Відповідно, визначали загальну протеолітичну активність ферментного препарату у розчині до та після процедури іммобілізації, а також амілотітичну та ліполітичну активності.

Окрім того, нами була здійснена процедура десорбції ферменту з носія 0,4 М хлоридом натрію для оцінки безпосередньої кількості та активності адсорбованого ферментного препарату в порях туфу.

Імобілізація ферментів на твердих неорганічних носіях шляхом адсорбції є одним із найпоширеніших методів підвищення їхньої стабільності та придатності до багаторазового застосування. У ролі носія ефективно може використовуватись базальтовий туф — пористий алюмосилікатний матеріал, здатний зв'язувати ферменти завдяки розвиненій поверхні. Принцип дії фізичної адсорбції ґрунтується на слабких нековалентних взаємодіях, зокрема іонних, водневих зв'язках, гідрофобній взаємодії та силах Ван дер Ваальса, що виникають між молекулою ферменту й поверхнею носія.

Результати проведених досліджень показали, що за умов статичної імобілізації спостерігалась тенденція до зростання ефективності зв'язування ферментного препарату з носієм із збільшенням тривалості його витримки (рис. 3.1).

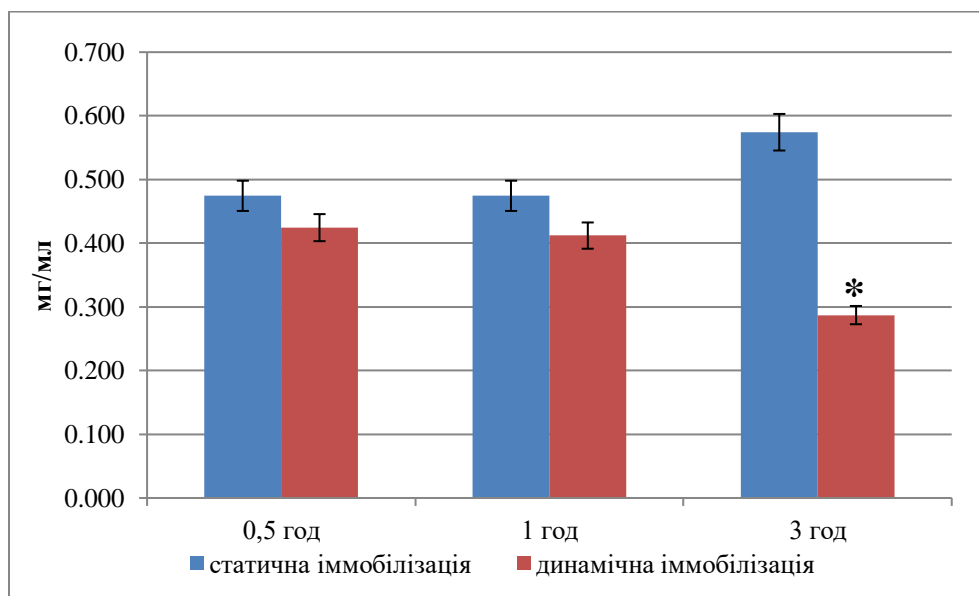


Рис.3.1 Кількість ферментного препарату, адсорбованого на базальтовому туфі за умови статичної та динамічної імобілізації

Примітка (тут і надалі):* - різниця відносно групи «статична імобілізація» достовірна ($p \leq 0,05$).

Наведений графік відображає кількість іммобілізованого ензимного препарату, який гіпотетично закріпився на поверхні носія – туфу та розраховується, як різниця вмісту білку в розчинах до та після процедури іммобілізації. В ході проведення процедури статичної іммобілізації достовірних змін концентрації адсорбованого ферментного препарату залежно від тривалості іммобілізації не спостерігали. В свою чергу, динамічна іммобілізація демонструє нам іншу динаміку. Показник ефективності іммобілізації при 3 годинному струшуванні значно зменшився (в 2 рази) у порівнянні із значеннями при статичній іммобілізації.

Порівнюючи отримані результати, можна сказати, що максимальна кількість іммобілізованого препарату спостерігалась за умов статичної іммобілізації, при цьому даний показник приблизно вдвічі вищий, ніж при умовах динамічної 3 год іммобілізації.

Хоча, перемішування і вважається, дієвим методом для збільшення ефективності іммобілізації, отримані данні вказують на те, що тривале струшування ферментного препарату з носієм призводить до мінімального адсорбційного ефекту. Ймовірно, такі дані можуть вказувати на те, що тривале механічне навантаження перешкоджає нормальному закріпленню ферменту на поверхні сорбенту, що відповідно й могло сприяти різкому зниженню ефективності іммобілізації саме за цих умов.

Таким чином, показник адсорбованого білка вказує на те, що умови статичної іммобілізації є ефективнішими за динамічні. Отримані результати узгоджуються з концепцією, де вказано що надмірна інтенсифікація умов іммобілізації, в тому числі і перемішування, може знижувати загальний вихід через десорбцію білка. [37]

З метою оцінки ефективності іммобілізації необхідно оцінити ступінь утримування ферменту в порах носія. У цій роботі наведено експериментальні дані щодо десорбції протеолітичного ферменту протосубтилін ГЗХ з базальтового туфу, отримані за різних умов іммобілізації. Усі зразки після іммобілізації десорбувалися в

стандартизованих, однакових умовах, що дозволило об'єктивно оцінити ефективність фіксації ферменту залежно саме від умов іммобілізації.

Слід відмітити, що десорбцію ми здійснювали за допомогою 0,4 М хлориду натрію. Він сприяє зменшенню гідрофобних взаємодій між ферментом і поверхнею туфу. Гідрофобні взаємодії можуть бути однією з причин міцного зв'язування ферменту з носієм, і додавання NaCl допомагає розірвати ці взаємодії, тим самим сприяючи вивільненню ферменту. Також хлорид натрію підвищує іонну силу розчину, що сприяє зниженню електростатичної взаємодії між зарядженими групами ферменту та поверхнею матриці. Внаслідок цього сили адсорбції слабшають і сила, що утримує фермент на поверхні туфу зникає. Саме це сприяє його вивільненню. Отримані результати показали, що динамічні умови іммобілізації суттєво зменшили кількість ферменту, що десорбувався з пор носія, порівняно зі статичними умовами при 3-годинній іммобілізації (рис. 3.2.)

