

Caspian Corrosion Control

journal home page: <http://ccc-az.com>

POLİ-N-VİNİLPİRROLİDONUN Cu(II), Co(II) VƏ Ni(II) İONLARI İLƏ METAL-GEL BİOKOMPLEKSLƏRİNİN ALINMASI VƏ ONLARA TRİPSİNİN İMMOBİLİZASIYASININ TƏDQIQI

Ş.Z.Tapdıqov

«Neftqazəlmətdəqiqatlayihə» İnstitutu, SOCAR, Bakı, Azərbaycan

Obtaining of Metal-Gel Biocomplexes with Cu (II), Co (II) and Ni (II) Ions of Poly-N-Vinylpyrrolidone and Study of Immobilization of Thrips to Them

Sh.Z.Tapdıqov

«OilGasScientificResearchProject» Institute, SOCAR, Baku, Azerbaijan

Abstract

Metal gel complexes of Cu (II), Co (II) and Ni (II) ions of hydrogels obtained by construction of poly-N-vinylpyrrolidone (PVPr) with N, N-methylene bisacrylamide (MBAA) with average molecular weight of 10 kDa and 40 kDa were synthesized. The capacity of the obtained biologically important complexes for metal ions was determined to be 3.3-3.6 mg/g. Immobilization of trypsin in polymer-metal complexes was carried out, and for thrips of metal gel complexes, the capacity was increased by 7-8 times, the degree of immobilization by 2 times, and the specific activity of the enzyme from 38 to 92 ED/mg. It was found that triple polymer-metal-trypsin systems have greater communication resistance than polymer-trypsin binary systems, which is due to the binding of trypsin to the polymer network by metal ions. In addition, the structure of the obtained complexes was identified by IR-Fourier and UV spectroscopic methods.

Keywords:

Poly-n-vinylpyrrolidone;
Biocomplex;
Trypsin;
Immobilization.

Giriş

Son illərdə makromolekulyar kimyada müasir və perspektiv istiqamətlərdən bioloji aktiv birləşmələrin (BAB) daşınması üçün hidrogellərin alınması xüsusi yer tutur. BAB-in polimer daşıyıcılara immobilizə olunması onların formokoloji xüsusiyyətlərini yaxşılaşdırır, təsir müddətini və aktivliyini artırır, toksikliyi azaldır və hətta saxlanılma zamanı sabilliyini yüksəldir, zədələnmiş orqanlara təsir qüvvəsini çoxaldır. Fermentlərin bu tip immobilizasiyası metodun sadəliyi və son məhsulun xüsusiyyətlərinə görə digərlərindən xeyli üstünlüklərə malikdir [1].

Etilendiamin, diētilentriamin liqandları saxlayan heteroməsaməli polistirolun Co(II), Ni(II), Cu(II) və Fe(II) ionları ilə komplekslərinə pensillinamidihidrolazı fermentinin immobilizasiya olunması prosesi öyrənilmiş [2], müəyyən edilmişdir ki, metal ionu immobilizə olunan fermentin miqdarını artırmaqla bərabər onun sabilliyinə də müsbət təsir göstərir. Digər bir işdə [3] xitozan-silikagel makroməsaməli gel ilə Cu(II) ionun kompleksinə tripsinin

immobilizasiyası tədqiq edilmiş, bir həftə ərzində 4 °C-də tripsinin 80% aktivliyinin saxlanılması müəyyən olunmuşdur.

Qlutaraldehyd ilə modifikasiya olunmuş silikagel və seolit üzərinə tripsinin immobilizasiyası aparılmışdır [4]. Immobilizasiyadan sonra fermentin miqdarı ilkin matrisalar ilə müqayisə olunmuşdur. Göstərilmişdir ki, sərbəst silikagel və seolit üzərinə immobilizasiya olunan tripsinin miqdarı uyğun olaraq 17.2 və 11.5 mq/qr təşkil edir. Qlutaraldehyd ilə modifikasiya olunmuş silikageldə isə immobilizasiya olunan fermentin miqdarı uyğun olaraq 39.1 və 36.4 mq/qr təşkil edir [5].

PVPr-nu və təbii polisaxarid olan albalı mənşəli arabinoqalaktana N-vinilpirrolidonu calaq etməklə alınan calaq sopolimeri MBAA ilə tikməklə geləmələgətirmə xassəsinə malik hidrogellər sintez olunmuşdur [6]. Alınan nümunələrə tripsinin immobilizasiyası aparılmış, müəyyən olunmuşdur ki, tripsinin daşınması üçün arabinoqalaktan daha əlverişlidir. Arabinoqalaktan əsaslı daşıyıcıya immobilizə olunan tripsinin miqdarı 1.2 mq/qr təşkil edir. pH 8-də immobilizə olunan tripsinin 40 saat ərzində məhlula ayrılması ~98% təşkil edir.

