

Използване на вакуумно метализирани ултрафилтрационни мембрани за повишаване на специфичната ензимна активност на уреаза, извлечена от соево брашно

Виолета Славова, Стойко Петров

Using vacuum metallized ultrafiltration membranes to increase the specific enzyme activity of urease derived from soybean meal :The change of the specific enzyme activity of urease enzyme extracted from soy-bean flour is investigated by using ultrafiltration polymer membranes. The polymer membranes prepared by the phase-inversion method are metallized with Fe-Cr-Ni alloy. The change in the selectivity and the output of the membranes towards urease enzyme during the process of diafiltration is examined. The diafiltration is done by using membranes metallized at three different times of film deposition, 5, 15 and 25 s, respectively.

Key words: polymer membranes vacuum metallization, diafiltration, Fe-Cr-Ni alloy.

ВЪВЕДЕНИЕ

В различните области на химията и химичната технология често се налага да се решават задачи свързани със селективното концентриране и извличане на ценни елементи или токсични вещества от многокомпонентни водни разтвори. Получените или екстрахирани белтъци и ензими се характеризират с определена активност и те на практика представляват специфични биокатализатори, определени от свойствата на изграждащите ги аминокиселини. Активността на тези продукти зависи от тяхната чистота, а тя от методите за тяхната пречистване.

Едни от най-съвременните методи за изолиране и пречистване, са мембранните методи и в частност баромембранните. Те позволяват едновременното осъществяване на процесите при нормални температури, което запазва нативната форма на биологичните продукти.

Мембранните технологии заместват класическите методи на разделяне в резултат на простото апаратурно оформление. Тези технологични процеси се осъществяват без фазови преходи и при сравнително ниски температури, при което се запазват нативните характеристики на разделяните компоненти. Енергийните разходи на този вид процеси са по-ниски около 10 пъти. Целта на изследването е да се проследи промяната на специфичната ензимна активност на ензима уреаза, извлечен от соево брашно, чрез използване на вакуумно метализирани ултрафилтрационни полимерни мембрани.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

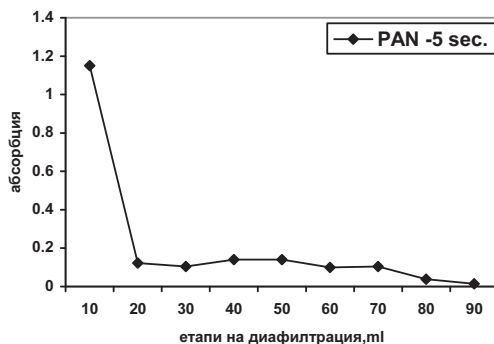
Използваните мембрани са получени в лабораторни условия по фазово-инверсионния метод. Този метод е известен като метод на Loeb [1]. Мембраната има състав: ПАН-16.25 mass%, ПММК-0.25 mass%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -1.5 g/l. Преди да бъдат подложени на вакуумна метализация използваните мембрани бяха химически модифицирани с разтвор имащ следния състав: 50 g/l $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 90 g/l K-Na-тартарат, 75 g/l NaOH [3,7]. В разтвора мембраните престояват в продължение на 24 часа.

Металните покрития са получени във вакуумна инсталация ВУР-5 /Русия/, като е разпръсвана плоска мишена от Желязо-хром-никелова /Fe-Cr-Ni/ сплав (X18H9T) с размери $\varnothing 100 \times 10\text{mm}$, при разстояние мишена /подложка $L_{M-N} = 180 \text{mm}$ и специфична мощност на разпръскване $N_p = 5,4 \text{W/cm}^2$. Извършено е магнетронно отлагане на желязо-хром-никелова сплав с начален вакуум в работната камера $P_n = 1 \cdot 10^{-3} \text{Pa}$, работна газова среда Ar с чистота 99,99% и работно налягане в камерата $P_p = 4 \cdot 10^{-2} \text{Pa}$. Използвани са три времена на отлагане на покритията: 5, 15, 25 s.

След завършване на процеса на отлагане мембраните са охладени до стайна температура във вакуумната камера в среда от Ag, след което са извадени на въздух. Мощността на постоянно токовия захранващ източник на магнетрона е 8 kW с плавно изменение на големината на тока от 0÷10 A [4,5,6].