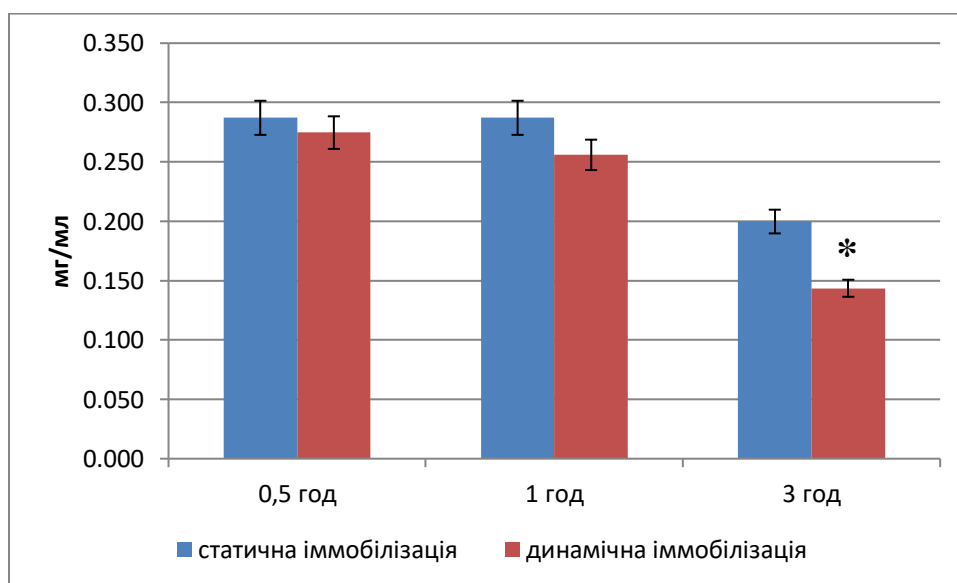


Рис 3.2 Кількість ферментного препарату, десорбованого з базальтового туфа за умови статичної та динамічної іммобілізації

Примітка (тут і надалі):* - різниця відносно групи «статична іммобілізація» достовірна ($p \leq 0,05$).

У випадку півгодинної експозиції концентрація десорбованого Протосубтиліну в розчині для динамічного варіанту не відрізнялась від відповідного показника статичного варіанту.

Надалі спостерігали поступове зниження концентрації ферментного препарату, яка при 3-годинній експозиції знизилась майже в 1.5 рази. За умов динамічної іммобілізації тенденція до зниження концентрації десорбованого ферменту зберігалась та досягла різниці зі статичним варіантом у 28% при 3-годинній іммобілізації, Це свідчить про формування міцніших зв'язків ферменту з носієм унаслідок перемішування під час адсорбції.

Таким чином, за даних умов найкращим варіантом іммобілізації досліджуваного ферментного препарату виявилась статична іммобілізація.

Як відомо, іммобілізація може призводити до часткової втрати каталітичної активності. Важливо, щоб адсорбований ферментний препарат зберігав свою активність, адже іммобілізація може істотно вплинути на зв'язування активного центру ферменту з субстратом. Для перевірки цього нами були проведені дослідження з визначення основних ферментативних активностей, притаманних цьому ферментному препарату – протеолітичної, ліполітичної та амілолітичної.

Результати досліджень продемонстрували значно нижчу (у 3,5 рази) протеолітичну активність ферментного препарату за умов 0,5 годинної динамічної іммобілізації в порівнянні із статичною (рис. 3.3.)

Це може бути наслідком того, що тривала витримка та перемішування суспензії призводить до десорбції білкових молекул, що в свою чергу викликає втрату активності іммобілізованого ферменту. При цьому, не менш важливим, є час витримки носія з ферментом.

Із збільшенням інкубації статична система іммобілізації при 1 год демонструє на 81% більшу активність ніж при 0,5 год витримці за динамічних умов.. Водночас між 1 год та 3 год витримкою особливих змін не спостерігаємо.

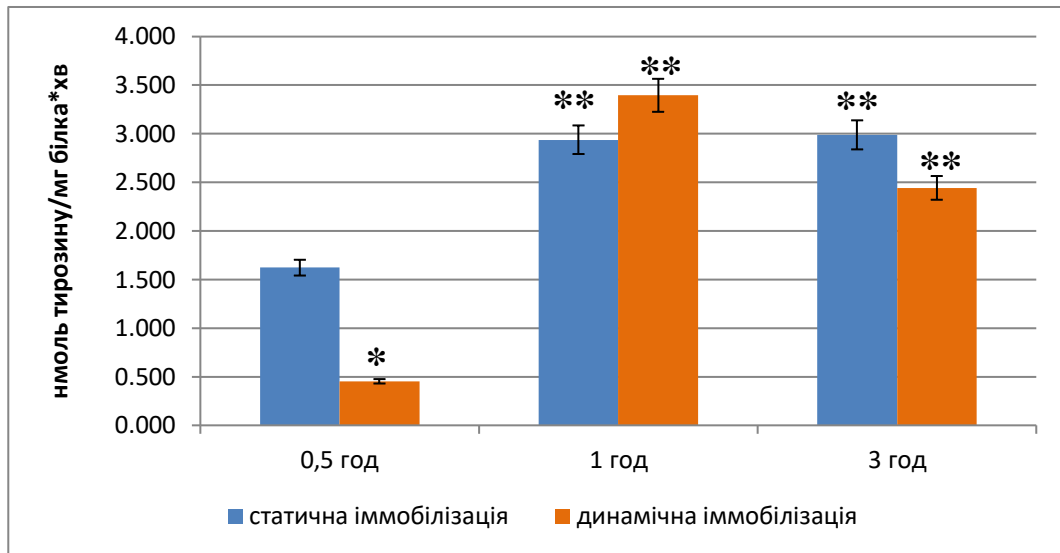


Рис 3.3 Протеолітична активність ферментного препарату, адсорбованого на базальтовому туфі за умови статичної та динамічної іммобілізації