Bu sahədə çoxlu sayda elmi-tədqiqat işlərinin

E-mail: shamo.chem.az@gmail.com

aparılmasına baxmayaraq hələ də BAB-in daşınması üçün yeni növ polimer hidrogellərin sintez olunması aktual problem kimi qalmaqdadır. Bu məqsədlə tədqiqat işində aşağı molekulyar kütləli PVPr əsasında alınan hidrogellərin Co(II), Ni(II) və Cu(II) komplekslərinə tripsinin immobilizasiyası tədqiq olunmuşdur. İmmobilizasiya olunan fermentin pH-ın təsirindən məhlula ayrılması, fermentin təsir müddətinin artırılması, bununla yanaşı alınan komplekslərin quruluşu İQ-Furye və UB spektroskopik üsullarla öyrənilmişdir.

Təcrübi hissə

İşdə orta molekulyar kütləsi (M_n) 10 və 40 kDa olan PVPr məlum metodika [8] üzrə sintez olunmuşdur. M_n viskozimetrik üsulla təyin olunmuşdur (həlləddici H_2O , $t=20\text{ }^{\circ}C$). Tikici reagent kimi klassifikasiyası «kimyəvi təmiz» (k.t) olan MBAA (Sigma) götürülmüşdür. PVPr-nun MBAD vasitəsi ilə tikilməsi civə-kvars lampasından (PRK-4) mənbə kimi istifadə etməklə 8 saat müddətində $35-40\text{ }^{\circ}C$ -də ultrabənövşəyi şüa təsiri ilə aparılmışdır.

Mühitin turşuluğunu sabit saxlamaq üçün standart titrli fiksantlardan istifadə olunmuşdur: $0.05\text{ M KH}_2\text{C}_4\text{O}_3 \times 2H_2O$ (pH 1.68), 0.01 N HCl (pH 2), $KC_4H_5O_6$ (pH 4.01), $1\text{ N CH}_3\text{COOH}$ və 1 N NaOH (pH 6.7) H_3BO_3 və 0.1 N HCl (pH 8.27 və 7.4), H_3BO_3 və 0.1 N NaOH (pH 9.4, 10.5 və 11). Mühitin pH-ı WATER QUALITY Cheeker V-10 cihazı ilə (Japan) ölçülmüşdür.

Alınmış PVPr əsaslı hidrogellərin Co(II), Ni(II) və Cu(II) ionları ilə komplekslərinin alınması və sorbsiya tutumlarının müəyyən edilməsi [9] işində tədqiq olunmuşdur.

Tripsin (Biofarma) Ukraniya istehsalıdır. Məhlulda tripsinin qatılığı Specord UV-VIS cihazında (Carl Zeiss) 280 nm -də standart qatılıqlı tripsin məhlullarının (tripsinin molyar işıq udma əmsalı $E_{1\%}^{1\text{cm}}=14$) optiki sıxlıqları təyin olunmuş, dərəcəli qrafik qurulmuşdur (şəkil.1). Fermentin küvetdə qatılığı $C=1.1 \times 10^{-6}\text{ M}$ təşkil

edir. Tripsinin molekulyar çəkisi 21.000 -dir. 224 amin turşu qalıqlarından ibarətdir. 6 disulfid körpüsü var. Katalitik aktivliyi pH 7.8 və 8.0 -dir. Aktiv mərkəzləri Serin-195, Qistidin-97, Aspargin-102-dir. Sorbsiya hissəsi Aspargin 189 -dur. Turş mühitdə davamlıdır. Suda yaxşı həll olur [7].

Fermentin immobilizasiyası aşağıdakı metodikaya uyğun aparılmışdır. Belə ki, hidrogel nümunələri sabit çəkiyə qədər qurudulmuş, xırdalanmış, ələkdən keçirilmiş, immobilizasiya üçün 0.02 mm fraksiyadan istifadə edilmişdir. 0.1 qr hidrogel və onların metal-polimer nümunələrinin üzərinə 5 ml tripsinin 0.001 N HCl məhlulu əlavə edilib, otaq temperaturunda, 24 saat müddətində qarışdırılmaqla aparılmışdır. Fermentin daşıyıcıya immobilizə olunan miqdarı M (mq) və M_f (mq/qr) aşağıdakı ifadələrə əsasən təyin olunur:

$$M = (C_0 - C_t) \times V_i ; \quad M_f = \frac{(C_0 - C_t)}{g} \times V_i$$

Burada:

C_0 – ferment məhlulunun ilkin qatılığı, mq/l;

C_t – immobilizasiyadan sonra məhluldakı

fermentin tarazlıq qatılığı, mq/l;

V_i – immobilizasiya gedən məhlulun həcmi, ml;

