

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ И СТАБИЛИЗАЦИИ СВОЙСТВ ФИТАЗЫ

Громак М.Ю., студент 2 курса магистратуры художественно-технологического факультета

Китаева Я.В., студент 2 курса бакалавриата художественно-технологического факультета

Научный руководитель - Евдокимов Н.С., доцент, кандидат технических наук

ФГАОУ ВО "Омский Государственный Технический
Университет"

Ключевые слова: Фитаза, иммобилизованная фитаза, альгинат пропиленгликоля (ПГА), альгинат натрия (СА), фермент.

Известно об эффектах применения фитазы в качестве кормовой добавки для животных. Высокая температура гранулирования кормов, кислая среда желудка и протеолитические ферменты могут снижать активность фитазы. Иммобилизация фитазы может препятствовать действию этих факторов. В данной работе рассмотрена возможность получения композитов с иммобилизованной фитазой.

Введение. Наиболее часто используемые стратегии иммобилизации ферментов - адсорбция, инкапсуляция и сшивание или ковалентное связывание с носителями. Авторы [1] изучали загрузку фитазы на аллофановые и монтмориллонитовые наноглины. Известно о создании цеолитных биоконъюгатах фитаза-Fe-ZSM-5 на основе аффинной координации между фосфифитазой *Escherichia coli* и сайтами Fe, введенными в каркасы цеолита [2].

Захват ферментов в нерастворимые гидрогели альгината кальция признан одним из простых методов иммобилизации. Альгинат натрия (СА), из бурых водорослей - один из самых распространенных природных полисахаридов [3].

Цель. Определить направления стабилизации свойств фитазы на альгинатных гидрогелях.

Результаты исследований. Характеристики альгинатных гидрогелей можно модулировать с помощью различных многофункциональных природных полисахаридов. Растворы 4% ПГА, 3% СА и 1% ксантановой камеди (КК) (мас./об.) готовили путем индивидуального суспендирования порошка биополимера в воде путем непрерывного механического перемешивания (50 об/мин) и ультразвуковой стимуляции (400 Вт, 1 с вкл. - 1 с выкл.) на водяной бане с температурой 27°C.

Изготовление композитов, иммобилизованных фитазой. Исходный раствор фитазы готовили путем ультразвукового растворения 1г лиофилизированной фитазы в 10 мл деионизированной воды с последующей фильтрацией через мембрану 0,22 мкм при 5°C. Гомогенизацию смесей тройного биополимера СА/ПГА-КК осуществляли путем контроля температурных условий на водяной бане. Весовое соотношение полимеров СА:ПГА:КК=1,5%:(0,01-0,1%):(0,5-2,0%) в растворе 0,01 моль/л NaCl. Сначала температуру ванны поддерживали на уровне 81°C для разворачивания полимерных цепей, затем опускали до 26°C для восстановления полимера.

Реакция переэтерификации, индуцированная ПГА, для создания смесей биополимеров, иммобилизованных фитазой. Реакцию переэтерификации ПГА использовали для ковалентной иммобилизации фитазы. 2 мл исходного раствора фитазы добавляли в раствор смеси гомогенизированного тройного биополимера после инкубации в течение 30 мин. Затем реакцию инициировали, медленно капая в смеси 1 мл 1 моль/л раствора NaOH и выдерживая их при перемешивании (50 об/мин) в течение 30 мин, после чего нейтрализовали таким же количеством 1 моль/л раствора HCl.

Формирование биополимерных гидрогелей с иммобилизованной фитазой. Гидрогели формировали по каплям дозируя барботируемый раствор смеси биополимеров в раствор FeCl₃ с концентрацией 0,2 моль/л через перистальтический насос со шприцем с внутренним диаметром 2 мм.