Примітка:* - різниця відносно групи «статична іммобілізація» достовірна ($p \leq 0,05$); ** - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

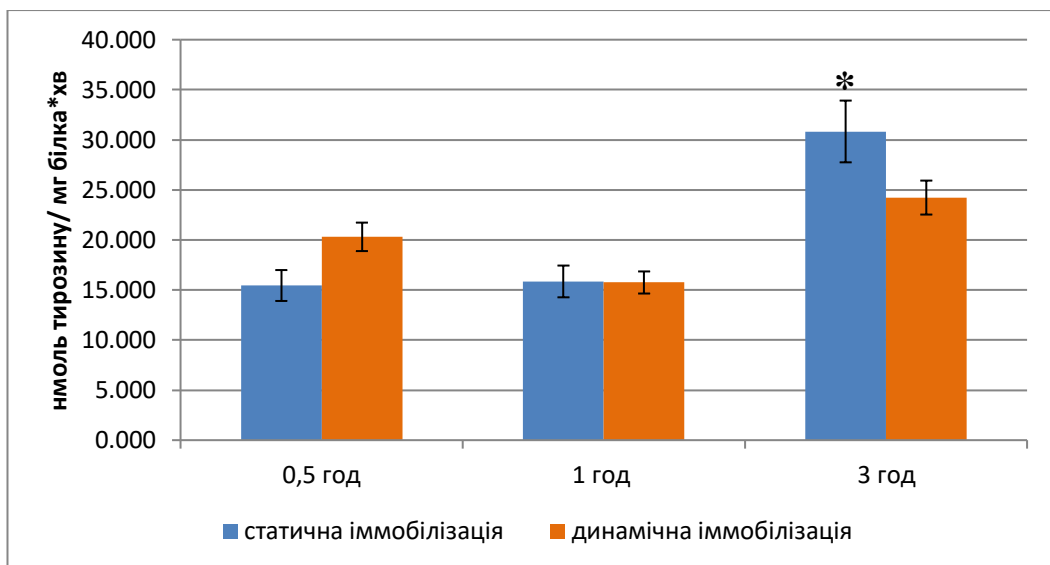


Рис 3.4 Активність протеаз, десорбованих з базальтового туфу за умови статичної та динамічної іммобілізації

Примітка: * - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

Як видно з результатів, представлених на рисунку 3.3., мінімальне значення протеолітичної активності препарату при 0,5-годинній динамічній іммобілізації може бути пояснене міцним зв'язуванням ферменту не з поверхнею носія, а у складі пор туфу. Результати протеолітичної активності десорбованого з пор носія ферментного препарату підтверджують це припущення.

Отже, максимальну концентрацію та протеолітичну активність ферментного препарату Протосубтилін можна отримати шляхом 3-годинної статичної іммобілізації.

Протосубтилін ГЗХ в своєму складі містить окрім протеаз ще й амілази. Тому логічним кроком було визначити амілолітичну активність. Нами отримані аналогічні до попередніх результати активності ферментного препарату, десорбованого з пор туфу.

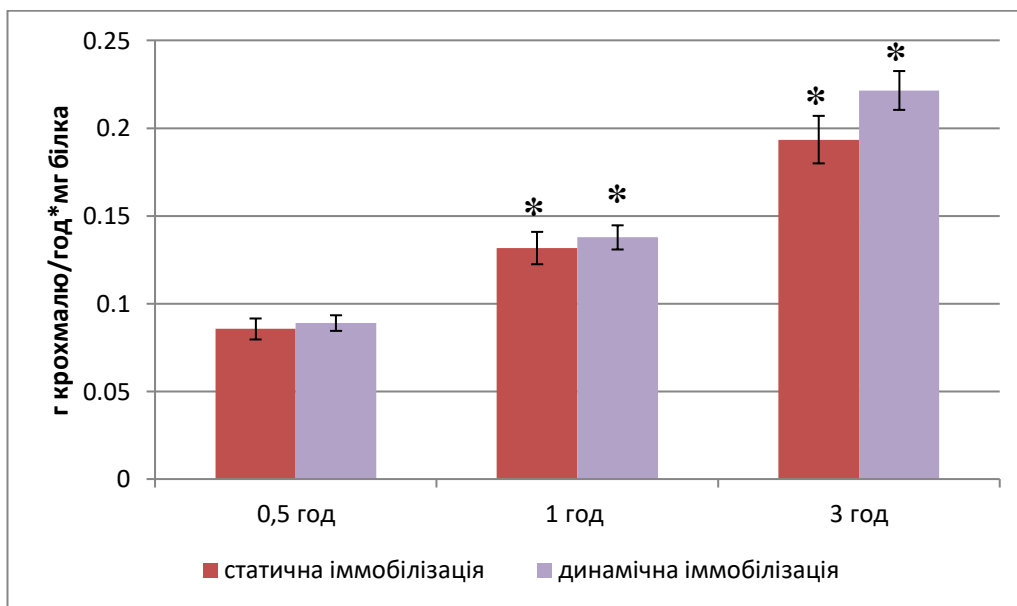


Рис 3.5 Активність амілази, десорбованої на базальтовому туфі за умови статичної та динамічної іммобілізації

Примітка: * - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

Амілолітична активність ферменту, іммобілізованого в порах туфу після 0,5- та 1-годинної динамічної іммобілізації майже не відрізнялась від

свого статичного варіанту. Натомість, у варіанті після 3 годинного струшування активність амілази зросла на 14,5% відповідно до його статичного аналога. Така тенденція свідчить про вищу загальну десорбцію ферменту при динамічному режимі, що може бути пов'язано як із більшим вихідним навантаженням ферменту, так і з частковим зміщенням рівноваги сорбції через механічний вплив перемішування.

Результати дослідження ліполітичної активності іммобілізованого препарату показали відсутність достовірної різниці між статичним та динамічним методом іммобілізації (рис. 3.6.) Проте реєструємо зростання ферментативної активності із збільшенням часу витримки препарату з носієм.