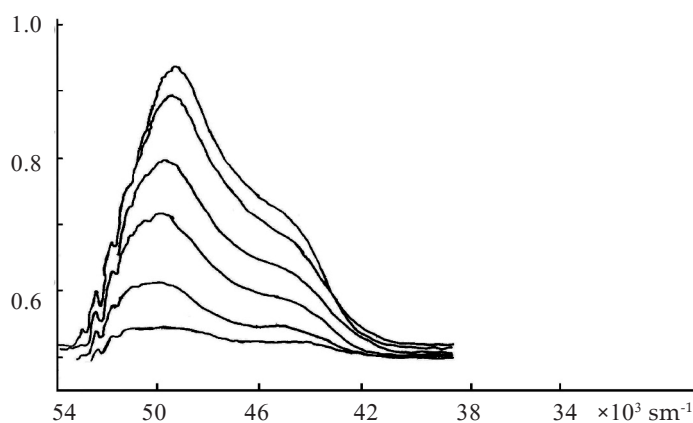
g – daşıyıcının kütləsi, qr

İmmobilizə olunmuş tripsinin pH-ın təsirindən məhlula ayrılmasını öyrənmək üçün ferment immobilizə olunmuş nümunələr, həcmi 20 ml olan şüşə qaba tökülmüş və üzərinə 5 ml bufer məhlulu əlavə edilmiş, 24 saat ərzində məhlula keçən tripsinin optiki sıxlığını ölçməklə qatılığının dəyişməsi tədqiq olunmuşdur.

Daşıyıcıya fermentin immobilizə olunma dərəcəsi R (%) və mühitin pH-ın təsirindən məhlula ayrılmanın miqdarı D (%) aşağıdakı ifadələrə əsasən hesablanır:

$$= \frac{(C - C_t)}{C} \times 100 ; \quad D = \frac{C_t \times V_i}{10 \times M_{\max}}$$

$M_{\max}$ – hər bir daşıyıcıya immobilizə olunan fermentin maksimum miqdarı, mq.



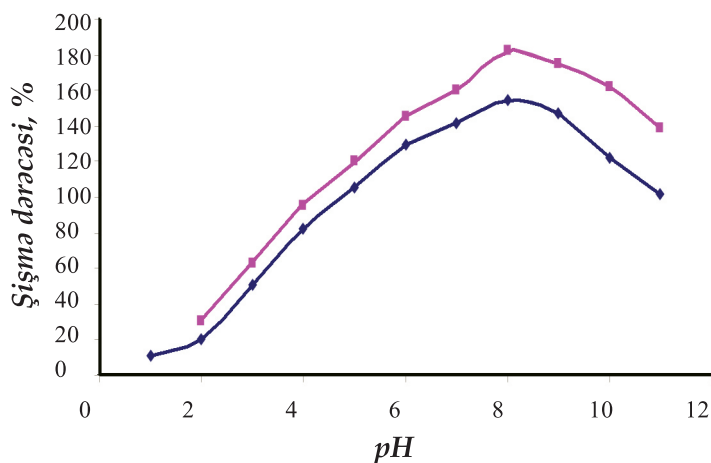
C_{tripsin} mq/l	A, Optiki sıxlıq
40	0.870
32	0.780
24	0.587
18	0.440
8	0.220
4	0.090
2	0.041
1	0.020

Şəkil 1. Standart qatılıqlı tripsin məhlullarının UB spektri və onların uyğun optiki sıxlıqlarının qiyməti

Alınan hidrogellərin və polimer-Me(II)-ferment komplekslərinin quruluşu $1000-4000 \text{ sm}^{-1}$ oblastda İQ-Furye (Varian) və UB spektroskopik üsullarla identifikasiya edilmişdir.

Nəticələr və onların müzakirəsi

Hidrogellərə immobilizə olunan BAB-nin daşıyıcıdan hansı sürətlə ayrılması qarşıya qoyulan əsas məsələlərdən biridir. Həmçinin BAB-in ayrılma sürətini tənzimləmək üçün bir sıra şərtlərin məs. hidrogelin şişmə dərəcəsini, mühitin pH-nı, temperaturu və yaxud kimyəvi tərkibi dəyişməklə BAB-nin ayrılma sürətini tənzimləmək olar. Bu baxımdan tədqiq olunan işdə PVPr-nun həm homopolimerinə, həm də PVPr-Me(II) komplekslərinə tripsinin immobilizasiya edilməsi üçün orta molekulyar kütləsi $M_n=10$ və 40 kDa olan PVPr-nun 10% MBAA ilə tikilməsindən alınan hidrogellərin şişmə dərəcəsinin pH-dan asılılığı öyrənilmiş və nəticələr şəkil 2-də verilmişdir.



Şəkil 2. PVPr əsaslı hidrogelin şişmə dərəcəsinin pH-dan asılılığı, $\blacklozenge$ - $M_n = 10 \text{ kDa}$; $\blacksquare$ - $M_n = 40 \text{ kDa}$

Orta molekulyar kütləsi 40 kDa olan PVPr-nun metal komplekslərinə tripsinin immobilizasiyasına aid bəzi parametrlərin ətraflı qiymətləri cədvəl 1-də göstərilmişdir.