Реакция силификации для укрепления гидрогелей, иммобилизованных фитазой. Гидрогели с иммобилизованной

фитазой погружали в раствор предшественника роста диоксида кремния для проведения реакций силификации. Раствор готовили перемешивая на вихревой мешалке при 200 об/мин в течение 5 мин, а затем доводили его pH до ~2,0 с помощью 1 моль/л раствора аммиака. Раствор перемешивали в течение 3 ч, пока среда не становилась прозрачной. Далее реакционный контейнер герметично закрывали и инкубировали при 61°C в течение ночи, синтезированные иммобилизованные фитазой композиты сушили на воздухе и сохраняли для дальнейшего изучения.

В основном ионы Ca^{2+} использовались для сшивания альгината за счет их взаимодействия с карбоксильными группами остатков L-гуллуруновой кислоты. Образование ячеистых металл-альгинатных структур может приводить к агрегации альгината и его фазовому расслоению с жидкой фазой.

При попадании в раствор ионов Fe^{3+} полученные смеси тройных биополимеров с иммобилизованной фитазой формировали шаровидные структуры. Гидрогели связывались ионами Fe^{3+} , которые выступали в качестве активных центров для стабилизации фитазы и для сродства к субстрату. Перед процессом сшивки внутри смесей образовывались микропузырьки водорода в результате восстановления карбонильных или карбоксильных групп небольшим количеством борогидрида натрия (NaBH_4). Композиты с иммобилизованной фитазой показали время потери ферментом 50% активности при термическом воздействии $11,3 \pm 0,3$ мин по сравнению с $0,188 \pm 0,002$ мин для свободной фитазы. Возможность повторного использования композитов с иммобилизованной фитазой была проверена в желудочной жидкости в течение восьми последовательных циклов катализа. Сохранение активности фитазы достигло значений ~94% после восьми циклов [4].

Выводы. Установлено, что 0,2% фитазы выщелачивалось в раствор за 24 часа. После 1, 2 и 3 месяцев хранения остаточная активность фитазы составила 95,3%, 93,1% и 92,5%. Результаты подтвердили, что полученные композиты с иммобилизованной фитазой обладают высокой устойчивостью ко внешним воздействиям и могут быть использованы в качестве добавок в животноводстве.

Библиографический список:

1. Menezes-Blackburn D, Jorquera M, Gianfreda L, Rao M, Greiner R, Garrido E, de la Luz Mora M. Activity stabilization of *Aspergillus niger* and *Escherichia coli* phytases immobilized on allophanic synthetic compounds and montmorillonite nanoclays. *Bioresour Technol.* 2011 Oct;102(20):9360-7.

2. Marina Momesso Lopes, Thamara Carvalho Coutinho, João Otávio Donizette Malafatti, Elaine Cristina Paris, Cristina Paiva de Sousa, Cristiane Sanchez Farinas, Immobilization of phytase on zeolite modified with iron(II) for use in the animal feed and food industry sectors, *Process Biochemistry*, Vol 100, 2021, 260-271, ISSN 1359-5113.

3. Семенова Е.В., Чеботок В.В., Борисовская И.В. К вопросу об использовании альгинатов из бурых водорослей в медицине и фармации // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 6. ; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29235> (дата обращения: 26.02.2024).

4. Wenzhong, Zhang Hierarchical Composites Promoting Immobilization and Stabilization of Phytase via Transesterification/Silification of Modulated Alginate Hydrogels / Zhang Wenzhong, Xu Fang // *ACS Sustainable Chemistry Engineering*. – 2015. – Т. 3, № 11. – С. 2694–2703.

**COMPOSITES BASED ON ALGINATE HYDROGELS FOR
IMMOBILIZATION AND STABILIZATION OF PHYTASE
PROPERTIES**

Gromak M.Yu., Kitaeva Ya.V.

Scientific supervisor - Evdokimov N.S.

FSAEI HE "Omsk STU"

Keywords: *Phytase, immobilized phytase, propylene glycol alginate (PHA), sodium alginate (CA), enzyme*

The article is devoted to the effects of using phytase as a feed additive for animals. The high granulation temperature of feed, the acidic environment of the stomach and proteolytic enzymes can reduce the activity of phytase. The immobilization of phytase can reduce the action of these factors. In this paper, the possibility of obtaining composites with immobilized phytase is considered.