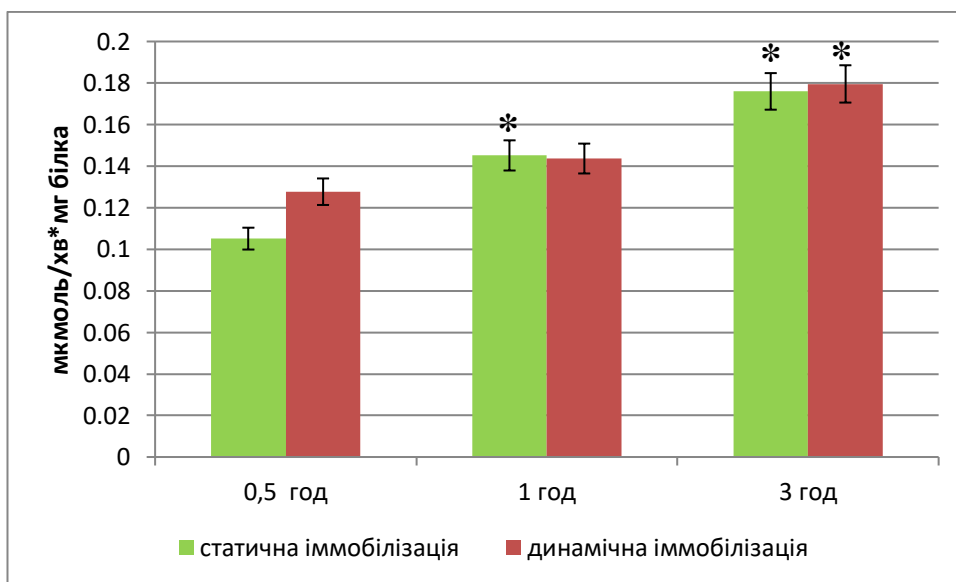


Рис 3.6 Ліполітична активність ферментного препарату, десорбованого на базальтовому туфі

Примітка: * - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

Отже, нами встановлена недоцільність застосування методу динамічної іммобілізації ферментного препарату Пртосубтилін. Відсутність статистично достовірних відмінностей з групою статичної іммобілізації вказує на те, що використання статичного методу дозволяє з однаковим

рівнем ефективності, проте з меншими затратами, отримати іммобілізований активний ферментний препарат.

3.2 Оцінка впливу температури на ефективність адсорбційної іммобілізації ферментного препарату Протосубтилін на базальтових туфах

Як відомо, одним із факторів, з-за допомогою якого можна збільшити ефективність іммобілізації є температура. При помірному підвищенні температури зростає рухливість молекул, що може покращити контакт ферменту з носієм і збільшити кількість адсорбованого білка. Таким чином, оптимальна температура може виступати ключовим фактором для ефективного закріплення ферментів на поверхні сорбенту.

На основі проведених досліджень встановлено залежність ефективності статичної іммобілізації ферментного препарату від температурного режиму (рис 3.7).

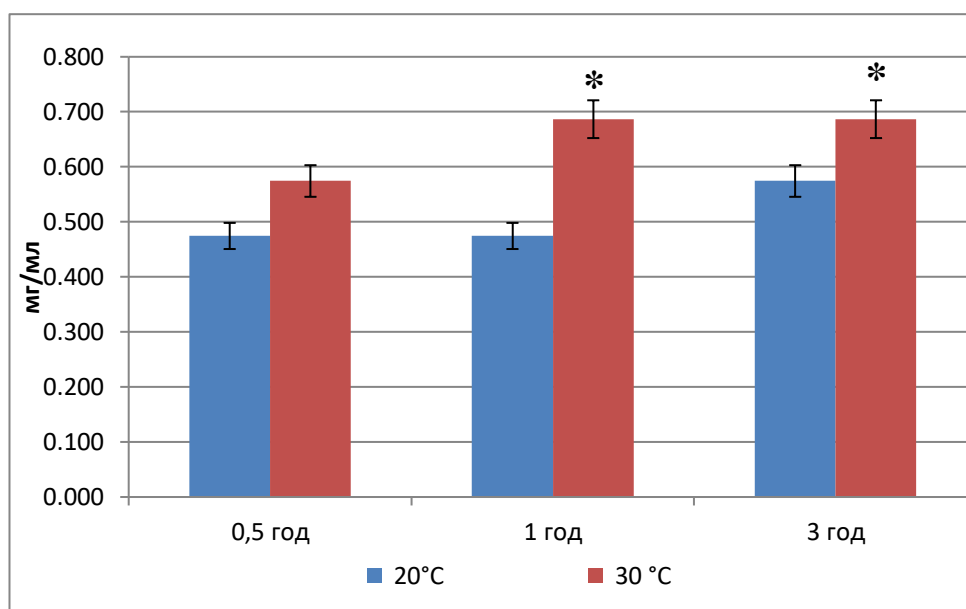


Рис.3.7 Кількість ферментного препарату, адсорбованого на базальтовому туфі за умови статичної іммобілізації при температурах 20°C та 30°C

Примітка:* - різниця між групами достовірна ($p \leq 0,05$).

Встановлено, що умови статичної іммобілізації при 30°C виявились оптимальнішими для здійснення адсорбції. Впродовж всього експерименту спостерігаємо тенденцію до збільшення кількості іммобілізованого ферментного препарату за адсорбційної іммобілізації при 30°C. Вже в першому часовому проміжку ефективність зросла на 20%, в той час 1 – годинна іммобілізація виявилась майже в 1,5 рази вищою, ніж за відповідних умов при 20°C. Варто зазначити, що збільшення часу інкубації до 3 год не призвели до зростання ступеня іммобілізації, ймовірно такі результати можуть вказувати на досягнення максимального ступеня зв'язування з носієм [39]. При цьому 3 – годинна іммобілізація при 20 C° не досягла рівня ефективності навіть 1-годинної при 30C°. Такі дані можуть вказувати на повільні дифузійні процеси, які, ймовірно, обмежують процедуру іммобілізації за наявних температурних умов. Схожу динаміку можемо спостерігати і в системах, у яких відсутня зовнішня активація масопреносу (фактор який допомагає рухатись молекулам швидше, або в певному ному напрямку), а температурний фактор не забезпечує достатньої мобільності білкових молекул [38].