Cədvəl 1-dən göründüyü kimi PVPr əsaslı hidrogelin metal ionları ilə kompleksləri, tərkiblərində metal ionlarının miqdarının az olması ilə seçilir. Bu miqdar, Cu(II), Co(II) və

Ni(II) ionlarının bioloji vacib mikroelement kimi tibbi tətbiqində əlverişlidir. Hər üç metal ionunun vasitəsilə immobilizə olunan tripsinin miqdarının tərkibində metal ionları olmayan hidrogel ilə müqayisədə artması müşahidə olunur. Mis ionunun iştirakı ilə hidrogelin tutumunun və immobilizə dərəcəsinin digər metal ionları ilə müqayisədə artması baş verir. Bu metal ionunun təbiəti, ion radiusu və elektron konfigurasiyası ilə əlaqədardır. Məsələn, mis ionlarının iştirakı ilə tripsinin immobilizə dərəcəsi eyni miqdar hidrogel ilə müqayisədə 50% artıq olur. Metal ionlarının iştirakı immobilizə olunan tripsinin aktivliyinin və aktivliyinin saxlanılma dərəcəsinin də artması baş verir. PVPr əsaslı gellərə tripsinin immobilizə olunması makromolekulun karbonil qrupunun oksigen atomu ilə ferment makromolekulundakı peptid qrupları ilə, həmçinin zülal makromolekulunda olan sərbəst amin qrupları arasında qarşılıqlı təsir nəticəsində hidrogen rabitəsinin yaranması

hesabına baş verir. Metal ionlarının immobilizasiyada rolu immobilizə dərəcəsinin artırmaqla bərabər, metalgel-tripsin kompleksinin davamlılığının artmasına səbəb olur [10]. Bu da öz növbəsində daşıyıcıdakı fermentin qeyd olunan göstəricilərinin yüksəlməsinə gətirib çıxarır. Məlumdur ki, qanda Cu(II)-n qatılığı 0.001 mq/l , Co(II)-n gündəlik qəbulu $7-15 \text{ mkq}$ və Ni(II)-nin orqanizmdə miqdarı $5-13.5 \text{ mq}$ təşkil edir. Bu həmçinin Co(II), Ni(II) və Cu(II) ionlarının bioloji vacib mikroelement kimi də tibbdə istifadəsində əlverişlidir. Tədqiq olunmuşdur ki, hər üç metal ionu vasitəsilə immobilizə olunan tripsinin miqdarının artması ilk növbədə metal ionlarının iştirakı ilə əlaqədardır. Gel ilə ferment makromolekulu arasında körpü rolunu oynayan metal ionu ferment ilə daha güclü elektrostatik qarşılıqlı təsirdə

olur. Müəyyən olunmuşdur ki, zaman fermentin immobilizə olunmasının az bir hissəsi metal ionlarının iştirakı olmadan, daha çox hissəsi isə metal ionlarının vasitəsi ilə baş verir.

Nəticələrə əsasən hər iki gelə immobilizə olunan tripsinin miqdarı uyğun olaraq 0.2 və 0.45 mq/q təşkil edir (cədv.2) və tripsinin immobilizə olunması üçün doyma tarazlığı təqribən 580 dəqiqədən sonra

Cədvəl 1

PVPr4T əsaslı daşıyıcının metal ionlarına görə xarakteristikası və immobilizə olunmuş tripsinin miqdarı göstəriciləri. $C_{\text{tripsin}} = 40 \text{ mq/l}$, $V_i = 5 \text{ ml}$, $T = 20^\circ \text{C}$, $t = 24 \text{ saat}$

Metal ionu	Me(II), mmol/q	Me(II), %-lə	C_{tripsin} , mq/l	$\Delta C_{\text{tripsin}}$, mq/l	M_{Fr} , mq	M , mq/q	i_{Fr} , %
Cu (II)	0.58	0.37	22.00	18.0	0.360	3.60	72.35
Co (II)	0.52	0.30	23.50	16.5	0.330	3.30	66.70
Ni (II)	0.54	0.35	22.80	17.2	0.344	3.44	68.80

Cədvəl 2

Təbii və sintetik əsaslı hidrogellər, eləcə də PVPr-nun orta molekul kütləsinin və metal ionunu təbiətinin tripsinin immobilizə olunma miqdarına təsirinin nəticələri*

Daşıyıcı-hidrogel	Fermentin miqdarı, mq/q	İmmobilizə dərəcəsi, %	İOTSA, ED/mq	S, %	Nisbi aktivlik, %
PVPr 10 kDa, 10% MBAA	0.20	10.00	38	5.24	9.44
PVPr 40 kDa, 10% MBAA	0.45	22.50	51	7.42	11.68
PVPr 40 kDa, 10%(t)-Cu(II)	3.60	72.35	92	12.8	20.60
PVPr 40 kDa, 10%(t)-Co(II)	3.30	66.70	76	9.40	15.36
PVPr 40 kDa, 10%(t)-Ni(II)	3.44	68.80	85	10.60	17.58

* – reaksiya müddəti 24 saat, sərbəst tripsinin aktivliyi 5.50 ED/mq

baş verir. Başqa sözlə polimerin orta molekul kütləsi artdıqca immobilizə olunan tripsinin miqdarı da artır. Bu makromolekul zəncirinin uzunluğunun və tikilmiş polimerdəki məsələlərin ölçülərinin böyüməsi ilə əlaqədardır [11].

