

Санкт-Петербургский государственный университет

*ДВОРЕЦКАЯ Анна Валерьевна*

**Выпускная квалификационная работа**

***Макропористые проточные биореакторы для деструкции фукоидана***

Уровень образования: бакалавриат

Направление: *04.03.01 «Химия»*

Основная образовательная программа: *СВ.5014.2016 «Химия»*

Профиль: Аналитический

Научный руководитель:  
старший научный сотрудник,  
Межкафедральная лаборатория  
биомедицинской химии, к.х.н.,  
доцент, Коржикова-Влах Евгения  
Георгиевна

Рецензент: научный сотрудник,  
Федеральное государственное  
бюджетное учреждение Институт  
высокомолекулярных соединений  
Российской академии наук, к.х.н.  
Антипчик Мария Владимировна

Санкт-Петербург  
2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b> .....	6
<b>1.1 Фукозидазы</b> .....	6
<i>1.1.1 Субстратная специфичность и свойства</i> .....	6
<i>1.1.2 Использование фукозидаз для гидролиза фукоидана.</i> .....	7
<b>1.2 Сравнение гомогенного и гетерогенного биокатализа</b> .....	10
<b>1.3 Способы проведения гетерогенного биокатализа</b> .....	15
<b>1.4 Стационарные фазы для иммобилизации ферментов</b> .....	19
<b>1.5 Макропористые монолитные материалы</b> .....	21
<i>1.5.1 Преимущества перед другими материалами для иммобилизации ферментов ...</i>	21
<i>1.5.2 Способы получения</i> .....	23
<b>2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	27
<b>2.1 Материалы</b> .....	27
<b>2.2 Оборудование</b> .....	28
<b>2.3 Получение макропористых монолитных колонок</b> .....	28
<i>2.3.1 Проведение радикальной полимеризации в блоке</i> .....	28
<i>2.3.2 Изучение поровых характеристик</i> .....	30
<b>2.4 Иммобилизация фукозидазы на поверхность полимерного носителя</b> .....	31
<i>2.4.1 Прямая иммобилизация</i> .....	31
<i>2.4.2 Иммобилизация через спейсер</i> .....	31
<i>2.4.3 Определение количества иммобилизованного фермента</i> .....	33
<b>2.5 Изучение активности фукозидазы</b> .....	33
<i>2.5.1 Определение активности свободного фермента</i> .....	34
<i>2.5.2 Определение активности иммобилизованного фермента</i> .....	35
<b>2.6 ВЭЖХ анализ фукозы и фукоидана</b> .....	35
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	36
<b>3.1 Синтез макропористых монолитных колонок и изучение их характеристик</b>	36
<b>3.2 Иммобилизация фермента</b> .....	41
<b>3.3 Определение активности иммобилизованных ферментов и сравнение с биокатализаторами в растворе</b> .....	45
<b>3.4 ВЭЖХ анализ фукозы и фукоидана</b> .....	51
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	53
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	54

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из перспективных направлений исследований в области прикладной биотехнологии является ферментативный катализ, обладающий по сравнению с химическими методами более высокой специфичностью. К тому же биокатализ обычно проводится в достаточно мягких условиях, что позволяет избежать побочных процессов и сохранить субстрат и продукты его деструкции в желаемой форме.

Биокатализаторы находят свое применение в различных областях, включая фармацевтическую и пищевую промышленность. В частности, ведутся работы по получению минорного сахара фукозы и фукоолигосахаридов, играющих важную биологическую роль в метаболизме живых организмов. Одним из способов их получения является биодеструкция природных полимеров под действием ферментов. Так, фукоиданы, доля которых значительна в составе такого доступного и дешевого сырья как бурые водоросли, представляют собой полисахариды с мономерным звеном в виде фукозы и некоторых других сахаров и могут быть подвергнуты биоразложению под действием фермента фукозидазы. Производство в промышленных масштабах данных сахаров не развито. Таким образом, разработка и изучение биореакторов на основе иммобилизованных фукозидаз является крайне **актуальной задачей**. Разработки в данной области находятся на начальных этапах и требуют проведения исследований активности и оптимизации условий, как применения, так и получения биореакторов. Кроме того, необходимо проведение мониторинга протекающих процессов биодеструкции, а также разделения субстрата и продуктов. Часто и успешно применяемым для решения подобных задач методом является высокоэффективная жидкостная хроматография, позволяющая идентифицировать вещества с их одновременным разделением на фракции.

Однако использование ферментов напрямую, то есть путем добавления в реакционную смесь, сопряжено с рядом проблем. Среди них необходимость тщательно следить за оптимальностью условий проведения реакции ввиду чувствительности к ним фермента – белковая молекула должна сохранять в них свою структуру, не подвергаться денатурации. Помимо этого, возникают дополнительные стадии очистки продуктов от фермента, что усложняет процесс с технологической точки зрения.

Решением возникших проблем стала иммобилизация – связывание фермента за счет ковалентных связей или нековалентных взаимодействий с носителями, чаще всего твердофазными, что позволило значительно повысить стабильность белковой молекулы и расширить границы условий ее применения для катализа. Физические методы иммобилизации (например, адсорбция) просты в исполнении, дают хорошие результаты, хотя не исключают вымывание фермента с поверхности в ходе эксплуатации. Формирование ковалентных связей между ферментом и матрицей позволяет получить более надежные биокатализаторы, дольше сохраняющие свою активность на первоначальном уровне. Кроме того, иммобилизацию можно проводить не напрямую, а через так называемый спейсер – промежуточное соединение, позволяющее отдалить фермент от поверхности. Последний подход сложнее, но позволяет имитировать для фермента состояние близкое к таковому в растворе, сделать активный центр более доступным для субстрата и исключить нековалентные взаимодействия с носителем.

Кроме повышения стабильности, преимуществом иммобилизации является простота отделения биокатализатора от реакционной смеси. Особенно удобны в этом плане биокаталитические системы в виде проточных реакторов, например, хроматографические колонки и диски, заполненные твердой фазой. В первоначальных вариантах носитель чаще всего был представлен в виде гранул – пористых или непористых частиц. В 90-х годах прошлого века был разработан принципиально новый класс твердых носителей, а именно макропористые монолитные материалы, представляющие собой единый полимерный блок, пронизанный системой взаимосвязанных капилляров – макропор.

Для заполненных колонок значительную роль играл диффузионный перенос вещества к поверхности носителя и в его поры, что не позволяло использовать высокие скорости потока раствора субстрата через стационарную фазу. В отличие от предшественников, для монолитных материалов преобладает конвективный массоперенос, способствующий снижению сопротивления потоку подвижной фазы и повышению эффективности межфазовых процессов в системе. В связи с этим, разработка методов синтеза макропористых материалов монолитного типа с прогнозируемой поровой структурой и функциональностью представляет собой одно из перспективных направлений в области создания стационарных фаз для реализации

гетерогенного биокатализа. Для создания матриц с желаемыми характеристиками, включая размер пор, гидрофильно-гидрофобные свойства поверхности и требуемую функциональность хорошо себя зарекомендовали полиметакрилатные носители.

Исходя из вышеизложенного, **целью данной работы** являлось получение гетерогенных биокатализаторов на основе макропористых монолитных материалов с иммобилизованной на их поверхности фукозидазой, а также изучение свойств полученных систем

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- синтез макропористых полиметакрилатных материалов монолитного типа в форме хроматографических колонок с желаемыми поровыми характеристиками;
- проведение иммобилизации фукозидазы на поверхности макропористых материалов монолитного типа двумя способами: прямым методом и через спейсер;
- исследование каталитической активности иммобилизованных ферментов;
- оптимизация условий разделения субстрата, фукоидана, и продукта его гидролиза, фукозы, методом ВЭЖХ для последующего мониторинга биокаталитического процесса.

# 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Фукозидазы

### 1.1.1 Субстратная специфичность и свойства

Все ферменты принято подразделять на шесть классов, одним из них являются гидролазы, среди которых выделяют группы в зависимости от того, на какую связь в молекуле воздействует фермент. Объектом исследования в данной работе является фукозидаза – фермент, относящийся к *O*-гликозидгидролазам (гликозидазам), способным расщеплять *O*-гликозидные связи в углеводах.

Фукозидазы широко распространены в природе, встречаются, например, в бактериальных клетках и в клетках эукариотов. Они играют важную роль в метаболизме, защите растений, процессах воспаления, и, например, в комплексе с другими ферментами в усвоении грудного молока младенцами. Кроме того, известно заболевание фукозидоз – лизосомная болезнь накопления, связанная с недостаточностью альфа-L-фукозидазы, последствием которой для человека может являться отстающее психологическое развитие [1].

Действие данного фермента основано на участии в реакции гидролиза углеводной цепи, в ходе которого отщепляется L-фукоза или концевые фукозильные остатки. К особенностям процесса относится то, что он может протекать избирательно и без нарушения общей структуры фукоолигосахарида или полисахарида, отщепление проходит по различным положениям –  $\alpha(1\rightarrow2)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$ ,  $\alpha(1\rightarrow4)$  и  $\alpha(1\rightarrow6)$  от невозстанавливающего конца, причем встречаются группы фукозидаз как с широкой, так и с узкой (гидролиз по конкретному положению) специфичностью [2].

Оптимальные условия для проявления активности фукозидаз также вариативны и зависят от природы источника, из которого они были получены. В большинстве случаев для эффективной работы предпочтительна слабокислая или близкая к нейтральной среда, но диапазон значений для конкретных ферментов различен. В диссертационной работе С.В. Швецовой [2] приведен ряд примеров, касающихся оптимального рН: для фукозидаз бактериального происхождения он часто составляет от 5.5 до 6.5, для мицелиальных грибов характерен интервал 4.5 – 6.0, в то время как для фукозидаз человека и некоторых млекопитающих он еще более широк – от 4.0 до 7.0. В работе [3] исследовали альфа-L-фукозидазу бактерии *Bacillus cereus*, который

был стабилен при рН 5.0 – 9.0, с оптимумом при рН 7.0. Аналогичная ситуация наблюдается при рассмотрении термостабильности: в общем случае активность сохраняется до 50°C и за рабочую температуру принимают 37°C, но в частности для некоторых морских организмов оптимум приходится на более высокие значения – 60–70°C.

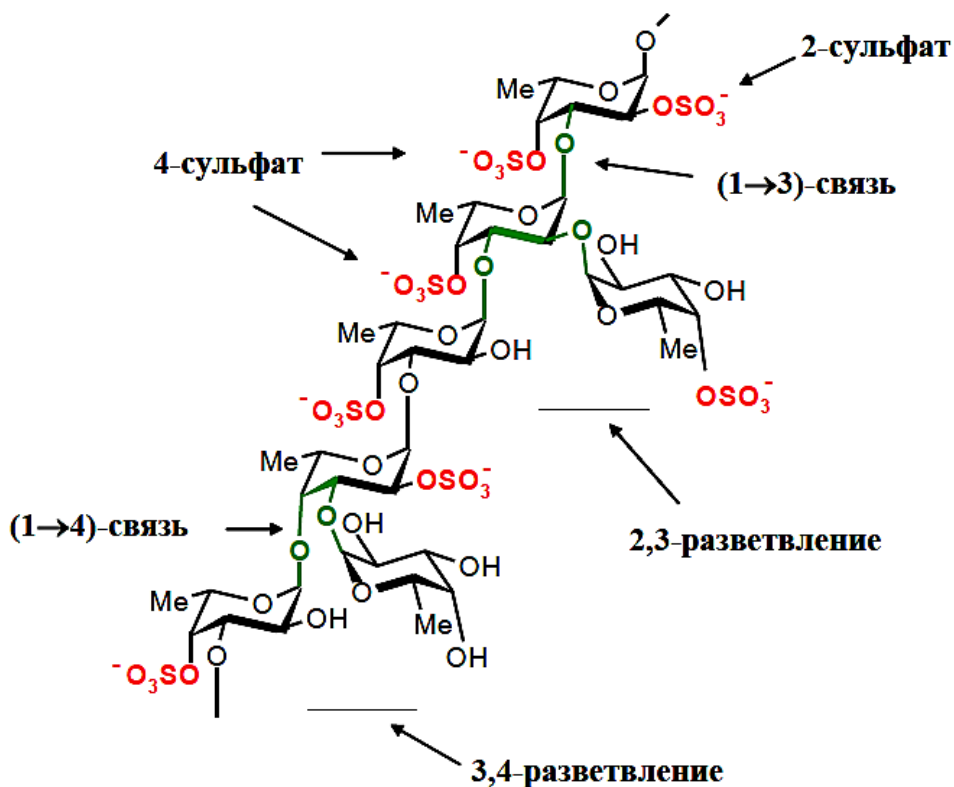
На работу фермента влияет ионная сила раствора, которая способствует активации некоторых из них, и ингибирующие вещества. Так, например, непосредственное влияние оказывает продукт гидролиза L-фукоза. В работе [2] приведены данные об ингибировании фермента при концентрациях от 0.15 мМ. Данный результат подтверждается и в других работах. Например, в работе [4] при концентрации 50 мМ активность составляла 15%, а при – 10 мМ до 8.8% в [3]. Из ионов металлов  $Hg^{2+}$  полностью подавляет активность при концентрациях 0.1 мМ по сравнению с раствором фермента без добавок. Элемент халькофильный и, вероятно, может связывать серу в сульфгидрильных мостиках, расположенных в активном центре фермента. Но SH-ингибирующие реагенты N-этилмалеимид, йодацетат и SH-защитные реагенты 2-меркаптоэтанол не влияют на активность фермента [3, 4]. Кроме того, ингибирующим действием обладают цитратные буферы и буферы на основе Триса [2].

Несмотря на распространенность и известность фукозидаз, большинство из них на данный момент не исследованы, что можно отследить, обратившись к базе данных CASy [5], согласно которой в семействе GH29 (всего 4895 представителей) охарактеризовано только 34 фермента, в семействе GH95 (всего 2490) – 10, в GH151 (100 представителей) – 3 фермента. Перспективность изучения фукозидаз обусловлена, как уже упоминалось выше, их биологической ролью, а также необходимостью получения из олигомерных и полимерных сахаров такого биологически активного вещества, как фукоза. В связи с этим, работы по получению фукозидаз, в том числе рекомбинантным способом [6], выделению и изучению их свойств, являются крайне перспективными и востребованными на сегодняшний день.

### *1.1.2 Использование фукозидаз для гидролиза фукоидана.*

Фукоидан – это сложные сульфатированные гетерополисахариды с молекулярной массой от 10 до 1000 кДа. Мономерным звеном данного вещества

является  $\alpha$ -L-фукоза, кроме нее, в состав могут входить галактоза, манноза, ксилоза, и др. [7, 8]. Общее строение фукоидана представлено на рис. 1 [9]. На данный момент среди известных фукоиданов выделяют несколько групп в зависимости от структуры: – сульфатированные альфа-фуканы с гликозидной связью (1→3) между остатками фукозы; – фукоиданы со связью через положения (1→3) и (1→4); - сульфатированные галактофуканы, состоящие из  $\alpha$ -L-фукозы и  $\beta$ -D-галактозы; – фукоиданы сложного состава, в которых значительно содержание моносахаридов помимо L-фукозы. Для определения структуры используют физико-химические методы и методы углеводной химии, инфракрасная (ИК) спектроскопия и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), моносахаридный состав анализируют с помощью газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) и высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) после кислотного гидролиза [7].