Експериментальні дані щодо десорбції протосубтиліну (рис 3.8) з базальтового туфу демонструють залежність від різного температурного режиму.

За результатами дослідження температурного режиму не спостерігаємо статистичної різниці між групами. Це вказує на те, що підвищення температури на 10°C під час іммобілізації не впливає на ступень зв'язування ферменту з носієм. Ймовірно, такі результати могли бути спричинені міцним зв'язуванням ферментного препарату із носієм, що й стало причиною зменшення кількості десорбованого білка за умов витримки в 30°C.

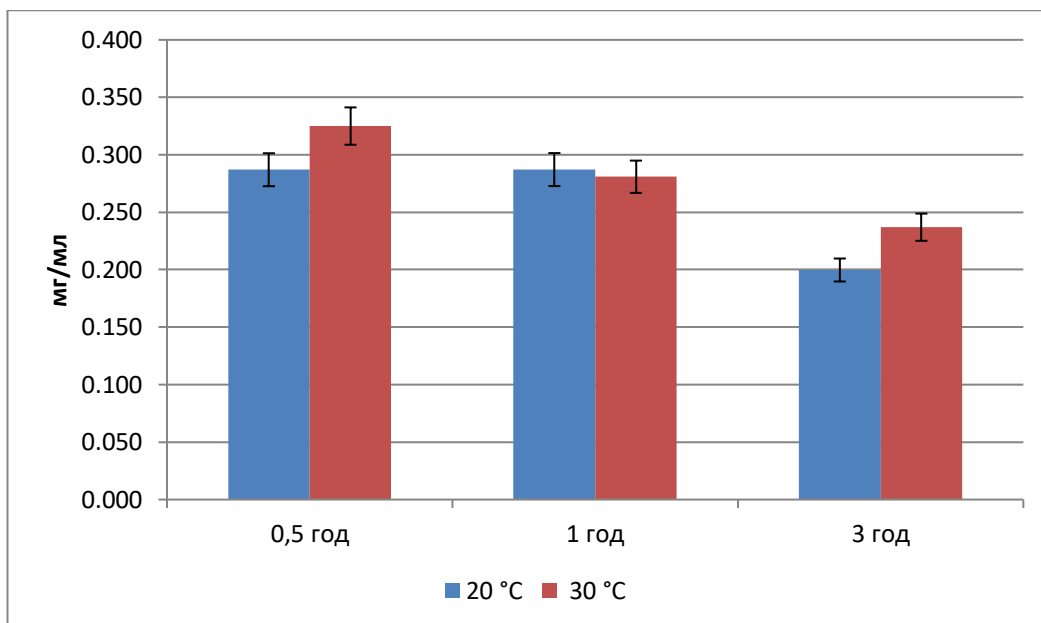


Рис 3.8 Кількість ферментного препарату, десорбованого з базальтового туфу за умови статичної іммобілізації при 20°C та 30°C

Результати оцінки збереженої протеолітичної активності препарату після іммобілізації наведені на рис 3.9.

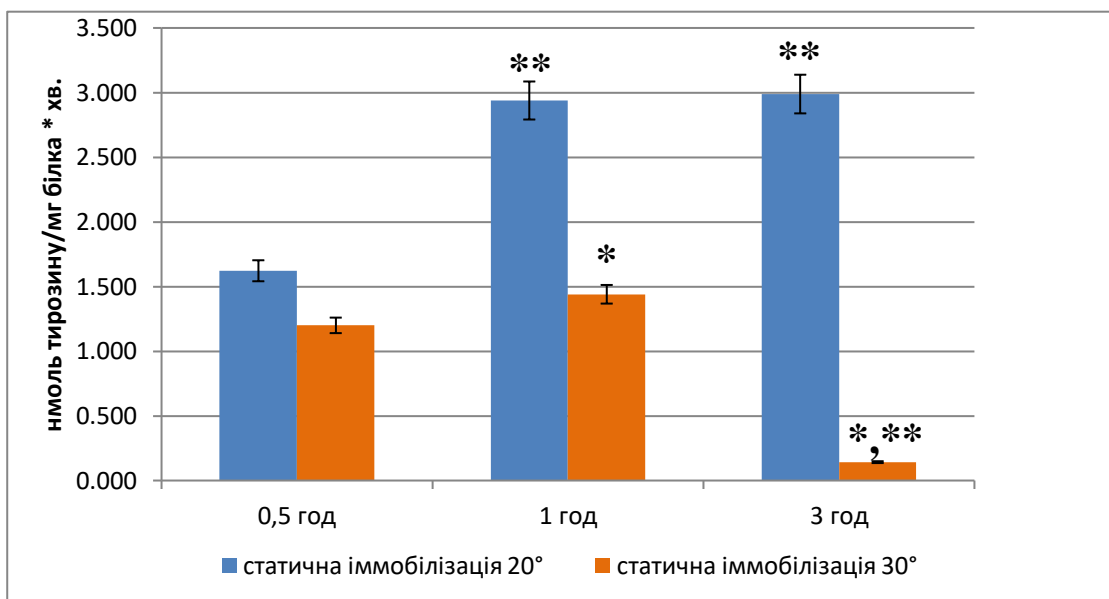


Рис 3.9 Протеолітична активність ферментного препарату Протосубтилін ГЗХ, адсорбованого на базальтовому туфі за умови статичної іммобілізації при 20°C та 30°C

Примітка:* - різниця відносно групи «статична іммобілізація» достовірна ($p \leq 0,05$); ** - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

Встановлено, що рівень активності протеїназ препарату за 30°C обробки значно знижувався у порівнянні з 20 °С, що може бути зумовлено зміною оптимальної температури роботи ферментного препарату. В роботі [5] зазначено, що оптимальна температура для Протосубтилін 120 складає 20-25°C. Отже, не зважаючи на встановлену підвищену кількість ферментного препарату, яка адсорбується на туфі при 30°C (рис. 3.8.), протеолітична активність є зниженою, причому різниця є найбільш вираженою при 3-годинній іммобілізації.