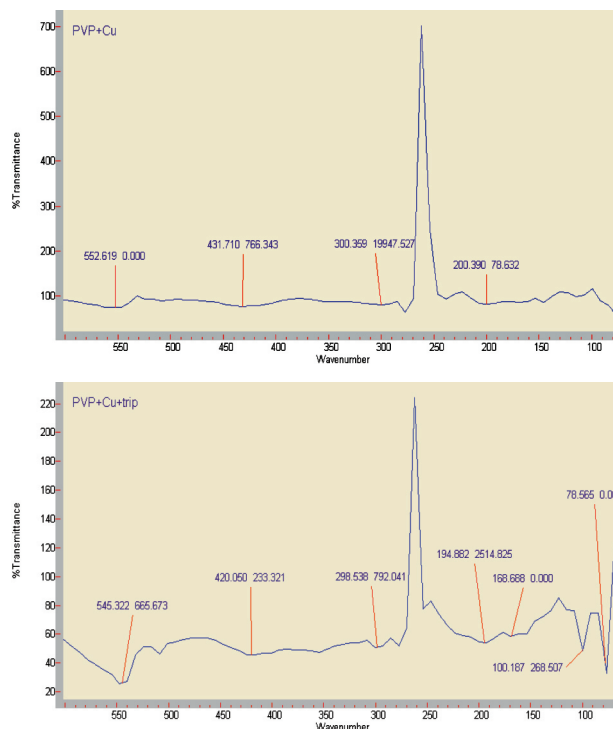
Təbii və sintetik əsaslı gellərə və poli-N-vinilpirrolidonun metal gelkomplekslərinə immobilizə olunmuş tripsinin bəzi göstəriciləri eksperimental olaraq müəyyən edilmiş və təcrübi nəticələr 2-ci cədvəldə verilmişdir.

Burada, İOTSA-immobilizə olunmuş tripsinin spesifik aktivliyi, S-aktivliyinin saxlanılma dərəcəsidir. Cədvəl 2-dən göründüyü kimi orta molekul kütləsinin kiçik olduğu gel nümunələrində immobilizə olunan fermentin miqdarında yaxın qiymətlər müşahidə olunur. Bu onu göstərir ki, eyni bir homopolimerdən istifadə etdikdə orta molekul kütləsinin yaxın qiymətləri fermentin immobilizasiya göstəricilərində kəskin fərq yaratmır. Lakin cüzi də olsa onun bioloji aktivliyinə təsir edir. Lakin orta molekul kütləsi 40 kDa olan PVPr əsaslı metal-gel komplekslərdə isə immobilizə olunan fermentin miqdarı, aktivliyi və davamlılığı metal ionu olmayan gel ilə müqayisədə dəfələrlə artır. Başqa sözlə metal ionu fermentin immobilizə dərəcəsinə artırmaqla yanaşı onun bioloji aktivliyinin də yüksəlməsinə səbəb olur ki, bu da bu da gel tərkibində fermentin metal ionu ilə davamlı əlaqədə olmasının təzahürüdür [12].

Hər 3 metal ionun vasitəsilə immobilizasiya olunan tripsinin miqdarının artması müşahidə olunub. Məlumdur ki, PVPr-nun pirrolidon həlqəsindəki $>C=O$ qrupu sulu məhlulda $C=O \cdots (H_2O)_n$ formasında 1655 və 1625 cm^{-1} oblastında max udma verir. PVPr-nun Me(II) ionları ilə kompleksi $[CuCl_2 \cdot 2L]_n$ quruluşunda 1670 cm^{-1} oblastına sürüşmə verir [13], yəni koordinasiya karbonil qrupu iştirak edir. Pirrolidon həlqəsindəki üçlü N atomunun spektrində isə heç bir dəyişiklik baş vermir. Amin turşu qalıqlarından ibarət olan tripsinin 189-cu aspargin turşusundakı $-NH_2$ qrupu immobilizasiyada iştirak edir. Koordinasion immobilizasiyanın kiçik bir hissəsi isə tripsin

makromolekulunun lokal oblastlarında yaranan yük artıqlığının metal ionları ilə əlavə koordinasiyasının yaranması hesabına baş verir. Bu zaman məsələn mis ionu 2-li koordinasiya halından 6-lı koordinasiya halına keçir. Nəticədə fermentin metal ionu ilə qarşılıqlı təsirinin qüvvətlənməsi baş verir. Bunu model olaraq PVP-Cu(II) kompleksinə tripsin immobilizə olunmuş sistemdə İQ spektroskopiyaya ilə öyrənilmişdir. PVP-Cu(II) kompleksinə uyğun zolağın 1670 cm^{-1} oblastından yenidən sərbəst hidrogel üçün xarakterik olan zolağa – 1655 cm^{-1} keçməsilə spektrdə baş verən dəyişikliklər bunun aydın izahını verir [14].