**Рисунок. 1** Строение фукоидана.

Возрастающий интерес к фукоиданам связан с многочисленными важными свойствами [8] данного полисахарида такими, как противовоспалительные, иммуномодулирующие и противовирусные свойства. Кроме того, активно ведутся исследования, связанные с изучением его противоопухолевой активности [10],



антикоагулянтного действия. Таким образом, данный класс полисахаридов крайне перспективен для применения в фармацевтической и пищевой промышленности.

Содержание фукоиданов в водорослях может достигать до 20% на сухой остаток, в среднем диапазон лежит от 0.6 до 7.9%. Наиболее богатыми фукоиданом являются водоросли вида *Fucus* и *Laminaria* [11, 12]. Учитывая распространенность бурых водорослей, которые являются в некоторых регионах загрязнителями побережья и соответственно дешевым, экономически выгодным сырьем, а также то, что производство фукозы и фукоолигосахаридов не развито, поиск способов переработки растительного сырья, выделение и изучение фукоиданов, а также разработка методов по их расщеплению являются востребованными как с точки зрения экономики и промышленности, так и науки.

Одно из перспективных направлений развития – это биodeградация фукоиданов для получения фукозы и фукоолигосахаридов под действием фукозидаз. Фукоза или 6-дезоксигалактоза входит в состав иммуноглобулинов, гормонов млекопитающих, участвует в онтогенезе, способствует формированию иммунитета, а олигосахариды на ее основе проявляют антиоксидантную активность. Но сама по себе фукоза относится к «минорным», редко встречающимся, сахарам и в чистом виде в природе практически отсутствует. [11]

Заметим, что для получения фукозы необязательно использовать ферменты, деструкцию гликозидных связей можно проводить, например, с помощью кислотного гидролиза. Однако данный метод гораздо менее селективен по сравнению с биокатализом. При кислотном гидролизе может быть затронута не только гликозидная связь, в некоторых случаях происходит разрушение даже моносахаридов, особенно, когда для протекания реакции требуются жесткие условия (нагревание, высокая концентрация кислоты). Более того возможны побочные процессы, например, окислительно-восстановительного характера.

Фермент же действует избирательно, позволяет изучать тонкую структуру полисахаридов. Ряд ферментов способен к последовательному отщеплению молекул, благодаря чему при мониторинге процесса можно определять порядок звеньев или участков цепи в полисахариде. Другие позволяют определять аномерную конфигурацию атомов. Также биокатализ протекает в более мягких условиях и не

приводит к побочным процессам. Именно поэтому ферментативный гидролиз является одним из наиболее важных методов расщепления.

К настоящему времени опубликовано несколько работ, в которых исследовалась возможность применения данных ферментов. Например, в работе [8] изучали действие  $\alpha$ -L-фукозидазы *E. coli top 10*, модифицированной рекомбинантным способом, в подобранных в этой же работе оптимальных условиях (рН 7.0, температура 35°C), а также дозировку (количество фермента в единицах на грамм субстрата) и продолжительность процесса гидролиза, необходимые для более эффективного катализа. Для эксперимента брали 10% раствор фукоидана, а о степени протекания гидролиза судили по количеству фукозы, определяемой по методу Дише. Согласно представленным результатам, наиболее эффективным оказалось внесение фермента в концентрации 6 ед/г субстрата, при которой гидролиз протекал на 89% (максимальная степень деструкции) за 5 часов. В работах [12, 13] проводили аналогичный эксперимент, в котором  $\alpha$ -L-фукозидаза *Aspergillus awamori* была иммобилизована адсорбционным способом на хитозан, затем были определены оптимальные условия для проявления активности ферментом и проведена биодеструкция фукоидана из водоросли *Fucus vesiculosus*. Результаты были следующие: при оптимальных условиях – рН 7.0 и температура 50°C – за 5 ч и при дозировке 6 ед/г гидролиз проходил на 83-85%. Оба исследования являются хорошей иллюстрацией того, что фукозидазы могут успешно применяться для деструкции фукоидана. Однако в работе [2] упоминается, что некоторые из представителей фукозидаз неактивны в индивидуальном виде по отношению к фукоидам. Несмотря на высокую субстратную специфичность и проявление активности при деструкции других фукозилированных молекул, в таких случаях необходимо использовать комплекс ферментов, включающий данную фукозидазу.

## **1.2 Сравнение гомогенного и гетерогенного биокатализа**

Достаточно давно ведутся работы по прикладному применению ферментативного катализа в различных областях промышленности. Но использование ферментов напрямую, то есть добавление в раствор к субстрату, так называемый гомогенный способ катализа, сопряжено с рядом трудностей. Как известно, фермент представляет из себя белковую молекулу, которая чувствительна к внешним факторам

таким, как температура, кислотность и состав среды, давление и так далее, и малейшие отклонения могут приводить к нарушениям в его работе, конформационным изменениям, денатурации, следствием чего может являться инактивация [14]. Становится актуальной задача повышения стабильности ферментов, которая подразделяется на операционную (способность сохранять активность в широком диапазоне рабочих значений), функциональную (проявление активности при денатурации белка) и стабильность при хранении.

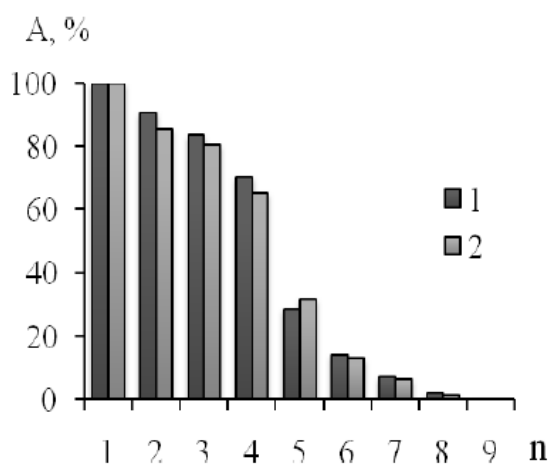
В работе [15] названо несколько путей повышения стабильности. Первый из них – за счет возможностей генной инженерии замена аминокислотных остатков, изменение первичной структуры и упрочение белковой молекулы, но данный метод достаточно сложен для выполнения на практике и требует точных знаний о структуре модифицируемого фермента. Второй путь заключается в подборе оптимальной среды, что осуществляется за счет внесения добавок в виде солей, растворимых веществ, органических растворителей и т.д. По сравнению с предыдущим способом преимущество очевидно: второй подход гораздо проще и более универсален, но в литературе имеются разногласия об его эффективности. Третий же подход, которому отдано предпочтение в данной работе, основан на проведении иммобилизации фермента на поверхности твердофазного носителя (гетерогенный биокатализ), что позволяет стабилизировать третичную структуру белка, уменьшить вероятность инактивации из-за колебаний внешних условий.

Данный подход освещен во многих научных трудах, его эффективность доказана, в плане технического исполнения он немногим сложнее второго метода и проще первого, подробные (вплоть до последовательности аминокислот в первичной структуре) знания о строении фермента не требуются. Далее сравним между собой гомогенный и гетерогенный катализ.

Ряд литературных данных показывает, что при иммобилизации фермента на твердофазный носитель его активность понижается, в среднем на 30% по сравнению со свободным биокатализатором. В работе [13] опыт показал уменьшение активности  $\alpha$ -L-фукозидазы, иммобилизованной на хитозан, на 20% и  $\beta$ -фруктофуранозидазы на ионообменнике ФИБАН А-6 на 30%; в [2] активность  $\alpha$ -фукозидазы из *F. Proliferatum*, сшитая с помощью глутарового альдегида с желатином, составила 67.5% от первоначальной; в труде [16] проводятся исследования активности ферментного

комплекса *Trichoderma viride* на различных носителях. Для наиболее стабильной системы снижение активности составило 29%. Подобная тенденция, вероятно, обусловлена затрудненным доступом субстрата к активному центру фермента, а именно, необходимостью диффузии расщепляемой молекулы через раствор к поверхности носителя или его пор и к активному центру фермента, который ограничен в подвижности. К тому же существует вероятность изменения конформации молекулы при иммобилизации, но в [14] были сделаны выводы о том, что пространственная структура фермента изменяется незначительно, либо сохраняется. В случаях же, когда изменения наблюдаются, причиной является задействие важных функциональных групп белка или неспецифические взаимодействия с носителем молекулы фермента, что приводит к его денатурации. Данная проблема может быть решена с помощью подбора более инертного носителя.

Однако снижение активности компенсируется тем, что фермент за счет связывания с носителем легко отделяется от продуктов реакции и может быть использован повторно, а при замыкании системы в цикл и пропускании одной и той же порции субстрата через носитель с ферментов можно добиться наиболее полного протекания реакции биокатализа, причем эффективность процесса во время первых циклов снижается незначительно. Так, например, в работе [13] значительное падение эффективности происходило только к 5-ому циклу (рис. 2). В [2] представлены данные о том, что альфа-фукозидаза проявляла активность, равную 96.4% от изначальной, после десяти циклов гидролиза. Также иммобилизованные ферменты стабильны в течение длительных периодов времени, то есть при хранении. В [13] исследования проводились в течении 6 месяцев (хранили биокатализатор в холодильной камере), по прошествии которых активность сохранилась на 70%. Аналогичные данные представлены в [2], иммобилизованный фермент проявлял 85% активности от исходной после хранения в течение 2 месяцев при 4°C в соответствующем буферном растворе.

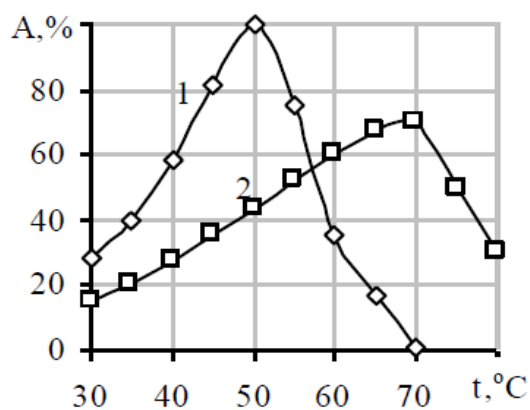


**Рисунок 2.** Кратность использования иммобилизованной  $\beta$ -фруктофуранозидазы (1) и  $\alpha$ -L-фукозидазы (2) в реакции гидролиза сахарозы и фукоидана соответственно: А – активность иммобилизованного фермента (% от максимальной); n – количество реакционных циклов [13].

В работе [15] рассматривался период в 24 месяца при комнатной температуре и ряд ферментов на целлюлозных носителях с различными добавками (хитозаном, альгинатом и другими). Так, например, высокая стабильность была установлена для амилазы, иммобилизованной на хитозан-содержащей целлюлозе – 52% исходной активности, протеолитический комплекс и трипсин – 15% и 28% соответственно.

Помимо многократного использования и возможности хранения биокатализатора, повышается операционная стабильность, то есть иммобилизация позволяет работать в средах, в которых нативный фермент подвергается денатурации. Обратившись к данным приведенных выше работ, можно отметить, что оптимальное значение кислотности среды обычно остается неизменным, либо отклонения незначительны (в [13] наблюдалось изменение оптимума pH на 0.1), но диапазон значений pH, в котором стабилен фермент расширяется. Иммобилизованная  $\alpha$ -L-фукозидаза из *F.proliferatum* [2] с оптимальным pH равным 5.0 проявляла выше 70% активности в интервале от 3.0 до 7.5 pH при выдерживании в термостате при температуре 37°C в течение 16 часов. Свободный же фермент терял активность уже при pH 4.5 и становился на 10% менее эффективным. В то же время, при pH 4.0 снижение активности достигало 40% (иммобилизованный фермент в данной среде имел 100% активность).

При исследовании температурных зависимостей обнаружили, что оптимум гидролиза субстрата наблюдается при более высоких температурах. Так в [13] смещение происходило на 10-20°C при том, что нативные ферменты при повышенной температуре теряли большую часть активности, либо не проявляли ее вообще (рис. 3). Данные результаты подтверждаются многочисленными исследованиями [2, 15, 16]. Температура, как известно, влияет не только на конформацию белка, но и на кинетические параметры процессов, в данном случае образования комплекса фермент-субстрат, и повышение температуры делает процесс более эффективным. В работе [15] кроме того были рассчитаны константы процессов инактивации при проведении реакций гидролиза в условиях, отличных от оптимальных. Опыт показал, что для иммобилизованных ферментов константы термоинактивации и инактивации при различных рН уменьшаются в несколько раз, это означает повышение функциональной активности.



**Рисунок 3.** Влияние температуры на активность  $\beta$ -фруктофуранозидазы (% от максимальной) при рН 4,0: 1 – свободный фермент, 2 – иммобилизованный [13]

Таким образом, суммируя вышесказанное, можно выделить основные преимущества гетерогенного катализа:

- стабильность иммобилизованных ферментов в более широких диапазонах температур и рН по сравнению с нативными биокатализаторами;
- возможность автоматизации, проведения непрерывного катализа, отвода продуктов, что повышает эффективность процесса, и отсутствие необходимости очищать фермент после проведения реакции, следовательно, обеспечение кратного использования одного и того же фермента;

– уменьшение экономических затрат на производство (за счет повторного использования и исключения дополнительных стадий разделения веществ) и снижение стоимости конечного продукта.

### 1.3 Способы проведения гетерогенного биокатализа

К настоящему времени разработано множество способов иммобилизации ферментов на твердофазные носители и для них существуют классификаций по таким признакам как обратимость иммобилизации и природа связи между молекулой фермента и носителем.

В первом случае выделяют две группы методов: необратимые, например, агрегация, захват, ковалентное связывание, и обратимые, такие как адсорбция, ионное связывание, связывание с металлами и по сродству (аффинное) [17]. У обеих групп есть свои преимущества и недостатки. Обратимые методы позволяют обновлять фермент, когда предыдущая иммобилизованная порция потеряла свою активность, но в то же время не исключают потери за счет вымывания фермента с поверхности носителя, что с экономической точки зрения не выгодно. Необратимая иммобилизация обеспечивает большую стабильность, снижает потери фермента, однако может наблюдаться снижение активности за счет ограниченной доступности (преграждения) активного центра.

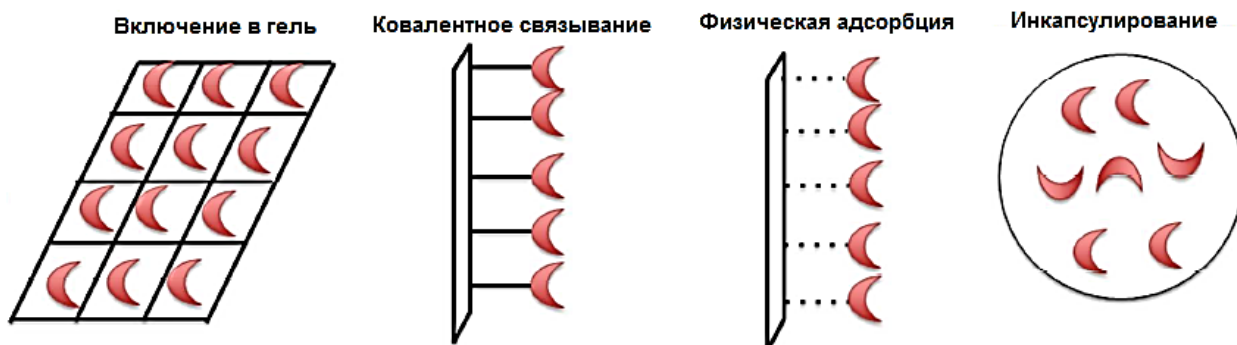
Во второй классификации рассматривают физическую и химическую иммобилизацию (рис. 4). В физических методах между ферментом и носителем не возникают ковалентные связи, а происходит включение молекул фермента в твердую фазу [14].