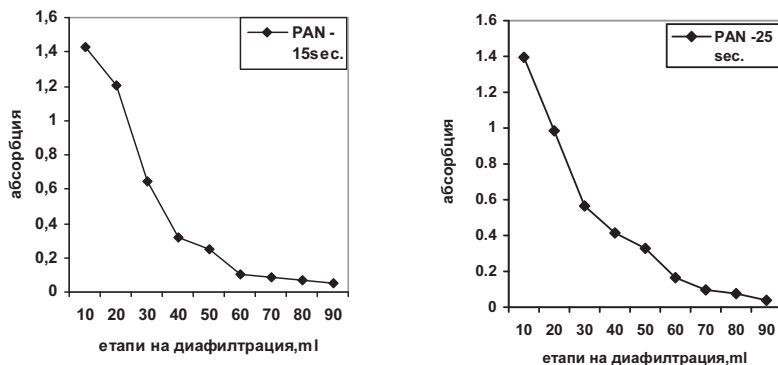
Използваният от нас разтвор за определяне на специфичната ензимна активност на сводната уреаса е получен от соево брашно /търговски продукт/. От водния разтвор на соевото брашно е изолирана уреазата чрез фракционно утаяване с ацетон.

На фиг. 1 е представена зависимостта на емисията на отделените компоненти в хода на процеса диафилтрация, при използването на мембрана с горе описания полимерен състав и време на облъчване 5 s. От графичната зависимост се вижда, че първоначално измерената екстинция при ($\lambda = 480\text{nm}$) на първия етап на процеса, през мембраната са преминали основните количества нискомолекулните компоненти, които са извлечени в процеса на естрахиране на уреазата. В следващите етапи на диафилтрация се осъществява една по-ниска степен на емисионно отделяне, което предполага повишаване на активността на уреазата. Получената крайна стойност е достатъчно показателна за това, че в последния етап на диафилтрацията във филтратата е останал само ензима уреаса. Този факт се потвърждава и от последващите ни изследвания за промяната на специфичната ензимна активност на уреазата преди и след процеса на диафилтрацията.



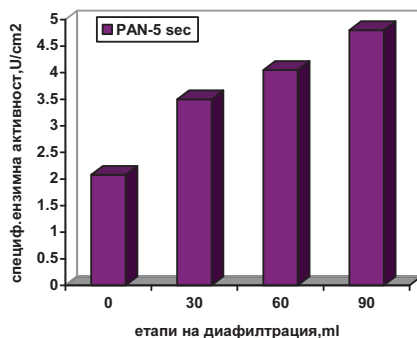
Фиг. 1. Емисия на отделени компоненти в процеса диафилтрация, използвайки мембрана вакуумно метализирана с желязо - хром - никелова сплав с време на метализация 5 s.

Същата тенденция се наблюдава и при другите два вида мембрани при времена на метализация 15 и 25 s /фиг.2/, което показва че времето на вакуумна метализация не променя общата закономерност, обусловена от процеса диафилтрация, а именно че на последния етап на процеса във филтратата имаме наличие основно на количества от ензима уреаса, което се илюстрира от стойностите на измерените екстинции. Въпреки това по-високата степен на метализация на тези мембрани води до един по-малко интензивен процес на пречистване, който се затруднява от по-плътната структура на мембраната.



Фиг. 2. Емисия на отделени компоненти в процеса диафилтрация, използвайки мембрана вакуумно метализирана с желязо- хром- никелова сплав с време на метализация с време на метализация 15 s и 25 s.

Изолирането и пречистването на ензимите е многостепенен процес, който се определя както от физикохимичните им свойства, така и от свойствата на техните източници за получаване. Основен критерии при избора на метод за пречистване на даден ензим е ниската степен на инактивиране. Не съществува универсален метод, еднакво приложимо за изолиране и пречистване на всички ензими.