Tripsinin PVPr əsaslı hidrogelə immobilizasiyanı daha ətraflı öyrənmək üçün nümunələrin 500-600 cm^{-1} oblastında İQ-Furje spektrləri çəkilmişdir (şək.3). PVPr əsaslı



Şəkil 3. PVP-Cu(II) kompleksinin və PVP-Cu(II)-Tripsin üçlü kompleksin 600-50 cm^{-1} oblastında İQ Furje spektri

hidrogelin İQ-Furye spektrində aşağıdakı udma zolaqları müşahidə olunur: 3415, 2955, 2130, 1655, 1291, 931, 648, 576 sm^{-1} . Onun Cu(II) ilə kompleksində isə 3419, 2132, 1659, 941, 658 sm^{-1} zolaqları müəyyən olunur. Tripsinin immobilizasiyasından sonra isə spektrin xarakterik zolaqlarındakı dəyişikliklər belədir: 3410, 2137, 1655, 1228, 1020, 651, 573 sm^{-1} .

PVPr-nin Cu(II) ilə kompleksində 553, 431, 300, 200 sm^{-1} udma zolaqları müşahidə olunur. Ferment makromolekulu ilə əmələ gələn kompleksdə isə yuxarıdakı udma zolaqlarında qısa dalğa oblastına sürüşmə baş verir: 545, 420, 298, 194 sm^{-1} . Üçlü kompleksdə 168, 100 və 78 sm^{-1} oblastlarında yeni udma zolaqları əmələ gəlir [15].

Kompleksəmələgəlməni həmçinin PVPr-nun müxtəlif pH-larda, model olaraq PVPr-nun sulu məhlulunda Cu(II), Co(II), Ni(II) komplekslərinin və onların tripsin ilə üçlü komplekslərinin UB spektrlərinin tədqiqində öyrənilmişdir. Komplekslərin və müqayisə üçün PVPr-nun müxtəlif pH-larda λ_{max} -nın qiymətləri cədvəl 3-də verilmişdir.

UB spektroskopik tədqiqatın nəticələrindən görünür ki, PVPr-nun müxtəlif pH-larda maksimum dalğa uzunluqları müəyyən sürüşmələrlə xarakterizə olunur. Bu polimerdəki karbonil qrupu ətrafında istər su molekullarının, istərsədə bufer sistemi əmələ gətirən molekulların hidrogen rabitəsi və ya elektrostatik qarşılıqlı təsir qüvvələri hesabına müxtəlif assosiatlar şəklində kompleks əmələgətirməsi ilə əlaqədardır. Müəyyən olunmuşdur ki, PVP-nin metal ionları ilə komplekslərinin əmələgəlməsi pikin intensivliyinin (udulmanın)

azalması – hipoxrom və böyük dalğa uzunluğu tərəfə sürüşmə - batoxrom effektlə müşahidə olunur. Metal-polimer komplekslərin tripsin ilə komplekslərinin əmələgəlməsi zamanı isə udulmanın artması – hiperxrom və qısa dalğa uzunluğu tərəfə sürüşmə - hipsoxrom effektlə müşahidə olunur. Digər tərəfdən spektrdən aydın görünür ki, kompleksəmələgəlmə 4200 – 3400 sm^{-1} aralığında, λ -nın 240-300 nm oblastında da baş verir [16].

Məlumdur ki, fermentlərin immobilizasiyasından sonra əsas məqsəd onların müəyyən şəraitdə daşıyıcıdan ayrılmasının tədqiqidir. Bu faktorlar arasında önəmli olan mühitin turşuluğudur. Çünki insan orqanizmdə və yaxud istənilən biokatalitik, fermentativ reaksiya pH-ın konkret qiymətində baş verir. Bu baxımdan PVPr əsaslı hidrogel və onun metal komplekslərinə immobilizasiya olunmuş tripsinin pH-ın müxtəlif göstəricilərində yenidən məhlula ayrılmasının nəticələri öyrənilmiş və nəticələr cədvəl 4-də verilmişdir.

Müəyyən olunmuşdur ki, metalpolimer komplekslərə immobilizə olunmuş tripsinin məhlula ayrılmasına pH-ın təsiri, metal olmayan daşıyıcı ilə müqayisə etdikdə tamamilə fərqlidir. Göründüyü kimi orta molekul kütləsi 10 və 40 kDa olan PVPr əsaslı hidrogellərdən tripsinin ayrılması pH artıqca artır. Buna səbəb pH artıqca hidrogelin şişmə dərəcəsinin artmasıdır. Nəticədə hidrogelin məsamələrinə zəif absorbsiya olunan tripsinin daşıyıcı ilə qarşılıqlı təsiri zəifləyir. Qeyd edək ki, bu tip fiziki immobilizasiyalar hidrogen rabitəsi, səth qüvvələri, Vander-Vaals, hidrofob və zəif elektrostatik qarşılıqlı təsir hesabına baş verir. Bu sistemdə tripsinin immobilizasiyası

Cədvəl 3

PVPr, onun müxtəlif pH-larda, metal ionları və tripsin ilə komplekslərinin λ_{max} -ın qiymətləri. L küvet=1 sm, $C_{\text{PVPr}}=1.2 \times 10^{-4}$ qr/L, $C_{\text{Me(II)}} \approx 0.6$ mM, $C_{\text{tripsin}}=1.1 \times 10^{-6}$ M