Включение также осуществляется различными способами, согласно с которыми условно разделяют физические методы на четыре группы:

- *Адсорбция на нерастворимых носителях*

Адсорбция представляет собой один из самых первых и известных методов иммобилизации ферментов, исследования которого начались еще в 1916 году Дж. Нельсоном и Э. Гриффином. В ходе их работы инвертаза была успешно связана с активированным углем и гидроксидом алюминия путем адсорбции. Метод на сегодняшний день не теряет своего значения, что подтверждается многочисленными трудами [18, 19]. Он прост в исполнении, в большинстве случаев не сопровождается

побочными процессами, иммобилизация проводится в мягких условиях, что важно для сохранения структуры белковой молекулы. Удерживание фермента происходит в результате действия ван-дер-ваальсовых сил, гидрофобных и электростатических взаимодействий, водородных связей, говоря обобщенно – за счет нековалентных взаимодействий; возможности данного метода ограничиваются в основном ёмкостью носителя. Недостаток метода – не исключена десорбция («вымывание») фермента с поверхности носителя.



**Рисунок 4.** Примеры методов иммобилизации ферментов (адаптация из [17]).

- *Включение в поры геля*

В данном случае, в качестве носителя выступает гель, полимерные цепи которого образуют трехмерную сетку, которая может удерживать фермент в ходе формирования геля. Поскольку расстояние между полимерными цепями меньше размера молекул фермента, последний не может покинуть гель. Также удерживанию дополнительно способствуют ионные и водородные связи. Остальное пространство обычно занято водой, содержание которой может достигать 90%. Активность такой системы пропорционально количеству фермента, включенного в сетку. Кроме того, необходимо учитывать размер субстрата, который должен иметь возможность диффундировать к ферменту, если субстрат является высокомолекулярным соединением, то данный метод не применим. К преимуществам данного метода можно отнести устойчивость гелей (механическую, тепловую, химическую), относительная простота иммобилизации, защита фермента от бактерий, которые за счет своего размера не проникают в гель.

- *Включение в полупроницаемые структуры (мембраны)*

Метод основан на отделении реакционной смеси (раствор фермента) от раствора субстрата полупроницаемой мембраной, пропускающей молекулы субстрата, но не



молекулы фермента. Существуют разные варианты данного способа: микрокапсулирование – включение раствора фермента в пузырьки с полимерной стенкой; включение в волокна – водный раствор фермента в виде капель заключается в волокнообразующий полимер; включение в липосомы – в сферические двухслойные структуры, образованные липидными бислоями. Достоинствами мембранных методов являются универсальность и простота, высокое содержание фермента, стабильность, снижение диффузионных ограничений за счет высокого отношения площади поверхности к объему капсулы. К недостаткам относят, как и в случае гелей, непроницаемость мембраны для высокомолекулярных субстратов.

- *Включение в двухфазную систему: фермент растворим только в одной из фаз, которая контактирует со второй.*

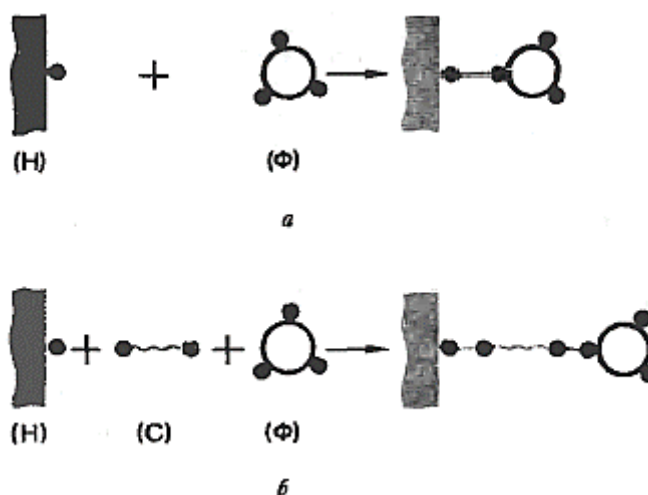
Белки нерастворимы в неполярных органических вещества, поэтому содержаться в такой системе только в воде, составляющей несколько процентов от объема. Субстрат вводится в систему, взаимодействует с ферментом в водной фазе, продукты реакции переходят в органическую. Для повышения эффективности процесс проводят при аккуратном перемешивании, при повышении интенсивности с одной стороны увеличивается площадь поверхности раздела, что способствует более активному взаимодействию, но с другой стороны контакт фермента с органической фазой или осаждение на границе раздела может привести к его инаktivации. К преимуществам относится возможность биокатализа реакций для нерастворимых в воде субстратов.

При химических методах иммобилизации, в отличие от физических, удерживание происходит за счет образования ковалентной связи, из чего сразу следует то, что связь фермента с носителем более прочная и вымывание фермента с поверхности менее вероятно. [20]

Связь возникает при взаимодействии реакционноспособных групп фермента и носителя, и если модификация твердой матрицы практически не сказывается на ее свойствах, то в случае химического превращения фермента необходимо учитывать, что оно может привести к изменению активности биокатализатора. По этой причине подбирают такие условия синтеза, которые не приводят к нарушению структуры белка и при которых происходит связывание функциональных групп, удаленных от активного центра.

Процесс химической модификации осуществляется двумя путями (рис. 5):

1) непосредственная «пришивка» фермента к матрице: способ достаточно прост в исполнении, повышает стабильность биокатализатора, но может приводить к изменениям в свойствах фермента за счет иной микросреды у поверхности твердой матрицы, а также за счет возникновения диффузионных и стерических затруднений (процесс иммобилизации статистический, часть молекул может быть ориентирована активной частью к носителю и быть недоступной для субстрата).



**Рисунок 5.** Ковалентное связывание: а) – непосредственно с матрицей; б) – с помощью спейсера. Н – носитель, С – спейсер, Ф – фермент. [14]

2) конструирование системы по схеме «носитель – сшивка – фермент»: в качестве «сшивки» (или «спейсера», «вставки») используют бифункциональные соединения, которые могут быть различной длины, что позволяет подобрать оптимальное расстояние между ферментов и носителем. В таких системах диффузионные и стерические затруднения минимизированы ограничения, также увеличивается подвижность фермента, а значит он взаимодействует с субстратом активнее, кроме того, уменьшается вероятность неспецифических взаимодействий между твердой матрицей и белковой молекулой. Подбор оптимальной длины важен, так как слишком короткие цепи не исключают перекрытия активного центра носителем, слишком длинные – укладываются в пространстве вокруг фермента, блокируя подход субстрата или ограничивая подвижность фермента из-за возникновения дополнительных связей [21].

Помимо разнообразных способов связывания существуют различные формы гетерогенных биокатализаторов. Биокатализаторы могут быть планарными и

трехмерными, в зависимости от носителя – пористыми и непористыми, проточными и непроточными, и так далее [20].

В случае названных непроточных биокатализаторов матрица с иммобилизованным ферментом помещается в реакционную смесь, в которой проводят биодеструкцию соответствующего субстрата, и по окончании процесса отделяется. Проточные биореактор представляет собой колонку с упакованным в нее носителем в виде гранул или монолита, модифицированным ферментом. Реакционная смесь в данном случае прокачивается через колонку. По мере пропускания смеси молекулы субстрата диффундируют в объеме незанятом носителем, приближаются к поверхности матрицы и проникают в поры, взаимодействуют с активными центрами молекул фермента, после чего продукты биокатализа выносятся из колонки с прокачиваемой жидкостью. Для проточных форм необходимость в дополнительном отделении матрицы с ферментом от продуктов реакции отсутствует, что является важным преимуществом перед иными формами биокатализаторов.

#### **1.4 Стационарные фазы для иммобилизации ферментов**

При рассмотрении способов иммобилизации и сравнении активности нативных и иммобилизованных ферментов упоминалось влияние носителя на процесс биокатализа (на стабильность, на активность, на взаимодействие фермента с субстратом и т.д.). Факторы, которые обуславливают данное влияние, разнообразны. Подробно кинетические и термодинамические закономерности ферментативного катализа при иммобилизации описаны, например, в работах [14, 20]. Некоторые из основных факторов:

– внешне- и внутридиффузионные ограничения. Они характеризуют процессы массопереноса – субстрата из объема раствора и к активному центру фермента из приповерхностных слоев, а также отвод продуктов реакции.

– эффект распределения и влияние микроокружения. Вещества, присутствующие в системе, – молекулы ингибитора, ионы, субстрат – по-разному притягиваются и отталкиваются поверхностью носителя, их концентрация рядом с ферментом будет отлична от концентрации в объеме. Соответственно подбирают такой носитель, который будет либо инертен, либо способствовать созданию оптимальной среды для фермента.

– способ связывания и пространственный эффект. В зависимости от количества реакционноспособных групп на поверхности матрицы варьируется количество образующихся между ней и ферментом ковалентных связей. Слишком жесткая фиксация белковой молекулы снижает активность получаемого биокатализатора. Расположение связей также влияет на доступность активного центра.

Приведенные и многие другие факторы подтверждают, что свойства биокатализатора зависят не только от прививаемого фермента, но и от матрицы. В связи с чем к носителям предъявляется ряд требований [14, 15]: 1) высокая стабильность в широком диапазоне рН и температур, 2) механическая прочность и жесткость, 3) гидрофильность, 4) оптимальная проницаемость и площадь поверхности, 5) отсутствие или низкий уровень неспецифических взаимодействий, 6) возможность получения удобных для технологического процесса форм (гранулы, листы, мембраны, монолиты и т.д.), 7) невысокая стоимость и доступность. В настоящее время предложено и исследовано большое количество природных и синтетических, органических и неорганических носителей [14, 15, 20].

К числу неорганических носителей относят стекла, силикагели, глины, графитовые сажи, оксиды алюминия, никеля, титана, циркония и другие. Хороши данные носители тем, что обладают высокой механической и термической устойчивостью, стойки при воздействии органических веществ и микроорганизмов, доступные, им возможно придать любую форму, некоторые из них относительно недорогие. Однако многие из них обладают непористой структурой и не имеют активных функциональных групп на поверхности, поэтому процесс иммобилизации становится более трудоемким либо применяются физические методы, менее эффективный по сравнению с ковалентным связыванием. Из перечисленных модификации легко поддаются силикагели, имеющие гидрофильный ОН-группы на поверхности. Но их применение ограничено: в щелочной среде силикагели подвержены деструкции, кроме того, не исключается неспецифическая сорбция компонентов. Проблема решается путем дополнительных модификаций, правда это повышает стоимость конечного продукта.

Большую роль в качестве матрицы для иммобилизации ферментов играют органические носители. Это обусловлено следующим: наличие на поверхности реакционноспособных групп, доступность и высокая гидрофильность.

Отрицательными сторонами являются меньшая устойчивость к воздействию микроорганизмов и стоимость. Выделяют:

– природные носители, к которым относят полисахариды (в частности, альгинаты, декстраны, целлюлоза, хитин и др.), белки (коллаген, кератин), липиды (в виде монослоёв и липосом);

– синтетические носители, например, полиметилены, полиамиды, полиэфиры, различные сополимеры, аналоги липидов – поверхностно-активные вещества (ПАВ).

Если сравнивать две представленные группы, то можно отметить, что носители каждой из них по-своему удобны и эффективны как, например, для создания биокатализаторов, так и для фармацевтической промышленности или клинической практики. Природные соединения в большинстве обладают малой токсичностью и физиологической активностью, безопасны экологически. Полисахариды обладают гидрофильностью и большим количеством функциональных групп, белки – хорошей сорбционной емкостью, могут формировать химически прочные гранулы и пленки. В то же время синтетические матрицы могут быть сконструированы в зависимости от целей: регулирование размера пор, количества и природы функциональных групп, создание носителей необходимой формы (от порошков до волокон и мембран), стабильны к воздействию биологических факторов.

В данной работе в качестве твердофазной матрицы для иммобилизации фермента использовали такой класс синтетических полимерных носителей как макропористые монолитные материалы.

## **1.5 Макропористые монолитные материалы**

Макропористые материалы монолитного типа – недавно разработанный класс полимерных твердофазных носителей, представляющий собой единый (монолитный) сорбент с проточными порами, которые образуют систему каналов.

### *1.5.1 Преимущества перед другими материалами для иммобилизации ферментов*

Изначально целью создания макропористых монолитов было использование их в качестве неподвижной фазы в колонках для ВЭЖХ [22]. Позднее они стали применяться в разных областях, в том числе в качестве носителей для иммобилизации ферментов – создания колоночных биореакторов проточного типа, которые уже

упоминались в разделе 3 данной работы. До создания макропористых монолитов использовались в основном колонки, упакованные частицами из полимерных материалов (рис. 6), как пористых, так и непористых.



**Рисунок 6.** Схема, иллюстрирующая движения вещества в упакованных частицами колонках (А) и в монолитных матрицах (Б) [20].

При заполнении пористыми частицами процесс контролируется диффузией в поры, где перенос вещества ограничен, особенно в случае тупиковых пор, и обратно. Кроме того, скорость пропускания потока не должна быть высокой, иначе субстрат будет выведен из колонки быстрее, чем проникнет в поры и вступит во взаимодействие с ферментом. Так же скорость влияет на оказываемое потом давление на систему, большое давление ведет к сжатию частиц и, как следствие, ухудшение пропускной способности колонки и возможность нарушения структуры пор. Подобные биокатализаторы оказались малоэффективными и медленными [20, 23].

В случае заполнения колонки непористыми частицами решается проблема, связанная с диффузией в поровое пространство, обмен веществ рядом с поверхностью более быстрый. Другим решением является, например, применение макропористых частиц, которые имеют сквозные поры, образующие связанную систему. Однако в обоих вариантах недостатком является возможность протекания смеси в межчастичном пространстве, где взаимодействие с ферментом не происходит.