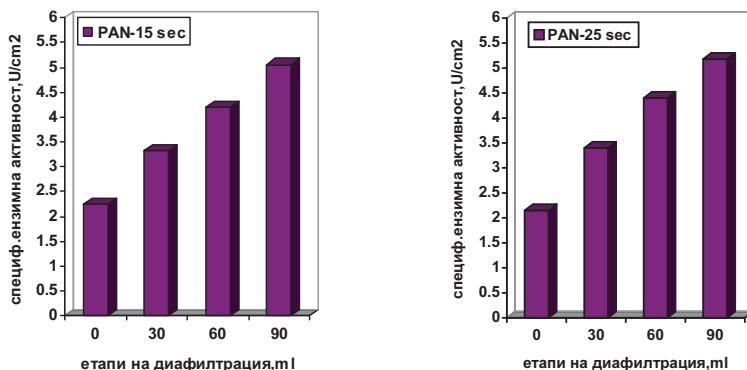


Фиг. 3. Изменение на специфичната ензимна активност на уреаза преди и след диафилтрацията, използвайки мембрана вакуумно метализирана с желязо- хром- никелова сплав с време на метализация 5 s.

С пречистването в нашия случай целим да изолираме ензима уреаза от другите ензими, неензимни белтъци и други белтъци съдържащи се в соевото брашно чрез процесите утаяване и диафилтрация. В хода на пречистването се увеличава относителният дял на ензимния белтък в общата маса на белтъка, т.е. повишава се неговата специфична активност [2].

На фиг.3 е представено изменението на специфичната ензимна активност на уреаза изолирана от разтвор на соево брашно. От графиката се вижда, че при използването на вакуумно метализираната полимерна мембрана при време на облъчване 5 s, специфичната ензимна активност на свободната уреаза преди

диафилтрацията е $2,08 \text{ U/cm}^2$, а след проведена диафилтрация тя е нарастнала почти 2 пъти достигайки стойност от $4,8 \text{ U/cm}^2$. Тези стойности за промяната на специфичната ензимна активност на уреазата достатъчно ясно показват, че в хода на диафилтрацията от разтвора на соево брашно са изолирани другите ензими и белтъци, като се е повишил относителният дял на ензимния белтък в общата маса на белтъка [196].



Фиг.4. Изменение на специфичната ензимна активност на уреаза преди и след диафилтрацията, използвайки мембрана вакуумно метализирана с желязо- хром- никелова сплав с време на метализация 15 s и 25 s.

Същата тенденция се наблюдава и при другите два вида използвани мембрани / фиг.4 /, които се различават само по времената на разпръскване на Fe-Cr-Ni сплав – 15 s и 25 s. Този факт е показателен за това, че в процеса на диафилтрация на използваната от нас система специфичната ензимна активност на уреазата се повишава до по-високи стойности, което се определя от степента на метализация на мембраните.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказана е възможността за използване на мембраните в режим на диафилтрация при концентриране и повишаване на специфичната ензимна активност на уреаза, като активността достига до $4,80 \text{ U/cm}^2$ и $5,18 \text{ U/cm}^2$, при нарастващи времена на вакумна метализация

При използваните от нас мембрани в процеса диафилтрация, извършена на няколко етапа специфичната ензимна активност на уреаза и интензитета на пречистване се определя в зависимост от степента на метализация на мембраните.

Процесът диафилтрация, на различни по състав ензими и количества съпътстващи продукти може да бъде осъществен с различни по характеристика модифицирани мембрани.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Loeb S., S. Sourirajan – Adv. Chem. Ser. 1962.
- [2] Steffen A., E. Straube Ultrafiltration membranes for chemical bonding of urese. Biotech.Bioeng.q1992,39, 725-731.
- [3] Казанова Е.М., Г.А.Китаев, С.Г.Мокрушин, Коллоид. Ж.,22,23 (1960);Изв.вузов.Хим. и хим.технол.,4,412(1961)].

[3] Кънев М., Ц. Узунов., С. Ховсемян., С. Тодорова., Д. Дочев Вакуумно метализиране.- София., Техника, 1986.

[4] Липин, Ю. В. и др. Вакуумная металлизация полимерных материалов-Москва., Химия, 1987.

[5] Орлинов, В. и др. Електронни и йонни методи и устройства за обработка и анализ на веществото.- София. Техника, 1982

[6] Славова В., Ст.Петров.,Ц.Узунов “Изследване на производителността и селективността на УФ полимерни мембрани вакуумно метализирани с хром-никел” “Известия на съюза на учените”-Сливен том 10,2006.

За контакти:

Гл. ас.д-р Виолета Славова, Технически Университет София, Факултет и Колеж Сливен, тел.0895586631, e-mail:v_slavova@mail.orbitel.bg

Докладът е рецензиран