Nümunələr	λ_{max} nm	Nümunələr	λ_{max} nm	Nümunələr	λ_{max} nm
PVPr	205.5	Tripsin	204	PVPr-Co(II)	206.2
PVPr-pH 1.68	207	PVPr-Trp-pH 6.7	205	PVPr-Co(II)-Trp-pH3.56	206
PVPr-pH 3.56	205.3	PVPr-Trp-pH 7.4	205.5	PVPr-Co(II)-Trp-pH4.01	205
PVPr-pH 4.01	206.7	PVPr-Trp-pH 8.2	205.5	PVPr-Co(II)-Trp-pH5.5	208
PVPr-pH 5.5	206	PVPr-Trp-pH 9.4	205.7	PVPr-Co(II)-Trp-pH6.7	207
PVPr-pH 6.7	205.6	PVPr-Trp-pH 10.5	205.5	PVPr-Co(II)-Trp-pH7.4	206
PVPr-pH 7.4	206.7	PVPr-Trp-pH 11	205.8	PVPr-Co(II)-Trp-pH8.2	207
PVPr-pH 8.2	205.4	PVPr-Cu(II)	207	PVPr-Ni(II)	207
PVPr-pH 9.4	205.3	PVPr-Cu(II)-Trp-pH3.566	206.5	PVPr-Ni(II)-Trp-pH3.56	206.3
PVPr-pH 10.5	205.3	PVPr-Cu(II)-Trp-pH4.01	205.6	PVPr-Ni(II)-Trp-pH4.01	205
PVPr-pH 11	205	PVPr-Cu(II)-Trp-pH5.5	207.8	PVPr-Ni(II)-Trp-pH5.5	204.6
PVPr-Trp-pH 3.56	207.7	PVPr-Cu(II)-Trp-pH6.7	206.7	PVPr-Ni(II)-Trp-pH6.7	205
PVPr-Trp-pH 4.01	206.7	PVPr-Cu(II)-Trp-pH7.4	206	PVPr-Ni(II)-Trp-pH7.4	205.3
PVPr-Trp-pH 5.5	204.8	PVPr-Cu(II)-Trp-pH8.2	206.6	PVPr-Ni(II)-Trp-pH8.2	205.7

Cədvəl 4

PVP əsaslı daşıyıcılara immobilizə olunmuş tripsinin məhlulda ayrılmasının pH-dan asılılıq nəticələri. $V_{\text{bufer}}=5 \text{ ml}$, $m_{\text{daşı+tripsin}}=0.1 \text{ qr}$, $T=293 \text{ K}$, $t=24 \text{ saat}$

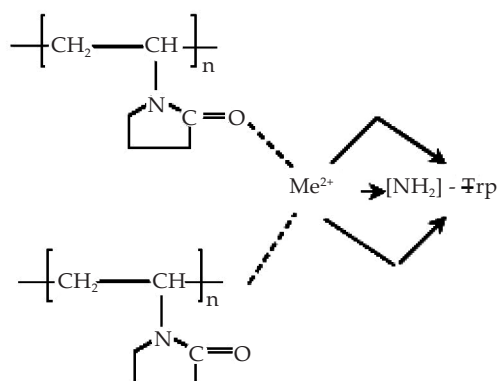
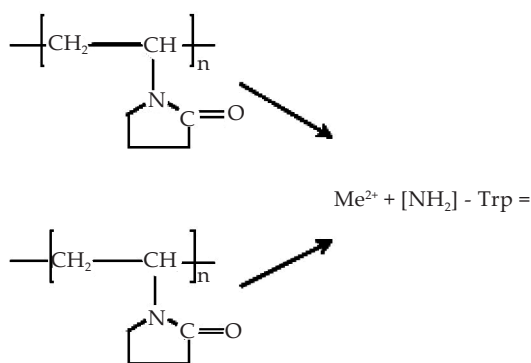
pH	PVPPr $M_n=10 \text{ kDa}$			PVPPr $M_n=40 \text{ kDa}$			PVPPr-Cu(II) $M_n=40 \text{ kDa}$			PVPPr-Co(II) $M_n=40 \text{ kDa}$			PVPPr-Ni(II) $M_n=40 \text{ kDa}$		
	Ct, mq/l	m, mq	D, %	Ct, mq/l	m, mq	D, %	Ct, mq/l	m, mq	D, %	Ct, mq/l	m, mq	D, %	Ct, mq/l	m, mq	D, %
1	0.41	0.002	10.25	1.80	0.009	20.00	14.6	0.290	80.55	14.70	0.294	89.09	14.40	0.288	83.72
2	0.67	0.0034	16.75	2.60	0.013	28.89	14.2	0.284	78.89	13.80	0.276	83.64	12.60	0.252	73.26
3	0.80	0.004	20.00	3.70	0.0185	41.12	14.0	0.280	77.78	13.50	0.270	81.82	11.50	0.230	66.75
4	1.00	0.005	25.00	4.20	0.021	46.67	12.0	0.240	66.67	11.00	0.220	66.67	8.60	0.172	50.00
5	1.20	0.006	30.00	4.40	0.022	48.89	9.50	0.190	52.78	8.25	0.165	50.0	6.70	0.134	38.95
6	2.00	0.01	50.00	6.00	0.030	66.67	6.50	0.130	36.12	6.00	0.120	36.36	4.50	0.09	26.16
7	3.20	0.016	80.00	7.00	0.035	77.78	4.00	0.08	22.23	3.50	0.07	21.21	3.00	0.06	17.44
8	3.80	0.019	95.00	8.40	0.042	93.34	2.50	0.05	13.89	2.00	0.04	12.12	2.25	0.045	13.08
9	1.80	0.009	45.00	7.60	0.038	84.45	1.00	0.02	5.56	1.00	0.02	6.06	1.05	0.021	6.10