Макропористые монолитные материалы лишены данных недостатков за счет своей структуры и обладают рядом преимуществ:

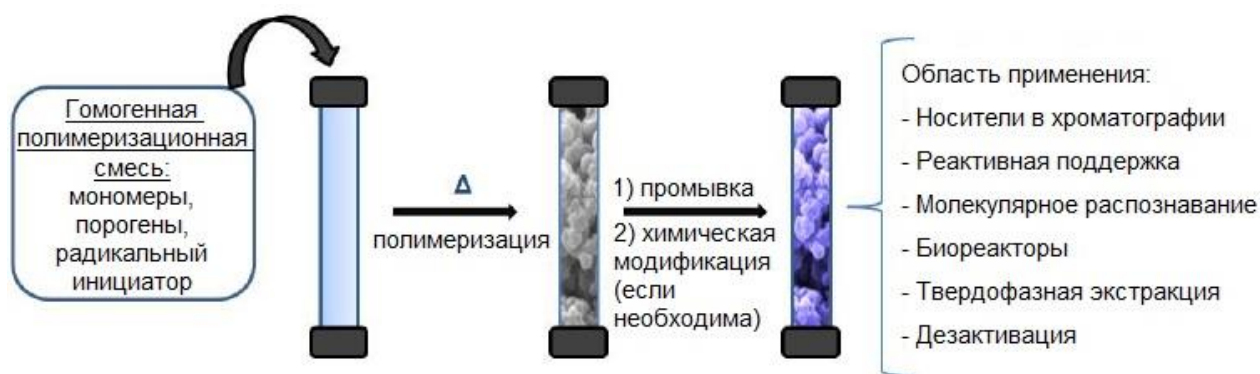
- они высокопроницаемы, и перенос вещества внутри такой системы осуществляется вследствие конвекции и гораздо меньше зависит от диффузии. При этом макропористая структура обеспечивает давление жидкости в системе, что позволяет использовать большие скорости потока;
- данные фазы являются механически прочными, химически устойчивыми;
- применяются разнообразные мономеры и их сочетания, варьируются условия проведения синтеза, что обеспечивает возможность получения продукта с желаемыми функциональными группами на поверхности и размером пор;
- синтез полимерных материалов монолитного типа одностадийный и простой в техническом плане (полимеризация *in situ*).

Кроме того, микронный размер пор позволяет беспрепятственно работать как с низкомолекулярными, так и с высокомолекулярными субстратами. Также данные носители могут быть синтезированы практически любой формы, например, для хроматографии и иммобилизации ферментов широко применяются колонки, заполненные макропористым монолитом [20] и мембраны [24], а для создания биологических микрочипов используются макропористые монолитные слои [25].

### 1.5.2 Способы получения

С момента открытия макропористых монолитных материалов были разработаны и успешно применяются на данный момент разнообразные способы их получения, например, полимеризация, метод криогелей, поликонденсация и многие другие [26].

Одной из стандартных методик является свободнорадикальная полимеризация (рис. 7), применяемая в том числе в данной работе. Первым шагом получают гомогенную реакционную смесь, состоящей из мономеров, пороженных растворителей (порогенов) и инициатора, и помещают её в форму, соответствующих поставленным задачам размеров и геометрии. Далее в зависимости от инициатора реакцию полимеризации проводят под воздействием температуры [27], УФ-излучения [28] или радиационного излучения [29]. На последнем этапе синтеза готовый монолит промывают, чтобы удалить остатки реактивов и прервать протекающие радикальные реакции, и модифицируют, если это необходимо. Последнее осуществимо благодаря наличию функциональных групп на поверхности монолита, природа которых будет зависеть от выбранных мономеров.



**Рисунок 7.** Этапы подготовки макропористых монолитных стержней (адаптировано из [30]).

Мономеры в свою очередь могут быть представлены как одним веществом, так и несколькими для получения сополимеров.

Условия эксперимента, которые влияют на поровые характеристики (размер и объем пор, удельная площадь поверхности), зависят от области применения монолита. Контролируют в основном следующие параметры: соотношение порогенов, температуру или интенсивность излучения, концентрацию радикального инициатора и сшивающих реагентов [30].

Порогены – вещества, являющиеся термодинамическими плохими растворителями для растущих полимерных цепей, которые при контакте с ними осаждаются, в то время как сами порогены образуют либо связанную жидкую фазу, либо диспергированы в виде капель в образующемся на первом этапе геле. Соответственно, варьируя соотношение порогенных веществ, можно влиять на взаимодействие цепей друг с другом и на процессы сшивания и роста. В значительной степени данные процессы зависят от количества инициатора, который отвечает за возникновение активных центров, их количество, а соответственно и скорость полимеризации. В случае радиационной полимеризации возможно проведение процесса без добавления инициатора, что позволяет получать более чистые продукты с воспроизводимыми характеристиками [31].

Аналогичное действие на кинетику полимеризации оказывает температура [26]. Особенно важно контролировать ее в случае термоинициируемой реакции: она должна быть не меньше температуры разложения инициатора (стандартные значения 50-80°C) и оптимальной касательно распределения пор по размерам. Влияние на поровые



характеристики показано в работе [32]. В случае более низких температур профиль распределения пор более узкий и с характерным максимумом, при более высоких температурах профиль уширяется, максимум становится менее выраженным, и разброс размеров монолите становится значительным – от 10 нм до 1000 нм. При фотоиницировании полимеризацию проводят при относительно низких температурах, что является преимуществом при подготовке матриц для молекулярного распознавания [28]. К тому же время, необходимое для протекания реакции, обычно не превышает 1 час, для термоиницируемых процессов требуется от 6 до 24 часов. Главным ограничением в данном случае является глубина проникновения УФ-излучения, вследствие чего используют тонкие формы для полимеризации.

До получения монолитных материалов широко использовалась радикальная суспензионная полимеризация для синтеза полимерных гранул. В работе [27] были получены монолитные и гранулированные полимерные носители, при этом состав реакционной смеси был идентичен. Однако исследования [27] показали, что при использовании одной и той же смеси распределение пор по размерам не совпадает. Если для макропористых материалов монолитного типа диаметр пор мог достигать до 1000 нм, и материал содержал, помимо диффузионных пор, систему каналов, то в случае гранул средний диаметр варьировался от 20 до 150 нм, то есть очень больших пор не наблюдалось. Данный факт объяснялся различиями в механизмах полимеризации в системах, включая такие моменты как наличие перемешивания и разное поверхностное натяжение между фазами (в формах смесь на первых стадиях гомогенна, что способствует взаимодействию реагентов, в случае суспензионного метода – две фазы присутствуют изначально).

Перспективным методом является радикальная крио-полимеризация, суть которой заключается в быстром охлаждении гомогенной водной смеси реагентов в форме до начала реакции и проведение полимеризации при отрицательной температуре [26, 33]. Реакционная смесь в данном случае представлена смесью мономеров, сшивающего реагента и инициатора, в качестве которого выступают окислительно-восстановительные системы, иногда УФ-излучение. При заморозке вода образует кристаллы льда, которые выполняют функцию порогенов, монолит формируется вокруг них из незамерзшей фракции, содержащей монолиты и инициатор. После таяния остается криогель – материал губчатой структуры с супермакропорами,

диаметр которых составляет от 5 до 100 мкм. Размер пор зависит соответственно от размеров кристаллов льда, что контролируется скоростью замораживания смеси, количества сшивающего реагента и концентрации инициатора. Данные монолиты обладают крупными порами, хорошей гидрофильностью, низким сопротивлением, могут применяться в качестве хроматографических носителей [33].

Как упоминалось в начале, способы получения монолитов не ограничиваются представленными видами полимеризации, развиваются также методики, основанные на живой полимеризации, поликонденсации, существуют методы эмульсионной полимеризации [34], реактивного гелеобразования [35], и др.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Материалы

Для синтеза полимерных монолитов использовали мономеры: 2,3-эпоксипропилметакрилат (глицидилметакрилат, ГМА, 97%), этилендиметакрилат (ЭДМА, 98%), 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА, 98%), 1,3-глицерин диметакрилат (ГДМА, 85%); порогены: додеканол (99%), деканол (99%), циклогексанол (99%) и толуол (99%). В качестве радикального инициатора применяли *азо*-бис-изобутиронитрил (АИБН) (98%). Перечисленные реактивы были производства компании Sigma-Aldrich (Германия). Используемый фермент –  $\alpha$ -L-фукозидаза, а также  $\alpha$ -L-фукоздегидрогеназа (ФДГ), пропилфукозид, L-фукоза и фукоидан были предоставлены сотрудниками Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова (Санкт-Петербург, Россия). Полимер 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкоза (ПМАГ) ( $M_w$ 25000), который применяли в качестве спейсера для иммобилизации фермента, был получен из Института высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург, Россия). Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) был приобретен в компании Sigma-Aldrich (Германия).

Монолитные материалы получали в колонках-картриджах с длиной 50 мм и диаметром 4.6 мм из нержавеющей стали фирмы Supelco (США). Коммерчески диски с диаметром 12 мм и толщиной 3 мм СІМЕроху для иммобилизации фермента и СІМ QА для хроматографического разделения продуктов биокатализа на основе сополимера ГМА-ЭДМА были производства компании VІA Separations (Словения).

Другие используемые реактивы: дигидрофосфат натрия дигидрат, гидрофосфат натрия додекагидрат, тетраборат натрия декагидрат, хлорид натрия, карбонат натрия, гидроксид натрия, боргидрид натрия, ацетат натрия, уксусная кислота, 25% водный раствор аммиака, периодат натрия были производства производства Sigma-Aldrich (Германия). Буферные растворы готовили путем растворения необходимых солей и кислот в дистиллированной воде, после чего фильтровали через 0.45 мкм мембранный микропористый фильтр Millipore (США).

Для хроматографического анализа полученных монолитов в качестве подвижной фазы также использовали ацетонитрил (производство), разбавленный

дистиллированной водой в отношении 1:1. Для оценки поровых характеристик применяли урацил (Sigma-Aldrich, Германия).

## 2.2 Оборудование

Для синтеза макропористых монолитных материалов использовали жидкостный термостат производства K LW Instruments (Германия). Иммобилизацию фермента и биокатализ для свободного фермента осуществляли в воздушном термостате производства Binder (Германия). Для промывки получаемых материалов и режима рециркуляции использовали перистальтический насос LKB P-1 Pharmacia (Швеция). Хроматографический анализ поровых характеристик и продуктов биокатализа проводили с помощью хроматографической системы Shimadzu LC-20 (Япония), которая включала в себя два насоса, УФ-детектор, контроллер и колоночный термостат. Для дегазации реакционной смеси перед процессом полимеризации применяли ультразвуковую ванну Сапфир (Россия). Оптическую плотность исследуемых растворов измеряли на спектрофотометре Shimadzu (Япония). Лиофильное высушивание продукта окисления ПМАГ проводили с использованием системы Zibrus (Германия). Для проверки кислотности буферных растворов в работе использовали рН-милливольтметр.

## 2.3 Получение макропористых монолитных колонок

### 2.3.1 Проведение радикальной полимеризации в блоке

В ходе данной работы был получен ряд макропористых монолитных носителей в форме колонок в виде тройных сополимеров глицидилметакрилата (ГМА), этиленгликольдиметакрилатом (ЭДМА) и 2-гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА). Синтез осуществляли методом термоиницируемой свободно-радикальной полимеризации *in situ* в картриджах из нержавеющей стали. Реакционная смесь включала в себя функциональные мономеры, сшивающий мономер, порогенные реагенты – деканол (Д) или додеканол (До), толуол (Т), циклогексанол (Ц), радикальный инициатор – 2,2'-азо-бис-изобутиронитрил (АИБН). Соотношение функциональных мономеров и сшивающего реагента составляло 60/40 (об%/об%), соотношение мономеров и порогенов – 40/60 (об%/об%), соответственно. Соотношение мономеров было постоянным: ГМА/ГЭМА/ЭДМА = 35/25/40 об%.

Концентрация инициатора в смеси варьировалась от 0.7 до 1.0% от массы мономеров. Подробнее состав реакционных смесей и условия проведения полимеризации (температура, длительность) указаны в табл. 1.

**Таблица 1.** Используемые составы смеси пороенов и условия проведения полимеризации.

Образец №	Пороены		Время полимеризации, ч	Температура полимеризации, °С	Содержание инициатора, масс%
	вещества	об% / об%			
1	До / Ц / Т	60 / 5 / 35	6	70	1.0
2	До / Ц / Т	80 / 5 / 15	6	65	1.0
3	До / Ц / Т	70 / 5 / 25	6	65	1.0
4	До / Ц / Т	75 / 5 / 20	6	65	1.0
5	До / Ц / Т	75 / 10 / 15	6	65	1.0
6	До / Ц / Т	80 / 5 / 15	6	65	1.0
7	До / Ц / Т	80 / 10 / 10	6	65	1.0
8	До / Ц / Т	75 / 5 / 20	6	65	1.0
9	Д / Ц / Т	80 / 5 / 15	6	65	1.0
10	Д / Ц / Т	75 / 5 / 20	6	65	1.0
11	Д / Ц / Т	80 / 5 / 15	6	65	0.8
12	Д / Ц / Т	75 / 5 / 20	6	65	0.8
13	Д / Ц / Т	70 / 5 / 25	5	65	0.8
14	Д / Ц / Т	75 / 5 / 20	4	65	0.8
15	До / Ц / Т	70 / 5 / 25	6	65	0.7

После смешения в пенициллиновом флаконе всех компонентов, полученный раствор выдерживали на ультразвуковой бане в течение 2 мин для перемешивания и дегазации, в частности, удаления кислорода, который является ингибитором для радикальной полимеризации. Затем колонки, заполненные полимеризационной смесью, помещали в водный термостат, нагретый до температуры полимеризации, и выдерживали в нем в течении заданного времени. После завершения полимеризации, готовые колонки встраивали в хроматографическую систему низкого давления и промывали для удаления непрореагировавших мономеров и пороенов из пор. Для этого последовательно прокачивали через колонку фильтрованные этанол, раствор этанол/вода в соотношении 50/50, дистиллированную воду на скорости 0.5 мл/мин в течении 30 минут для каждого. Таким образом, получали готовый продукт.

### 2.3.2 Изучение поровых характеристик

Оценку поровых характеристик – пористость, диаметр пор, проницаемость – полученных макропористых материалов проводили, опираясь на данные гидродинамической проницаемости, рассчитанной по закону Пуазеля-Дарси [36]. Анализ проводили хроматографическим методом, встраивая анализируемую колонку в ВЭЖХ систему. Согласно стандартному методу, расчеты производятся по данным для неударживаемого компонента, в качестве которого использовали низкомолекулярное соединение урацил. Раствор урацила в подвижной фазе, состоящей из ацетонитрила и воды в соотношении 50/50, с содержанием 0.1 г/л вводили в дозирующую петлю хроматографа объемом 20 мкл. Элюирование осуществляли при скорости потока 1 мл/мин и детектировании при длине волны 254 нм.

На основании закона Пуазеля-Дарси проницаемость рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{\eta FL}{\pi r^2 \Delta P}, \quad (1)$$

где  $F$  – скорость потока подвижной фазы, м<sup>3</sup>/с;  $\eta$  – вязкость подвижной фазы, Па·с;  $L$  – эффективная длина монолита, м;  $r$  – внутренний радиус монолита, м;  $\Delta P$  – изменение давления, Па. Второй расчетный способ оценить проницаемость – через пористость колонки, по формуле:

$$B = \frac{\varepsilon d^2}{32}, \quad (2)$$

где  $\varepsilon$  – пористость сорбента, которая в свою очередь может быть выражена в виде отношения:

$$\varepsilon = \frac{V_e - V_c}{V_m}, \quad (3)$$

где  $V_e$  – объем элюирования неударживаемого компонента с колонки, м<sup>3</sup>;  $V_c$  – объем элюирования неударживаемого компонента без колонки, то есть объем системы, м<sup>3</sup>;  $V_m$  – объем монолита, м<sup>3</sup>. Объединяя приведенные формулы, можно выразить средний диаметр пор:

$$d = \left( \frac{32\eta FL}{\varepsilon S \Delta P} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

## 2.4 Иммуобилизация фукозидазы на поверхность полимерного носителя

Иммуобилизацию  $\alpha$ -L-фукозидазы проводили двумя способами: прямым методом за счет связывания эпоксидных групп на поверхности носителя с аминогруппами белка и через промежуточный спейсер. В качестве последнего выступал водорастворимый полимер 2-деокси-N-метакрилоиламидо-D-глюкозы (ПМАГ), предварительно переведенный с помощью периодата натрия в окисленную форму (ок.-ПМАГ).