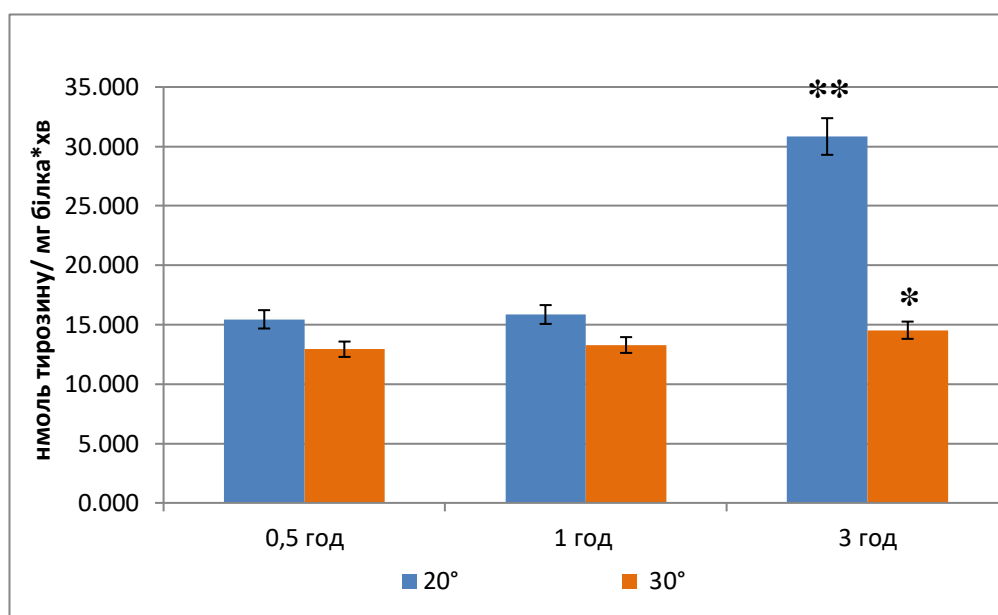


Рис 3.10 Протеолітична активність ферментного препарату, десорбованого з пор базальтового туфу за умови іммобілізації при 20°C та 30°C

Примітка:* - різниця відносно групи «статична іммобілізація» достовірна ($p \leq 0,05$); ** - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

На рис 3.10 представлено результати визначення протеолітичної активності ферментного препарату, який був десорбований з пор базальтового туфу.

Як і в попередньому варіанті досліджень, різниця у впливі температур особливо примітна для 3-годинної процедури іммобілізації. Підвищення

температури на 10 °С зменшило протеолітичну активність де сорбованого ферментного препарату майже вдвічі. Ймовірно, що температурний режим істотно впливав на стабільність комплексу фермент-носії - при 30 °С утворюються більш стабільні зв'язки між молекулами ферменту та поверхнею носія. Подібні ефекти описано в роботі Шелдона та ван Пелта, де зазначено, що підвищена температура сприяє орієнтації ферменту на поверхні носія в більш стабільних конформаціях, що може погіршувати руйнування зв'язків між носієм та біокаталізатором [38]

Подібні тенденції спостерігали і для інших ферментів у складі Протосубтиліну.

На рис 3.11 представлено зміну амілолітичної активності ферментного препарату залежну від температурного режиму.

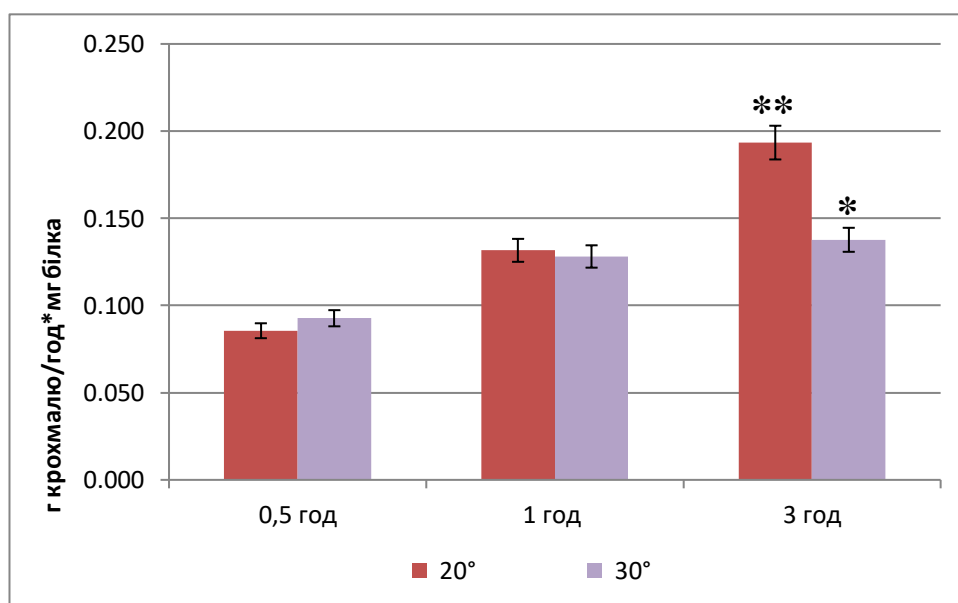


Рис 3.11 Амілолітична активність ферментного препарату, десорбованого з пор базальтового туфу за умови статичної іммобілізації при 20°С та 30°С

Примітка:* - різниця відносно групи «статична іммобілізація» достовірна ($p \leq 0,05$); ** - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

В обох досліджуваних температурних режимах спостерігали підвищення активності α - амілази із збільшенням тривалості іммобілізаційного процесу. Найбільшу різницю активностей ферменту спостерігаємо після трьох годин витримки, при цьому було зафіксовано чітке зростання амілолітичної активності залежно від температури іммобілізації. Зокрема, при статичній іммобілізації за температури 20 °С рівень амілолітичної активності був на 40% вищим, ніж у варіанті з іммобілізацією при 30 °С.

Результати дослідження ліполітичної активності протосубтиліну ГЗХ (рис 3.12) також свідчать про істотний вплив температури на ступінь зв'язування ферменту з носієм. Зокрема, при іммобілізації протягом 0,5 год різниці між двома температурними режимами не встановлено.