### 2.4.1 Прямая иммуобилизация

Сначала колонку подключали к перистальтическому насосу, промывали 10 мл фильтрованной дистиллированной воды и уравнивали 10 мл 0.0125 М натрий-боратного буферного раствора с рН 9.4. Затем через колонку пропускали 1 мл готового раствора фукозидазы с содержанием 0.28 мг/мл, закрывали колонку заглушками и оставляли в воздушном термостате при 37°C на 15 часов. По истечении указанного времени промывали колонку для устранения непрореагировавшего фермента 4 раза по 2 мл 0.0125 М натрий-боратного буферного раствора (рН 9.4), отбирая данные порции для последующего анализа, затем промывали еще 20 мл буфера, 10 мл дистиллированной воды и 0.01 М натрий-фосфатным буфером с рН 7.0. Хранили готовый биокатализатор в холодильнике при 4°C.

### 2.4.2 Иммуобилизация через спейсер

Данный метод состоит из следующих стадий: 1) аминирование эпоксидных групп на поверхности макропористого носителя, 2) присоединение спейсера в окисленной форме через его альдегидные группы, 3) связывание фермента путем образования между ним и спейсером ковалентных связей, 4) восстановление остаточных функциональных групп спейсера и иминных связей.

#### *Аминирование монолитной матрицы*

Предварительно нагревали 25% водный раствор аммиака до 40°C, прокачивали его через колонку в количестве 10 мл для заполнения пор монолитной матрицы. После закрытия концов колонки заглушками, оставляли колонку в воздушном термостате при 40°C в течение 5 часов. По прошествии данного времени колонку подключали к перистальтическому насосу и промывали дистиллированной водой на скорости потока 0.5 мл/мин до нейтральной среды (рН 7-8 по лакмусовой бумажке).

### *Окисление ПМАГ*

Растворили 20 мг (0.08 ммоль) ПМАГ в 3.2 мл дистиллированной воды и охладили до 4°C. При перемешивании магнитной мешалкой добавляли мета-периодат натрия в молярном соотношении  $[МАГ]/[NaIO_4] = 1/2$ . Реакцию проводили в темноте в течение 24 часов при 4°C. После этого проводили очистку продукта диализом против воды и лиофильную сушку.

### *Ковалентное присоединение спейсера*

На перистальтическом насосе уравнивали колонку 0.01 М натрий-фосфатным буфером с рН 7.0 в течение 15 минут при скорости потока 0.5 мл/мин. Далее через колонку с помощью перистальтического насоса пропускали раствор в том же буфере ок.-ПМАГ с содержанием 0.45 мг/мл в объеме 3 мл на скорости 0.2 мл/мин и закрывали концы заглушками. Статистическую иммобилизацию проводили в течение 1.5 часов при температуре 23°C. Затем промывали колонку 0.01 М натрий-фосфатного буфера рН 7.0 в течение 20 минут при скорости потока 1 мл/мин.

### *Иммобилизация фермента*

Колонку уравнивали рабочим 0.01 М натрий-ацетатным буферным раствором (рН 5.5) в течение 15 минут для заполнения им порового пространства. После чего прокачивали через нее первую порцию раствора фермента с концентрацией 0.14 мг/мл объемом 0.4 мл при скорости потока 0.2 мл/мин. Далее иммобилизацию проводили в воздушном термостате при 35°C в течение 1 часа. После чего загружали вторую порцию фермента с такой же концентрацией объемом 0.45 мл и проводили реакцию в тех же условиях, что и для первой порции. По завершению промывали колонку рабочим буферным раствором при скорости потока 1 мл/мин в течение 20 минут.

### *Восстановление остаточных альдегидных групп и образовавшихся альдиминных связей*

Колонку после предыдущей стадии промывали в течение 10 мин дистиллированной водой при скорости потока 1 мл/мин. После чего поровое пространство заполнили раствором боргидрида натрия с концентрацией 2 мг/мл при скорости потока 0.2 мл/мин. Заполненную восстановителем колонку закрыли заглушками и оставили на 40 минут при комнатной температуре для протекания реакции. По истечении указанного времени биокатализатор промывали



дистиллированной водой в течение 15 мин, затем 2 М NaCl в течение 10 мин и уравнивали 0.01 М натрий-фосфатным буфером (pH 7.0) в течение 10 мин. Стадии промывки и уравнивания проводили при скорости потока 1 мл/мин. Готовый биокатализатор хранили в холодильной камере при температуре 4°C.

#### 2.4.3 Определение количества иммобилизованного фермента

Для определения количества связавшегося с носителем фермента использовали метод Лоури-Фолина [37]. Метод основан на спектрофотометрическом измерении оптической плотности окрашенного раствора. В данном случае оптическую плотность измеряли при 750 нм. Концентрацию определяли по калибровочным зависимостям, построенным по растворам бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве стандарта в соответствующих рабочих буферах. Диапазон концентраций БСА составлял от 0.01 мг/мл до 0.09 мг/мл.

Количество иммобилизованного фермента определяли по разности исходного количества фермента и количеств фермента, определённых в растворе после иммобилизации и промывания колонки:

$$m_{\text{иммоб.ферм.}} = m_1 - m_2 - m_3, \quad (5)$$

где  $m_1$  – количество белка в исходном растворе (мг),  $m_2$  – количество белка в растворе, собираемом после загрузки фермента в колонку (мг),  $m_3$  – количество белка в промывных водах (мг).

## 2.5 Изучение активности фукозидазы

В ходе работы определяли активность полученных гетерогенных биокатализаторов и для сравнения активность свободного (нативного) фермента. Расчеты основных кинетических параметров – константы Михаэлиса, скорости каталитической реакции и удельной активности – проводили с помощью графических методов. Для этого получали зависимости скорости гидролиза ( $V$ ) от концентрации субстрата ( $[S]$ ) и их линеаризованный вид по методам Лайнуивера-Берка (построение в координатах  $1/V - 1/[S]$ ) и Хейнса (построение в координатах  $[S]/V - [S]$ ).

Каталитическая реакция – реакция гидролиза субстрата ферментом, скорость гидролиза рассчитывали по формуле:

$$V = [P]/t, \quad (6)$$

где  $t$  – время реакции (мин),  $[P]$  – концентрация продукта (мкмоль/л), которую, в свою очередь, рассчитывали по формуле:

$$[P] = \Delta A_n / \varepsilon_n l, \quad (7)$$

где  $\Delta A_n$  – прирост оптической плотности за время реакции при длине волны  $n$ ,  $l$  – толщина кюветы (см),  $\varepsilon_n$  – молярный коэффициент экстинкции продукта при длине волны  $n$  (л/моль·см). Найдя максимальную скорость гидролиза и зная объем реакционной смеси  $\varphi$ (л), далее получали значение активности  $U$ (мкмоль/мин) биокатализатора по формуле:

$$U = V_{max} / \varphi. \quad (8)$$

Удельную активность  $A$  ферментов рассчитывали путем нормирования  $U$  на массу иммобилизованного фермента  $m$ (мг):

$$A = U / m. \quad (9)$$

Константу скорости реакции гидролиза  $k_{cat}$  получали из уравнения:

$$k_{cat} = V_{max} / [E] \quad (10)$$

где  $[E]$  – концентрация фермента (моль/л).

В качестве субстрата использовали низкомолекулярное соединение пропилафукозид в концентрации от 0.02 мг/мл до 0.4 мг/мл (для иммобилизованной фукозидазы) или от 0.01 до 0.2 мг/мл (для нативной фукозидазы) в 0.01 М натрий-ацетатном буфере (рН 5.5). Определение содержания продуктов осуществляли по методике [38], заключающейся в проведение предварительной спектрофотометрической реакции образовавшейся при гидролизе  $L$ -фукозы с  $\alpha$ - $L$ -фукоздегидрогеназой (ФДГ) в присутствии окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>) и измерении оптической плотности растворов.

### *2.5.1 Определение активности свободного фермента*

В растворы субстрата объемом 0.8 мл вносили по 100 мкл раствора фермента и проводили реакцию в воздушном термостате при температуре 37°C в течение 40 минут. По истечении данного времени к реакционной смеси добавляли 2.5 мкл ФДГ и 10 мкл 0.1 М водного раствора НАД<sup>+</sup>. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 60 минут, после чего измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 340 нм.

### *2.5.2 Определение активности иммобилизованного фермента*

Реакцию гидролиза проводили в режиме рециркуляции. Для этого подключали колонку с иммобилизованным ферментом к перистальтическому насосу, уравнивали 0.01 М натрий-ацетатным буфером (рН 5.5) в течение 15 минут. Затем капилляр на входе в насос и капилляр на выходе из колонки опускали в пенициллиновый флакон с раствором субстрата объемом 3 мл. Гидролиз проводили при скорости потока 1 мл/мин и температуре 37°C в течение 40 минут. По окончании процесса биокатализа из реакционной смеси отбирали 1485 мкл, к ним добавляли 5 мкл ФДГ и 10 мкл 0.1 М водного раствора НАД<sup>+</sup>. Реакцию проводили в течение 60 минут при комнатной температуре, затем измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 340 нм.

### **2.6 ВЭЖХ анализ фукозы и фукоидана**

Для исследования возможности мониторинга гидролиза фукоидана по его продуктам проводили анализ фукозы и фукоидана методом анионообменной ВЭЖХ с использованием в качестве стационарной фазы коммерческого диска СІМ QА. В качестве подвижной фазы для анализа использовали 0.02 М водный натрий-ацетатный буфер (рН 5.5) (раствор А) и 2 М раствор хлорида натрия в А (раствор Б). Хроматографическое разделение осуществляли в условиях линейного градиентного элюирования от 0 до 100% Б за 15 минут на скорости потока 1 мл/мин. Картридж-держатель с диском устанавливали в хроматографическую систему, перед анализом диск уравнивали раствором А. Затем вводили в дозирующую петлю хроматографа объемом 20 мкл отдельно или совместно растворы фукозы и фукоидана (0.1 мг/мл в А).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

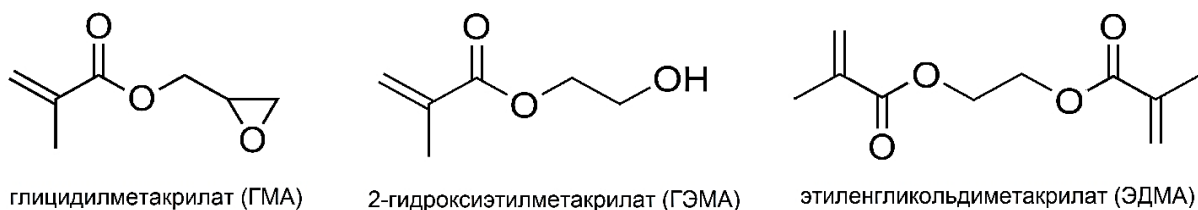
Макропористые материалы монолитного типа являются перспективными для применения в различных областях, в частности в качестве стационарных фаз для ВЭЖХ и носителей для иммобилизации ферментов. Данная работа направлена на исследование проточных гетерогенных биореакторов в виде монолитных колонок, модифицированных ферментом – фукозидазой. Подобные биореакторы высокоэффективны, удобны в применении, позволяют получать продукт без дополнительных стадий разделения субстрата и фермента, экономически выгодны за счет возможности многократного использования. Фукозидазы, как ранее было показано в главе «Литературный обзор», проявляют каталитическую активность в реакциях гидролиза фукодианов – полисахаридов, содержащихся в бурых водорослях. Получаемые биодеструкцией моно- и олигосахариды представляют интерес для фармацевтической и пищевой промышленности.

#### 3.1 Синтез макропористых монолитных колонок и изучение их характеристик

Полиметакрилатные материалы хорошо зарекомендовали себя в качестве монолитных носителей благодаря химической и механической устойчивости. В зависимости от использованных для синтеза функциональных мономеров, они несут на своей поверхности те или иные активные функциональные группы, которые могут быть модифицированы в зависимости от прикладной задачи. Их синтез осуществляется различными методами, которые позволяют получать монолиты любой формы и размеров [20, 24, 25]. В частности, макропористые монолитные материалы могут быть получены методом свободно-радикальной полимеризации в блоке. В данной работе синтез макропористых монолитных колонок проводился *in situ* в картриджах из нержавеющей стали длиной 50 мм и внутренним диаметром 4.6 мм.

Синтез полимерного материала проводили, используя следующие мономеры (рис. 8): глицидилметакрилат (ГМА), 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА), этиленгликольдиметакрилат (ЭДМА). ГМА и ГЭМА являются функциональными мономерами: ГМА содержит эпоксидные группы, необходимые для дальнейшей иммобилизации фермента, ГЭМА – гидроксильные, способствующие дополнительной гидрофиллизации поверхности и обеспечивающие сольватацию фермента,

необходимую для поддержания его природной конформации и сохранения активности. В свою очередь, будучи бифункциональным ЭДМА выполнял функцию сшивающего мономера. Соотношение мономеров во всех реакционных смесях было постоянным и составляло: ГМА/ГЭМА/ЭДМА = 35/25/40 (об%/об%/об%). Доля мономеров в полимеризационной смеси составляла 40 об%.



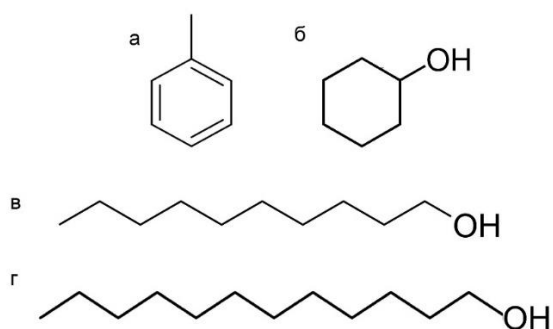
**Рисунок 8.** Структурные формулы мономеров.

Для получения желаемых поровых характеристик варьировали условия полимеризации. Выбор минимального размера пор обуславливается субстратом. Поскольку фукоиданы, рассматриваемые в данной работе в качестве субстрата, являются высокомолекулярными соединениями, для обеспечения их эффективной деструкции в динамическом режиме необходимо, чтобы стационарная фаза была высокопроницаемой для макромолекул и обеспечивала незатруднённый диффузией массоперенос. Из литературы известно, что таким требованиям хорошо удовлетворяют системы со средним размером пор не менее 1 мкм [39].

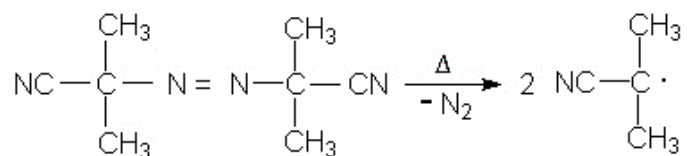
Одним из способов управления поровыми характеристиками макропористых материалов является вариация состава смеси порообразующих растворителей (порогенов). Для указанной выше системы мономеров в качестве порогенов были выбраны додеканол, деканол, толуол и циклогексанол (рис. 9). Суммарное количество порогенов в смеси составляло 60 об%. Используемые для синтеза комбинации порогенов и составы порообразующих смесей представлены в таблице 1.

Другой немаловажной составляющей является инициатор, который обуславливает температуру проведения термоинициируемой полимеризации. В качестве инициатора использовали 2,2-азо-бис-изобутиронитрил (АИБН), схема распада которого на свободные радикалы приведена на рис. 10. Для АИБН характерно разложение на свободные радикалы под воздействием температуры в диапазоне от 50 до 70°C. При температурах от 50 до 60°C распад инициатора на радикалы происходит медленно, вследствие чего скорость полимеризации также низка. В то же время,

проведение полимеризации при 70°C и выше способствует слишком активному образованию свободных радикалов. Это в свою очередь обеспечивает очень быстрое протекание полимеризации, что в случае макропористых монолитных материалов является недостатком. Высокая скорость образования полимера приводит к быстрому фазовому разделению между образующимся полимером и порогенами, что сопровождается спонтанным оседанием микроглобул полимера в виде плотной малопроницаемой массы с одновременным сильным ее сшиванием. В частности, данная ситуация имела место при получении образца 1 (табл. 1), полимеризация которого проводилась при 70°C. Продукт полимеризации получился слишком плотным и имел низкую проницаемость даже для молекул этанола на стадиях промывки. По этой причине полимеризацию для остальных систем проводили при температуре 65°C. Для полимеризации метакриловых мономеров выбранный инициатор наиболее эффективен при содержании в реакционной смеси в концентрации 0.8 до 1 масс% [40].



**Рисунок 9.** Структурные формулы используемых порогенов: а – толуол, б – циклогексанол, в – деканол-1, г – додеканол-1.



**Рисунок 10.** Схема распада инициатора АИБН на свободные радикалы.

Помимо температуры полимеризации, важным условием проведения процесса также является оптимальная длительность полимеризации. На начальных этапах работы полимеризацию проводили в течение 7 и 8 часов. Однако в ходе проведенных синтезов были получены неудовлетворительные результаты, что было связано с повышенной твердостью и высокой плотностью монолитов, не обеспечивающих

требуемую проницаемость даже на стадии промывки материала после синтеза. Близкие к желаемым характеристики наблюдались для образцов, полученных в результате синтеза в течение 6 часов. В связи с этим, данное время было выбрано для дальнейших исследований.

Оценку поровых характеристик проводили по данным гидродинамической проницаемости, рассчитанным по методике, приведенной в главе «Экспериментальная часть» и основанной на использовании уравнений, выведенных из закона Пуазеля-Дарси при допущении, что монолитный носитель представляется как система проточных капилляров [36]. В таблице 2 представлены данные проницаемости, среднего размера пор и общей пористости для полученных макропористых материалов монолитного типа.

**Таблица 2.** Характеристики некоторых полученных макропористых монолитных фаз.

Образец №	Средний диаметр пор, нм	Проницаемость, м <sup>2</sup>	Пористость, %
2	780	$1.95 \cdot 10^{-14}$	87
4	1100	$2.64 \cdot 10^{-14}$	71
7	700	$1.68 \cdot 10^{-14}$	94
8	640	$8.82 \cdot 10^{-15}$	68
11	820	$1.42 \cdot 10^{-14}$	68
15	1120	$2.48 \cdot 10^{-14}$	64

Таким образом был получен ряд сополимеров ГМА–ГЭМА–ЭДМА с размером пор от 640 до 1120 нм. Как отмечалось ранее, необходимый размер пор составляет около 1000 нм. Таким образом, для дальнейшей работы были выбраны три макропористых монолитных колонки, а именно, колонка №4 и две колонки №15, характеризующиеся средним размером пор около 1100 нм. Важно отметить, что при анализе для всех колонок наблюдалось появление одиночных симметричных пиков эталонного вещества, что означало малый разброс пор по размерам и преобладание пор с соответствующим диаметром.

Кроме того, можно отметить как изменялись характеристики макропористых монолитов в зависимости от состава реакционной смеси. Так, например, пороги влияют не термодинамическую стабильность системы, чем менее она стабильна, тем лучше происходит разделение фаз на первых этапах полимеризации, что достигается

посредством использования «плохих» растворителей и ведет к большему расстоянию между участками полимерных цепей, то есть к большим порам. Использование деканола не дало нужных результатов, из всех синтезированных образцов только один (№9) дошел до стадии анализа, но размер пор не соответствовал желаемому. Возможно, это связано с тем, что по сравнению с молекулами додеканола, с которым результаты были более успешными, деканол менее гидрофобный и чуть лучше сольватирует образующийся полимер. При этом уменьшение времени полимеризации не способствовало изменениям в лучшую сторону, например, для монолитов №12 и №14 идентичного состава с временем полимеризации 6 и 4 ч.

Однако уменьшение содержания инициатора, отвечающего за количество свободных радикалов на начальной стадии процесса полимеризации, позволило повлиять на процесс в нужном направлении в нескольких случаях. Например, образцы №10 и №12 имели один и тот же состав за исключением содержания АИБН, которое составило 1.0 и 0.8 масс%, соответственно. В результате образец №12 был охарактеризован, в то время как образец №10 оказался непроницаем для подвижной фазы. Аналогичный эффект наблюдался при уменьшении содержания инициатора от 1.0 до 0.7 масс% для образцов №3 и №15, первый из которых демонстрировал неудовлетворительные свойства, тогда как второй характеризовался нужным средним размером пор и пористостью.

Если обратить внимание на соотношение порогенов между собой, то можно отметить следующее: 1) при постоянной объемной доле циклогексанола в смеси увеличение доли толуола за счет додеканола приводит к уменьшению среднего диаметра пор, что прослеживается для следующих образцов №2, №8, №3, №1 (в порядке увеличения доли толуола); 2) при постоянном содержании додеканола и изменении увеличения доли циклогексанола при уменьшении доли толуола значительных изменений не наблюдалось (№2, №7), либо на хроматограмме при анализе наблюдали сильное размытие пика, что свидетельствовало о неравномерном протекании полимеризации (№4, №5); 3) при постоянной доле толуола – аналогично предыдущему случаю, большее содержание циклогексанола привело к размытию пика (№2, №5).

Таким образом, по совокупности проведенной работы по синтезу макропористых материалов монолитного типа была продемонстрирована возможность



управления характеристиками получаемых материалов за счет изменения состава полимеризационной смеси и условий проведения синтеза.

### 3.2 Иммобилизация фермента

В данной работе иммобилизацию фермента,  $\alpha$ -фукозидазы, на поверхности макропористых носителей монолитного типа проводили двумя способами, а именно одностадийным методом (прямой метод) и многостадийным (иммобилизация через спейсер). Оба способа позволяют получать достаточно стабильные иммобилизованные формы, устойчивые к колебанию внешних условий (температура, pH и др.) и позволяющие проводить процесс биокатализа многократно.

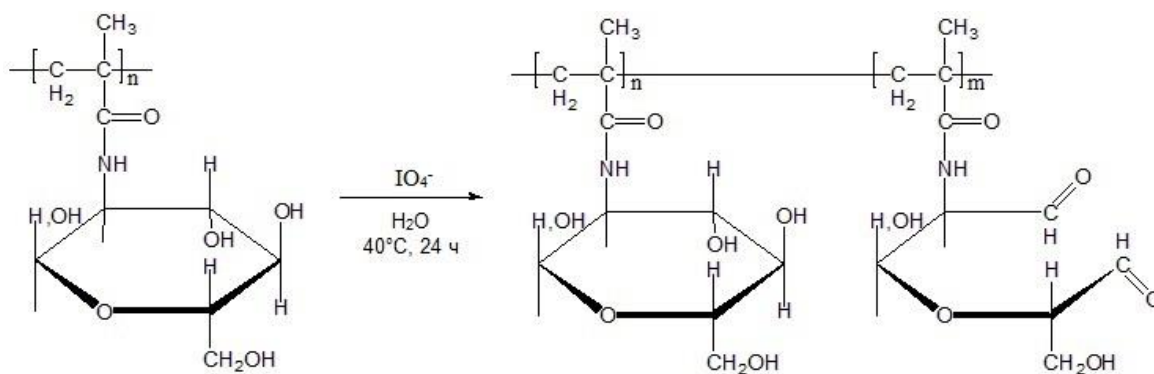
В качестве стационарных фаз для иммобилизации фермента использовали монолитные материалы различного дизайна, а именно, полученные монолитные колонки (см. п. 3.1) и коммерческие диски диаметром 12 мм и высотой 3 мм. Оба типа носителей содержали на своей поверхности эпоксидные группы, способные вступать в реакции нуклеофильного присоединения. Благодаря этому возможно проводить одностадийную иммобилизацию белков за счет реакции эпоксидных групп полимерного носителя с первичными аминогруппами биомолекул. Схема иммобилизации фукозидазы прямым методом представлена на рис. 11. Как было показано в главе «Литературный обзор», при иммобилизации активность фермента может снижаться, так как меняется его микроокружение и возникают диффузионные ограничения. Кроме того, при прямой иммобилизации фермент может оказаться обращенным активным центром к поверхности носителя полностью или частично, что стерически затрудняет его взаимодействие с субстратом.



**Рисунок 11.** Прямая иммобилизация фермента на поверхности ГМА-содержащего полимерного носителя.

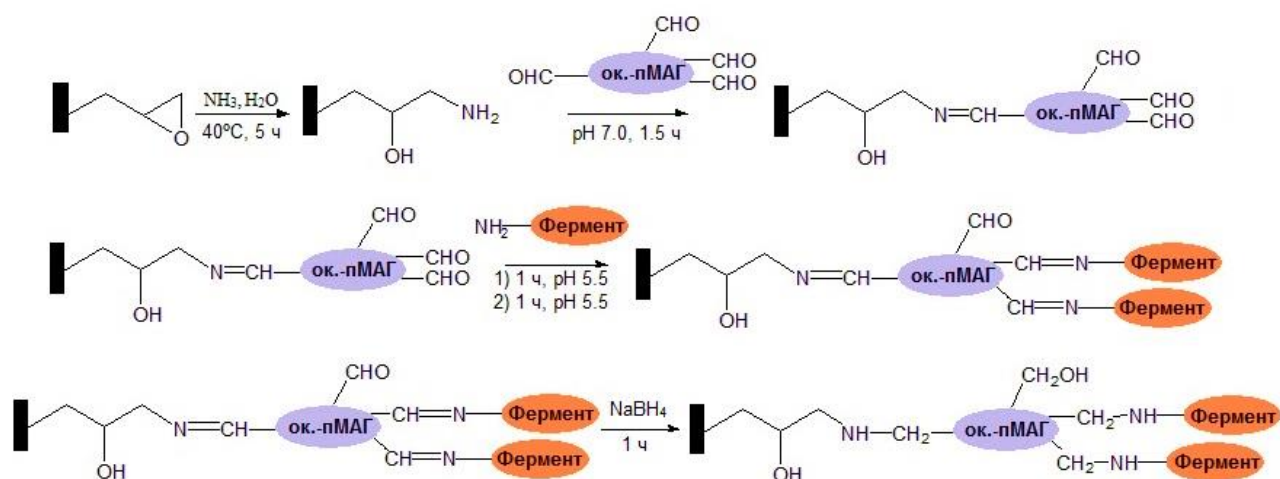
Данный недостаток может быть преодолен при использовании второго метода иммобилизации, а именно иммобилизации через спейсер. В данной работе в качестве спейсера использовали синтетический полимер 2-деокси-*N*-метакрилоиламидо-*D*-

глюкозы (ПМАГ) с молекулярной массой 25000. Для генерирования реакционноспособных групп в ПМАГ проводят окисление части звеньев глюкозы периодатом натрия (рис. 12). В ходе данной реакции образуются альдегидные группы, которые могут далее взаимодействовать с аминогруппами фермента, а также с поверхностью носителя, после ее аминирования. В свою очередь, процесс аминирования протекает за счет активных эпоксидных групп, хорошо вступающих в реакции с такими нуклеофилами как первичные амины и аммиак. Раствор последнего применяли в данной работе для аминирования поверхности ГМА-содержащих полимерных материалов. Общая схема иммобилизации фермента через спейсер отображена на рис. 13.



**Рисунок 12.** Окисление пМАГ и структура ок.-паМАГ

Применение высокомолекулярного спейсера позволяет отдалить фермент от поверхности на достаточное расстояние, чтобы исключить любые нековалентные взаимодействия. Помимо этого, фермент становится более подвижным, активный центр доступнее, а препятствие в виде диффузионных ограничений минимизировано. Таким образом, для фермента реализуется состояние близкое к свободному в растворе. Конформацию белковой молекулы также помогает поддерживать спейсер в виду многоточечного связывания – образования нескольких ковалентных связей с ферментом.

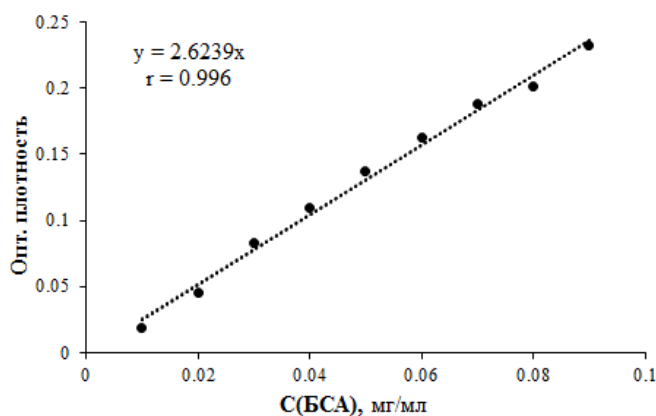


**Рисунок 13.** Схема иммобилизации фермента через спейсер

В отличие от одностадийного прямого метода, иммобилизация через спейсер является многостадийным процессом. Сначала поверхность полимерной матрицы аминировали 25% раствором аммиака при  $40^\circ\text{C}$  в течение 5 часов, после чего модифицировали ок.-ПМАГ при  $22^\circ\text{C}$  в нейтральной среде (фосфатный буфер  $\text{pH } 7.0$ ) в течение 1.5 часов. Далее колонку загружали раствором фукозидазы, аминогруппы которой реагировали со свободными функциональными группами спейсера при  $35^\circ\text{C}$  (ацетатный буферный раствор,  $\text{pH } 5.5$ ). Этап проводили в две одинаковых стадии длительностью по 1 часу, загружая в колонку для каждой из них новую порцию фермента. Повтор операции предположительно мог увеличить выход реакции иммобилизации. В данном случае кислотность среды была выбрана в соответствии с оптимумом  $\text{pH}$  для фукозидазы, в котором она наиболее устойчива. Оставшиеся альдегидные группы спейсера, которые не участвовали в связывании, и иминные связи восстанавливали с помощью боргидрида натрия, чем завершали процесс иммобилизации.

Для определения количества введенных альдегидных групп на этапе модификации поверхности спейсером, применяют метод Шиффа, который основан на фотометрическом определении продуктов реакции фуксинсернистой кислоты (реактив Шиффа) с альдегидными группами. Количество связанного фермента далее определяют с помощью метода Лоури-Фолина, который обладает высокой чувствительностью и позволяет определять содержание белка на уровне 10-100 мкг. Он заключается в измерении оптической плотности окрашенных продуктов реакции

Фолина на ароматические аминокислоты в сочетании с биуретовой реакцией на пептидную связь. Данным методом находят содержание белка в исходном и промывных растворах, по разности полученных значений в итоге рассчитывая количество иммобилизованного фермента. Для этого метод требуется построение градуировочной зависимости, в качестве модельного вещества для которой используют бычий сывороточный альбумин (БСА), растворенный в соответствующем буфере. Пример калибровочной зависимости по БСА приведен на рис. 14.