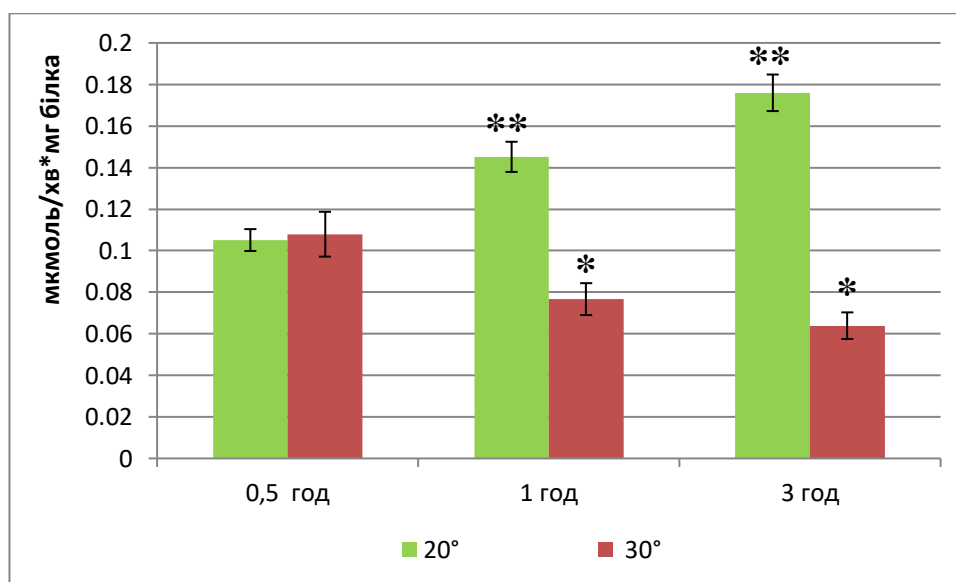


Рис 3.12. Ліполітична активність ферментного препарату, десорбованого з базальтового туфу за умови статичної іммобілізації при 20°С та 30°С

Примітка:* - різниця відносно групи «статична іммобілізація» достовірна ($p \leq 0,05$); ** - різниця між групами відповідно тривалості іммобілізації достовірна ($p \leq 0,05$).

Натомість уже при 1 – годинній витримці спостерігалось значне зниження активності ліпаз препарату після 30 °С-іммобілізації - вона була

майже вдвічі нижчою, ніж у варіанті з температурою 20 °С. Ця тенденція посилилася при витримці протягом 3 годин, за якої активність ферменту після іммобілізації при 30 °С становила лише 0,064 мкмоль/хв*мг препарату, що в 2,75 рази менше, ніж при 20 °С.

Суттєве зниження активностей ферментів, які входять до складу ферментного препарату, робить метод іммобілізації при вищих температурах недоцільним для застосування, адже набагато ефективнішим виявилось здійснення процедури іммобілізації температури 20°С, що робить останню більш економічно вигідною[40].

Отже, оптимальними умовами для проведення іммобілізації ферментного препарату Протосубтилін з огляду як на його кількість, адсорбовану на поверхні та в порах базальтового туфа, так і ферментативну активність основних складових є: 1-3 годинна тривалість статичної інкубації 1% Протосубтиліну в 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,4) з базальтовим туфом в кінцевій концентрації 5% при 20°С.

ВИСНОВКИ

1. Динамічні умови здійснення іммобілізації не призводять до змін кількості ферментного препарату, адсорбованого на поверхні та в порах носія при 0.5-1- годинній експозиції у порівнянні з статичним методом та зменшують концентрацію ферментного препарату при 3-годинній іммобілізації

2. Проведення процедури іммобілізації при температурі 30°C призводить до зростання кількості адсорбованого на носії ферментного препарату, проте істотно знижує його активність. Рівні протеолітичної, амілолітичної та ліполітичної активностей Протосубтиліну знижені в найбільшій мірі при 3-годинній іммобілізації за 30°C.

3. З огляду на кількість Протосубтиліну, адсорбованого на поверхні та в порах носія, а також ферментативну активність його основних складових оптимальним варіантом є проведення 1-годинної статичної іммобілізації 1% Протосубтиліну при 20°C в 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,4) на базальтовому туфі в кінцевій концентрації 5%.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Григор'єва, М. (2008). Імобілізація ферментів як спосіб отримання ефективних біопрепаратів для практичного застосування. *Наукові вісти НТУУ "КПІ"*, (6), 97–107. <https://ela.kpi.ua/server/api/core/bitstreams/56a6dfb3-1c1e-4d67-8f8e-e0d875dfbb96/content>
2. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
3. Марченко, М. М., Худа, Л. В., Великий, М. М., & Остапченко, Л. І. (2012). *Біохімія ензимів: підручник*. Чернівці: РУТА.
4. Селезньова, О., та ін. (2018). Стабілізація ферментного препарату протосубтиліну G3X для використання у птахівництві. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*, (145) 2, 54–61. <https://doi.org/10.33245/2310-9289-2018-145-2-54-61>
5. Цимбалюк, В. В. (н.д.). Перспективи використання базальтового туфу в медицині. https://dspace.udpu.edu.ua/bitstream/6789/412/1/Tsymbaliuk_Rusnauka.pdf
6. Mazzocato, M. C., & Jacquier, J.-C. (2024). Recent advances and perspectives on food-grade immobilisation systems for enzymes. *Foods*, 13(13), 2127. <https://doi.org/10.3390/foods13132127>
7. Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: A comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 207. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00649-0>
8. Skendrović, D., et al. (2024). Mesocellular silica foam as immobilization carrier for production of statin precursors. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 1971. <https://doi.org/10.3390/ijms25041971>

9. Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, 2010, 473137. <https://doi.org/10.4061/2010/473137>
10. Tang, K. H. D., Lock, S. S. M., Yap, P. S., et al. (2022). Immobilized enzyme/microorganism complexes for degradation of microplastics: A review of recent advances, feasibility and future prospects. *Science of the Total Environment*, 832, 154868.
11. Kebreab, E., Liedke, A., Caro, D., Deimling, S., Binder, M., & Finkbeiner, M. (2016). Environmental impact of using specialty feed ingredients in swine and poultry production: A life cycle assessment. *Journal of Animal Science*, 94(6), 2664–2681. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9036>
12. Naik, P. K., Das, A., Sahoo, G., & Reddy, M. R. (2017). Effect of encapsulated amylase enzyme on the performance and digestibility of energy in broilers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), Article 239. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.239>
13. Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>
14. Кравченко, О., Савчук, О. М., & Остапченко, Л. І. (2019). *Загальна біотехнологія: навчальний посібник*. Київ: Київський нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. https://biomed.knu.ua/images/stories/Kafedry/Biochimiya/Biblioteka/Osnovy_biotehnologiji_posibnyk.pdf
15. Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184–5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
16. Almulaiky, Y. Q., Alkabli, J., & El-Shishtawy, R. M. (2024). Improving enzyme immobilization: A new carrier-based magnetic polymer for enhanced covalent binding of laccase enzyme. *International Journal of Biological*

17. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

18. Shang, H., Wang, J., Guo, B., Zhu, H., & Li, H. (2025). Immobilization of phospholipase D on Fe₃O₄@SiO₂-graphene oxide nanocomposites: A strategy to improve catalytic stability and reusability in the efficient production of phosphatidylserine. *Molecules*, 30(4), 912.
<https://doi.org/10.3390/molecules30040912>

19. Robescu, M. S., & Bavaro, T. (2025). A comprehensive guide to enzyme immobilization: All you need to know. *Molecules*, 30(4), 939.
<https://doi.org/10.3390/molecules30040939>

20. Górecka, E., & Jastrzębska, M. (2011). Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*, 75(1), 65–86.
<https://doi.org/10.34658/bfs.2011.75.1.65-86>

21. Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92.
<https://doi.org/10.3390/catal8020092>

22. Darwesh, O. M., Matter, I. A., & Eida, M. F. (2019). Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102805. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.11.049>

23. Lyu, X., Wang, Y., Li, J., He, W., & Xu, H. (2021). Immobilization of enzymes by polymeric materials. *Catalysts*, 11(10), 1211.
<https://doi.org/10.3390/catal11101211>

24. Trach, Y., Kolisnyk, T., Kuzmenko, N., Kolisnyk, Y., & Karpuk, O. (2021). The characterization of Ukrainian volcanic tuffs from the Khmelnytsky region with the theoretical analysis of their application in construction and environmental technologies. *Materials*, 14(24), 7723. <https://doi.org/10.3390/ma14247723>
25. Pötzl, C., Siegesmund, S., López-Doncel, R. A., & Dohrmann, R. (2021). Key parameters of volcanic tuffs used as building stone: A statistical approach. *Environmental Earth Sciences*, 81. <https://doi.org/10.1007/s12665-021-10036-7>
26. Цимбалюк, В. В. (н.д.). Термічна модифікація природного базальтового туфу та перспективи його використання. https://dspace.udpu.edu.ua/bitstream/6789/335/1/Tsymbalyuk_13.pdf
27. Muri, E. M. F. (2014). Viral proteases: Important targets of peptidemimetic compounds. *Química Nova*, 37(2). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140052>
28. Цимбалюк, В. В. (н.д.). Перспективи використання базальтового туфу в медицині. https://dspace.udpu.edu.ua/bitstream/6789/412/1/Tsymbaliuk_Rusnauka.pdf
29. Sureshkumar, S., Song, J., Sampath, V., & Kim, I. (2023). Exogenous enzymes as zootechnical additives in monogastric animal feed: A review. *Agriculture*, 13(12), 2195. <https://doi.org/10.3390/agriculture13122195>
30. Pozdnyakov, N., Ivanov, R., Ryabova, N., & Lebedeva, N. (2022). Investigation of enzymatic hydrolysis kinetics of soy protein isolate: Laboratory and semi-industrial scale. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00518-2>
31. Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>

32. Braham, S. A., Siar, E. H., Arana-Peña, S., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., Bavandi, H., de Andrades, D., Kornecki, J. F., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Effect of concentrated salts solutions on the stability of immobilized enzymes: Influence of inactivation conditions and immobilization protocol. *Molecules*, 26(4), 968. <https://doi.org/10.3390/molecules26040968>
33. Chen, S., Maulu, S., Wang, J., Xie, X., Liang, X., Wang, H., Wang, J., & Xue, M. (2023). The application of protease in aquaculture: Prospects for enhancing the aquafeed industry. *Animal Nutrition*, 16, 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.11.001>
34. Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22(1), 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
36. Склярів О. Біохімія ензимів. Ензимодіагностика. Ензимопатологія. Ензимотерапія / О. Склярів, Я. Сольські, М. Великий, Н. Фартушок, Т. Бондарчук, Д. Дума. – Львів: Кварт. – 2008. – 218 с.
37. Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
38. Fang, F., Satulovsky, J., & Szleifer, I. (2005). Kinetics of protein adsorption and desorption on surfaces with grafted polymers. *Biophysical Journal*, 89(3), 1516–1533. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.05507>
39. Shang, H., Wang, J., Guo, B., Zhu, H., & Li, H. (2025). Immobilization of phospholipase D on Fe₃O₄@SiO₂-graphene oxide nanocomposites: A strategy to improve catalytic stability and reusability in the efficient production of phosphatidylserine. *Molecules*, 30(4), 912. <https://doi.org/10.3390/molecules30040912>

40. de Oliveira, J. M., Fernandes, P., Benevides, R. G., & de Assis, S. A. (2020). Characterization and immobilization of protease secreted by the fungus *Moorella speciosa*. *3 Biotech*, *10*(10), 419. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02412-0>

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях.

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин - відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних сер едовищ.

Кожен працівник в лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце. Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

В спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини заміняють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- всю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;

- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;

- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями.

- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації;

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт і ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при включеній вентиляції, вимкнених газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;

- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра;

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток і з закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрутити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи виключені газ, вода, електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно виключити газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і перекочуючи збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змазати маззю від опіків.

При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3 %-им розчином натрій гідрокарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2 %-им розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2 %-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5 %-им розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.

ПУБЛІКАЦІЇ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ДОСЛІДЖЕННЯ