**Рисунок 14.** Зависимость оптической плотности раствора от концентрации БСА.

Количество фермента, связанное с матрицей, представляет собой важную характеристику гетерогенного биокатализатора. Чем количество фермента больше, тем выше активность биокатализатора в целом. Однако слишком высокая плотность фермента на поверхности может быть нежелательна ввиду затрудненного доступа субстрата к активному центру фермента из-за возможных стерических ограничений. Таким образом, были получены и охарактеризованы три гетерогенных биокатализатора. Характеристики полученных систем представлены в таблице 3. Из представленных данных видно, что количество фермента, иммобилизованного прямым методом на поверхности диска и колонки, было близким. В то же время, эффективность иммобилизации фермента через спейсер оказалась значительно ниже. Ввиду многостадийности данного подхода, вероятнее всего, использованные условия не для всех стадий были оптимальными. Таким образом, в дальнейшем для использования данного метода требуется оптимизация условий проведения реакций.

**Таблица 3.** Характеристики полученных гетерогенных биокатализаторов.

Образец монолита	Размер пор, нм	Пористость, %	Метод иммобилизации	Количество иммоб. фермента, мкг/колонка
Колонка	1100	71	прямой	183
Колонка	1120	63	через спейсер	11
Диск	1600	60	прямой	170

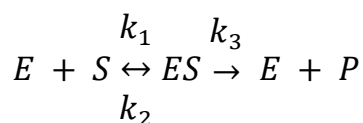
### **3.3 Определение активности иммобилизованных ферментов и сравнение с биокатализаторами в растворе**

Важным этапом в исследовании биокатализаторов является установление их эффективности, которая определяется скоростью, протекающей реакции биодеструкции и проявляемой ферментом активностью. Они, в свою очередь, могут быть выражены через количество субстрата, вступившего во взаимодействие за единицу времени, или через количество продукта, аналогично образовавшееся за единицу времени.

В начальные моменты зависимость скорости биокатализа от времени имеет линейный вид. Однако по мере протекания реакции ее скорость постепенно уменьшается за счет таких факторов, как возможность ингибирования продуктами реакции, постепенное уменьшение концентрации субстрата и, соответственно, повышение вероятности распада субстрат-ферментных комплексов до преобразования субстрата, и т.д. Линейные зависимости описываются математически достаточно просто, но в данном случае они применимы только к начальному моменту катализа, далее такое описание становится некорректным.

Начальная концентрация субстрата представляет один из наиболее существенных факторов. Ее повышение закономерно приводит к росту скорости реакции биокатализа, потому что задействуются все большее количество активных центров в течение того же промежутка времени, что и при меньшей концентрации. Однако количество активных центров ограничено, и при некотором содержании субстрата происходит насыщение, после чего его концентрация не оказывает влияния на скорость процесса. Согласно теории Михаэлиса-Ментен процесс биокатализа состоит из стадий образования комплекса «фермент (*E*) – субстрат (*S*)» (*ES*), который может распадаться на исходные компоненты или распадаться с превращением

субстрата в продукт ( $P$ ) и высвобождением фермента в исходном виде с соответствующими константами скорости для каждой:



Состояние равновесия описывают уравнением

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES], \quad (11)$$

которое преобразуют для дальнейших расчетов к виду:

$$[E][S] = [ES]/K_M, \quad (12)$$

обозначив соотношение скоростей всех стадий  $K_M$  (*константа Михаэлиса*).  $K_M$  зависит от условий проведения реакции (рН, Т) и природы субстрата. Скорость биокатализа характеризуется третьей стадий, на которой происходит непосредственное образование продукта, и может быть выражена уравнением:

$$V = k_3[ES] \quad (13)$$

Максимального значения она достигает при наступлении насыщения субстратом фермента:

$$V_{max} = k_3[E]_t = k_3([E] + [ES]) \quad (14)$$

где  $[E]_t$  – общая концентрация фермента в реакционной смеси, который присутствует либо в свободном виде, либо в виде комплексов с субстратом. После преобразования трех последних уравнений в общее получают уравнение Михаэлиса-Ментен:

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

Из уравнения видно, что при низких содержаниях субстрата скорость растет с увеличением его концентрации, при высоких содержаниях (насыщение) скорость становится величиной  $V_{max}$  – постоянной и максимально возможной. Константа Михаэлиса, в свою очередь, является показателем сродства фермента к разлагаемому им субстрату, зависимость при этом обратная: чем выше  $K_M$ , тем ниже сродство и наоборот.

В представленном виде уравнение Михаэлиса-Ментен обычно не используют, а преобразуют в более удобный вид. В данной работе расчеты параметров проводились по двум методам: Лайнуивера-Берка и Хейнса. Согласно первому из них уравнение представляют в следующем виде:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}[S]}, \quad (16)$$

зависимость строят в обратных координатах  $1/V$  от  $1/[S]$ , из отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат, находя  $V_{max}$ , из тангенса угла наклона или отрезка по оси абсцисс –  $K_M$ . Метод наиболее зависим от точек, соответствующим низким концентрациям, а потому менее точен. Согласно второму методу уравнение записывают в форме:

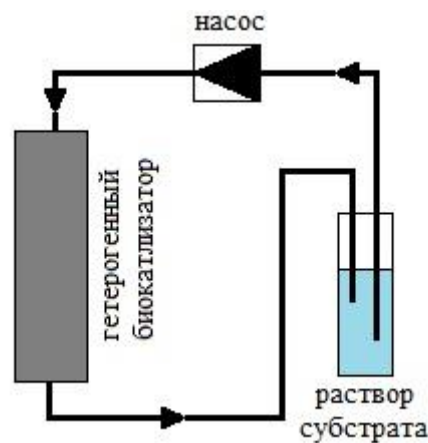
$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max}} \quad (17)$$

и график строят в координатах  $[S]/V$  от  $[S]$ , из тангенса угла наклона рассчитывая  $V_{max}$ , из отрезков на осях координат –  $K_M$ .

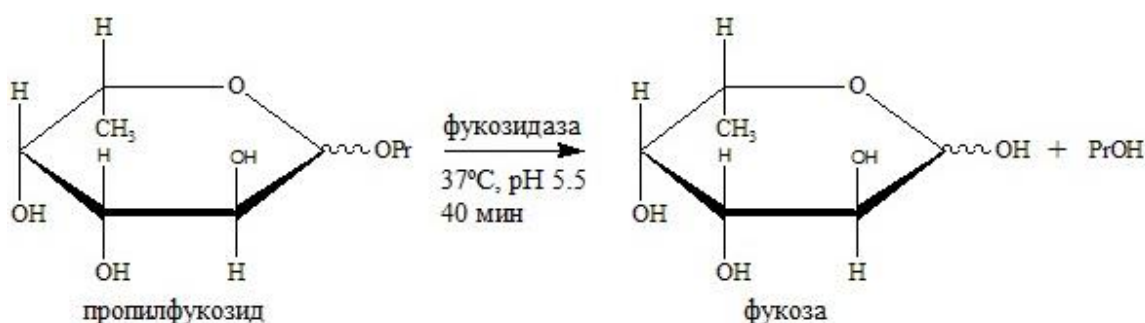
Использование данных уравнений позволило рассчитать для изучаемых биокатализаторов ряд параметров:  $V_{max}$ , имея размерность скорости, характеризует удельную активность биокатализатора (количество субстрата в мкмоль, которое преобразует 1 мг фермента за 1 минуту);  $K_M$ , определяющую сродство субстрата к ферменту;  $k_3$  или  $k_{cat}$ , отражающую число прореагировавших молекул субстрата на одну молекулу фермента за единицу времени, 1/с; отношение  $k_{cat}/K_M$ , отражающее эффективность биокатализа в целом.

Определение активности на практике проводилось в режиме рециркуляции, при котором одна и та же порция субстрата известного объема в подходящем буферном растворе многократно пропусклась через макропористую стационарную фазу, содержащую иммобилизованный фермент. Для осуществления такого процесса использовали перистальтический насос, капиллярами соединенный с исследуемым биореактором и флаконом с раствором субстрата (рис. 15).

В качестве субстрата использовали пропилфукозид (FucOPr), содержание которого составляло от 0.02 мг/мл до 0.4 мг/мл. Реакцию проводили в условиях термостатирования в связи с тем, что активность фермента зависит от температуры и может изменяться при ее колебаниях, что не позволило бы получить корректные результаты. Оптимальная температура для  $\alpha$ -L-фукозидазы составляет 37°C. Оптимальное значение кислотности среды равно 5.5, поэтому реакцию проводили в натрий-ацетатном буфере с соответствующим рН. Процесс биodeградации в данных условиях проводили в течение 40 минут при скорости циркуляции 1 мл/мин. Схема реакции представлена на рис. 16.



**Рисунок 15.** Схема процесса рециркуляции



**Рисунок 16.** Ферментативный гидролиз пропилфукозида  $\alpha$ -L-фукозидазой

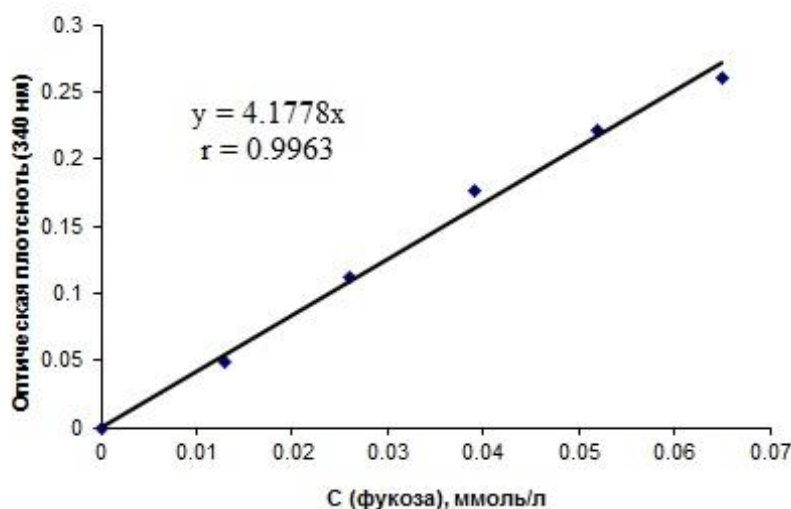
Скорость каталитической реакции определяли по количеству продукта, образовавшегося в единицу времени. Поскольку ни продукты биодеструкции, ни субстрат не содержат хромофорных групп, то спектрофотометрические измерения проводили после предварительного окисления свободной L-фукозы под действием  $\alpha$ -L-фукоздегидрогеназы (ФДГ) в присутствии окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>) по методике [39]. Фукоза окисляется ФДГ до L-фуконата в присутствии НАД<sup>+</sup>, в то время как последний переходит в восстановленную форму НАДН (рис. 17), которая поглощает излучение при длине волны 340 нм.

Предварительно для расчётов была построена калибровочная зависимость ФДГ по свободной фукозе в пределах 0.013 до 0.065 ммоль/л (рис. 18).



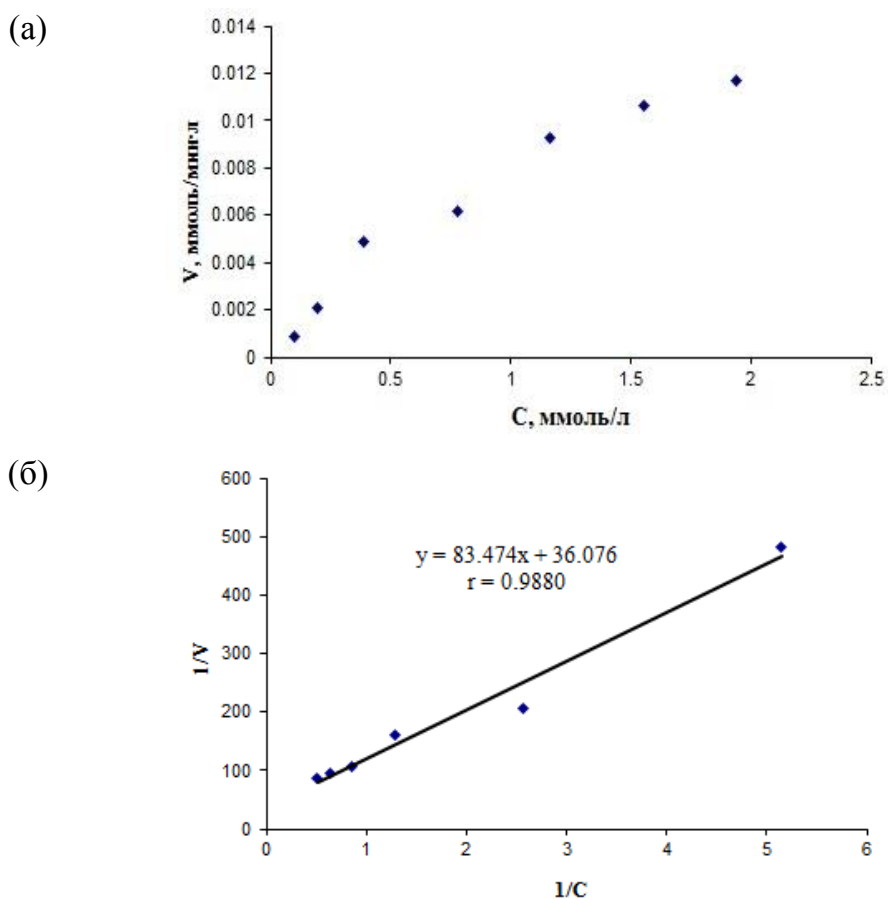


**Рисунок 17.** Окисление фукозы ФДГ в присутствии НАД<sup>+</sup>.



**Рисунок 18.** Калибровочная зависимость, отражающая окисление фукозы ФДГ в зависимости от изменения концентрации субстрата.

На данный момент определена активность биокатализатора на основе монолитного диска с иммобилизованного фукозидазой. Для осуществления метода рециркуляции диск помещали в специальный картридж-держатель и предварительно уравнивали натрий-ацетатным буфером в течение 15 минут при скорости потока 1 мл/мин. Полученные результаты сравнивали со значениями активности свободной (нативной) фукозидазы, которую определяли путем внесения в растворы FucOPr с содержанием от 0.01 до 0.2 мг/мл и объемом 1.5 мл одинаковые аликвоты фермента и проводили реакцию в тех же условиях (37 °С, рН 5.5) с последующим спектрофотометрическим определением L-фукозы с НАД<sup>+</sup> – зависимой ФДГ. Как для нативной фукозидазы, так и для иммобилизованной расчеты проводились по методу Лайнуивера-Берка (Л.-Б.) и методу Хейнса (Х.). В качестве иллюстрации вид графических зависимостей для биокатализа, проведенного в растворе, представлен на рис. 19.



**Рисунок 19.** Зависимость скорости реакции  $V$  от концентрации FucOPr в растворе (а) и ее линеаризованная форма (метод Лайнуивера-Берка) (б).

Результаты определения параметров биокаталитической реакции гидролиза пропилфукозида под действием растворенной и иммобилизованной  $\alpha$ -L-фукозидазы представлены в табл. 4. Из расчетных данных видно, что удельная активность ( $A_{уд}$ ) иммобилизованной фукозидазы практически равна активности нативного фермента. Эффективность биодеструкции в целом снижается, что видно по отношению  $k_{cat}/K_m$  и является ожидаемым в связи с тем, что при иммобилизации подвижность фермента ограничивается. Этим же, вероятно, объясняется повышение  $K_m$ . Однако значения эффективности остаются на достаточно высоком уровне, в среднем составляя около 60% от исходных (58% по методу Л.-Б., 63% по методу Х.), что говорит о достаточно высокой каталитической активности биокатализатора. Кроме того, для иммобилизованной фукозидазы оба метода расчета дают сопоставимые результаты, что свидетельствует о более точном определении характеристик гетерогенного биокатализатора, как в случае более низких концентраций субстрата, так и при более высоких.

**Таблица 4.** Кинетические параметры реакции гидролиза ферментом  $\alpha$ -L-фукозидаза субстрата пропилфукозида.

Биокатализатор	Метод расчета	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M$ , мМ	$k_{cat}/K_M$ , (мМ·с) <sup>-1</sup>	$A_{уд}$ , мкмоль·(мин·мг) <sup>-1</sup>
В растворе	Л.-Б.	0.42	1.05	0.40	0.37
Диск		0.54	2.31	0.23	0.48
В растворе	Х.	0.51	1.45	0.35	0.45
Диск		0.53	2.42	0.22	0.47

### 3.4 ВЭЖХ анализ фукозы и фукоидана

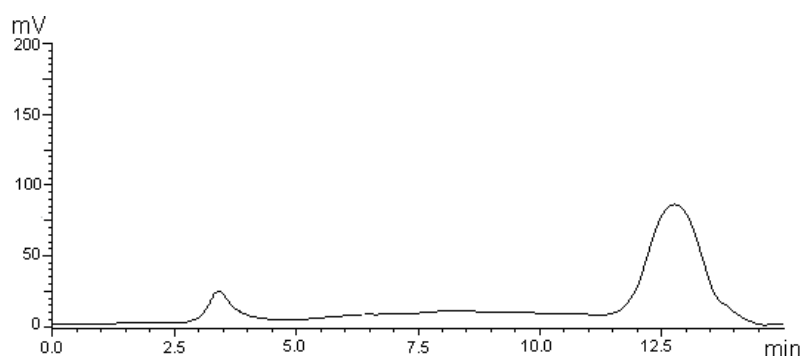
Получение из фукоидана олигосахаридов и моносахаридов, включая фукозу, является востребованным в промышленности процессом. Для достижения поставленной задачи, как уже неоднократно подчеркивалось в Литературном обзоре, высоко эффективным является использование ферментов, в данном случае – фукозидаз, иммобилизованных на поверхности макропористых носителей монолитного типа. Особенно удобны в применении проточные биореакторы такие как колонки или диски, помещенные в специальные картриджи-держатели.

Однако прежде чем переходить к практическому применению, необходимо подобрать оптимальные условия проведения биокатализа: температуру, рН, скорость циркуляции субстрата через реактор, время реакции и т.д. А для этого, в свою очередь, необходимо проводить мониторинг протекающих процессов биодеструкции, например, анализируя состав реакционной смеси в различные моменты времени. В случае высокомолекулярных субстратов деструкция может протекать с образованием набора продуктов различной молекулярной массы. Разделить и идентифицировать их возможно, например, с помощью хроматографии.

В данной работе фукозу и фукоидан анализировали методом анионообменной (АО) ВЭЖХ с УФ-детектированием на длине волны 220 нм. В качестве стационарной фазы использовали коммерческие диски CIM QA с диаметром 12 мм, толщиной 3 мм, в качестве подвижной – буферные растворы, природа и состав которых позволяют влиять на прочность удержания и, соответственно, время анализа. Рабочий буферный раствор был представлен 0.02 М водным натрий-ацетатным буфером с рН 5.0 (раствор А). Элюент был выбран в связи с тем, что аналогичный буферный раствор применяется непосредственно для каталитической реакции деструкции фукоидана с участием

иммобилизованной фукозидазы. При элюировании раствором А происходит удержание компонентов смеси на поверхности стационарной фазы и их начальное разделение. Для их полной десорбции необходимо использование буфера, обладающего высокой ионной силой, достигаемой за счет добавки растворимой соли. В данной работе десорбирующий элюент представлял собой раствор 2М NaCl в элюенте А (элюент Б). Применение растворов промежуточного состава способствует лучшему разделению и элюированию веществ. По этой причине анализ проводили в условиях линейного градиентного элюирования от 0 до 100% Б за 15 минут при скорости потока 1 мл/мин.

На первом этапе необходимо было убедиться, что фукоза и фукоидан удерживаются стационарной фазой и далее десорбируются. Из теоретических представлений фукоидан как соединение с большим количеством ионогенных групп и большей молекулярной массой должен элюироваться позже фукозы, а олигомерные продукты в промежуточный период времени. Для анализа в колонку вводили растворы данных веществ с концентрацией 0.1 мг/мл в буфере А и получали соответствующие хроматограммы, по которым определяли время удерживания каждого из них. На рис. 20 представлена хроматограмма, иллюстрирующая разделение смеси фукозы и фукоидана. Как видно, пики хорошо разделяются до базовой линии и времена удерживания достаточно удалены друг от друга. Таким образом, можно заключить, что выбранная методика применима для мониторинга продуктов биодеструкции фукоидана, пики которых, наиболее вероятно, будут находится между пиками, соответствующими фукозе ( $t_R = 3.4$  мин) и фукоидану ( $t_R = 12.8$  мин).



**Рисунок 20.** Хроматограмма, иллюстрирующая разделение смеси фукозы и фукоидана.

## ВЫВОДЫ

1. Исследована возможность управления поровой структурой монолитного материала на основе сополимера ГМА-ГЭМА-ЭДМА за счет изменения состава полимеризационной смеси и условий проведения синтеза. Установлено, что оптимальная температура полимеризации составляет 65 °С, время полимеризации – 6 часов, а содержание инициатора – 0.7–1.0 масс%. Продемонстрировано влияние природы и соотношения порогенов в реакционной смеси на поровую структуру материала. Получен ряд макропористых монолитных материалов в форме стержней с требуемым размером пор, составляющим примерно 1100 нм.

2. Проведена иммобилизация фукозидазы на поверхности макропористых монолитных материалов двумя способами: прямой иммобилизацией и через высокомолекулярный спейсер. Для прямого метода иммобилизации на поверхности материалов различного дизайна (диски и стержни) получены приемлемые результаты, в то время как методика иммобилизации фукозидазы через спейсер требует дальнейшей оптимизации.

3. Исследована каталитическая активность нативной и иммобилизованной  $\alpha$ -фукозидазы и показано, что при иммобилизации фермент частично теряет свою активность, что согласуется с теоретическими представлениями. Тем не менее, после иммобилизации активность фермента составляла около 60% от исходного уровня, что, учитывая возможность многократного использования гетерогенного биокатализатора, является достаточным для практического применения.

4. Положено начало работе по исследованию возможности мониторинга ферментативного гидролиза фукоидана методом анионообменной ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования. Проведено разделение смеси фукозы (продукт полной деструкции фукоидана) и фукоидана (субстрат), представляющих собой два крайних по свойствам компонента анализируемой смеси.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харрисон, Т. Р. Лизосомные болезни накопления. В *Внутренние болезни*. Браунвальд, Е., Иссельбахер К. Дж., Петерсдорф, Р. Г., и др., пер. с англ.; Медицина: Москва, 1996, т. 8; сс 250-273.
2. Швецова С.В. Особенности действия  $\alpha$ -L-фукозидазы и сульфатазы из нового штамма мицелиального гриба *Fusarium proliferatum* LE1 в реакциях гидролиза и синтеза. Диссертация, Петербургский университет ядерной физики им. Б. П. Константинова, Санкт-Петербург, 2019.
3. Miura, T. Purification and characterization of extracellular 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase from *Bacillus cereus*. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 99(6), 629–635.
4. Sano, M. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Streptomyces* species. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(№3), 1522–1527.
5. CAZy Home Page. <http://www.cazy.org/> (accessed 1998)
6. Корнеева, О.С.; Санина, Т.В.; Кирьянова, С.В. Выбор продуцента высокоактивной фукозидазы и оптимизация условий его культивирования. *Фундаментальные исследования*. **2011**, 9, 579-582.
7. Кусайкин, М. И.; Звягинцева, Т. Н.; и др. Фукоиданы и ферменты, катализирующие их превращения. В *Фукоиданы - сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства*. Беседнова Н. Н., Звягинцева Т. Н., и др., ред. Дальнаука: Владивосток, 2014, сс 35–60.
8. Корнеева О.С. *Разработка биокаталитической технологии конверсии природных полисахаридов с использованием рекомбинантных белков и исследование функциональной активности полученных олиго- и моносахаридов*; промежуточный отчет о научно-исследовательской работе в рамках базовой части государственного задания №2295 за 2015; ВГУИТ, Воронеж, 2016.
9. Усов, А.И. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. *Успехи химии*. **2009**, 78(8), 846-862.
10. Жанаева, С.Я.; Алексеенко, Т.В.; и др. Противоопухолевая и антиметастатическая активность сульфатированного полисахарида фукоидана бурой

водоросли охотского моря *Fucus Evanescons*. *Тихоокеанский медицинский журнал*. **2009**, 3, 96-99.

11. Черенков, Д.А., Рыбаков Ю.А.; и др. Фукоза: биологическая роль, пути получения и применение. *Биотехнология*. **2010**, 6, 63-71.

12. Новикова, Ю.С.; Анохина, Е.П.; Корнеева, О.С. Выбор источника фукоидана и оптимизация его ферментативного гидролиза. *Вестник ВГУИТ*. **2015**, 2, 224-228.

13. Мещерякова, О.Л.; Новикова, Ю.С.; и др. Получение и характеристика биокатализаторов на основе иммобилизованных гликозидаз. *Вестник ВГУИТ*. **2014**, 4, 206-212.

14. Березин, И. В.; Клячко, Н. Л.; Левашов, А. В.; и др. *Иммобилизованные ферменты*. Егорова Н. С., Самуилова В. Д., ред. Высшая школа: Москва, 1987, т. 7.

15. Приворотская Е. А. Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения. Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, 2017.

16. Ожимкова, Е. В. Иммобилизованные на полимерных носителях гликозидазы – катализаторы гидролиза гетерополисахаридов. Диссертация, Москва, 2009.

17. Karav S. Recent advances in immobilization strategies for glycosidases. *Biotechnol. Prog.* **2017**. 33(1), 104–112.

18. Albertini, V.P. Performance of invertase immobilized on glass-ceramic supports in batch bioreactor. *Chem. Eng. J.* **2012**, 187, 341–350.

19. Sheffield, D. J.; Harry, T. R.; Smith A. J.; Rogers, L. J. Immobilisation of bromoperoxidase from *Corallina officinalis*. *Biotechnol. Techn.* **1994**, 8(8), 579-582.

20. Волокитина, М. В. Хроматографические реакторы нового поколения на основе макропористых сорбентов монолитного типа. Диссертация, Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, 2015.

21. Penzol, G.; Armisén, P.; Fernández-Lafuente, R.; Rodés, L.; & Guisán, J. M. Use of dextrans as long and hydrophilic spacer arms to improve the performance of immobilized proteins acting on macromolecules. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 60(4), 518–523.

22. Tennikova, T. B.; Svec, F.; & Belenkii, B. G. High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation. *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, 13(1), 63–70.

23. Vlakh, E.G. Flow-through immobilized enzyme reactors based on monoliths: I. Preparation of heterogeneous biocatalysts. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 110–127.
24. Vlakh, E. G.; Platonova, G. A.; & Tennikova, T. B. Affinity Chromatography of Proteins on Monolithic Columns. In *Protein Downstream Processing: Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods, Methods in Molecular Biology*. Humana Press: United States. 2014, cc 303-324.
25. Sinitsyna, E.S. Macroporous methacrylate-based monoliths as platforms for DNA microarrays. *Talanta*. **2012**, *93*, 139-146.
26. Svec, F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *J. Chromatogr., A*. **2010**, *1217(6)*, 902–924.
27. Svec, F.; & Frechet, J. M. J. Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of “Molded” Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis. *Chem. Mater.* **1995**, *7(4)*, 707–715.
28. Viklund, C.; Pontén, E.; Glad, B.; Irgum, K.; Hörstedt, P.; & Svec, F. “Molded” Macroporous Poly(glycidyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) Materials with Fine Controlled Porous Properties: Preparation of Monoliths Using Photoinitiated Polymerization. *Chem. Mater.* **1997**, *9(2)*, 463–471.
29. Beiler, B.; Vincze, Á.; Svec, F.; & Sáfrány, Á. Poly(2-hydroxyethyl acrylate-co-ethyleneglycol dimethacrylate) monoliths synthesized by radiation polymerization in a mold. *Polymer*. **2007**, *48(11)*, 3033–3040.
30. Arrua, R. D.; Strumia, M. C.; & Alvarez Igarzabal, C. I. Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications. *Materials*. **2009**, *2(4)*, 2429–2466.
31. Simone, P.; Pierri, G.; Foglia, P.; Gasparrini, F.; Mazzocanti, G.; Capriotti, A. L., Laganà, A; etc. Separation of intact proteins on  $\gamma$ -ray-induced polymethacrylate monolithic columns: A highly permeable stationary phase with high peak capacity for capillary high-performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2015**, *39(2)*, 264–271.
32. Svec, F.; & Frechet, J. M. J. Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers. *Macromolecules*. **1995**, *28(22)*, 7580–7582.



33. Plieva, F.; Savina, I.; Deraz, S.; Andersson, J.; Galaev, I.; & Mattiasson, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *J. Chromatogr., B.* **2004**, *807(1)*, 129–137.
34. Nguyen, A. M.; & Irgum, K. Epoxy-Based Monoliths. A Novel Hydrophilic Separation Material for Liquid Chromatography of Biomolecules. *Chem. Mater.* **2006**, *18(26)*, 6308–6315.
35. Bechtle, M.; Butté, A.; Storti, G.; & Morbidelli, M. Preparation of macroporous methacrylate-based monoliths for chromatographic applications by the Reactive Gelation Process. *Journal of Chromatography A.* **2010**, *1217(28)*, 4675–4681.
36. Rodrigues, E.; Mata V. G.; Zabka M.; Pais L. Flow and Mass Transfer. In *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*. Svec F., Tennikova T., Deyl Z., Eds; Elsevier: Amsterdam, pp 325–350.
37. Lowry, O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
38. Tsay, G. C., & Dawson, G. A sensitive spectrophotometric method for detection of l-fucose. *Anal. Biochem.* **1977**, *78(2)*, 423–427.
39. Volokitina M.V.; Nikitina A.V.; Tennikova T.B.; Korzhikova-Vlakh E.G. Immobilized enzyme reactors based on monoliths: effect of pore size and enzyme loading on biocatalytic process. *Electrophoresis.* **2017**, *38(22-23)*, 2931–2939.
40. Sinitsyna, E.S. Hydrophilic methacrylate monoliths as platforms for protein microarray. *Polymer.* **2011**, *52*, 2132–2140.