hidrogen rabitəsi və elektrostatik qüvvələrin təsirlə gedir. pH-ın artması nəticəsində Tripsin- $[\text{NH}_3]^+\text{Cl}^-$ formasında olan azotun müsbətliyinin mühitin OH^- ionları ilə neytrallaşması baş verir. Nəticədə tripsinin yüksüzləşməsi və elektrostatik qarşılıqlı təsirin azalması baş verir. Tripsinin immobilizasiyası onun yüklənmiş formasında baş verdiyindən, yük neytrallaşdıqdan sonra artıq rabitə zəifləyir. Nəticədə tripsin daşıyıcıdan ayrılır.

Metal ionu olan daşıyıcılardan tripsinin ayrılmasına pH-ın təsiri isə tam əksinədir. Görünür ki, pH artıqca tripsinin ayrılma %-i aşağı düşür. pH-ın aşağı qiymətlərində tripsinin daşıyıcıdan 80-90% ayrılmasının səbəbi metal ionlarının desorbsiyası ilə əlaqədardır. pH-ın 7-8 qiymətlərində metal ionları ilə PVPPr-nun kompleksi dayanıqlıq sabitinin daha yüksək qiyməti ilə xarakterizə olunduğundan üçlü kompleks də stabil olur. Bu bir daha metal ionlarının kompleksməgəlmədə körpü rolunu

oynağını sübut edir. Metal ionunun iştirakı ilə immobilizasiyanın sxemini aşağıdakı kimi təsvir etmək olar və ədəbiyyat materialları ilə üst-üstə düşür [13].

Beləliklə tikilmiş PVPPr hidrogelinə və onun Cu(II), Co(II) və Ni(II) komplekslərinə immobilizə olunmuş tripsin sərbəst tripsinə nisbətən daha davamlıdır. Metal-polimer əsaslı daşıyıcılara immobilizə olunan tripsinin pH-ın 6-8 qiymətlərində davamlı kompleks əmələgətirməsi onun heterogen sistemlərdə, biofermentativ reaksiyalarda tətbiqinə əsas yaradır. Çünki tripsin makromolekulunun hidrolizdə iştirak etməyən funksional qrupu ilə immobilizasiyası aparılır, aktiv mərkəzlər isə sərbəstdir. Bu formada fermenti uzun müddət fermentativ katalizdə zülalların hidrolizi üçün işlətmək olar. PVPPr əsaslı olduqda isə aşağı pH-larda tripsinin sürətlə məhlulda ayrılması onun təsir müddətini azaltmaqla yanaşı, makromolekulun dağılmasına səbəb olur.



Литература

1. В.В.Коршак, М.И.Штильман. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1984, 34 с.
2. И.А.Ямсков, М.В.Буданов, В.А.Даванков. // Биоорганическая Химия. Том 6. №9. 1980. с.1404-1409.
3. Jianmin Wu, Mingming Luan, Jiayin Zhao // International Journal of Biological Macromolecules, Volume 39, Issues 4-5, November 2006, pages 185-191
4. Ф.П.Сидельковская. Химия N-винилпирролидона и его полимеров. М.: Наука. 1970. 73. 93-94.с
5. Ş.Z.Tapdıqov, N.A.Zeynalov, N.Y.Melnikova, İ.D.Əhmədov, Z.M.Əliyeva. //Azərbaycan Kimya Jurnalı, №1, 2010,
6. Л.И.Валуев, Т.А.Валуева, Н.А.Платэ и др. // Успехи биологической химии, т.43, 2003, с:308-309
7. C.Rocha, L.Ducso, M.P.Gonçalves, J.A.Teixeira //2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, ENPROMER, Costa Verde RJ, Brazil, 2005
8. N.A.Zeynalov, Ş.Z.Tapdıqov, İ.D.Əhmədov və başq. // Azərb. Kimya Jurnalı, 2-2009, s 39-44
9. Nagano R., Nakasone T., Yamada K., M.Hirata //J. Nippon Kagakkai Koen Yokoshu, Vol.76, №.1, page. 609,(1999)
10. Reynaldo V., Alex F., Roberto C., Pedro D. O., Maria L. V. //Supramolecular Chemistry, Volume 17, Issue 5 July 2005 , pages 387 - 391
11. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В. и др. Иммобилизованные ферменты. - М.: Высшая школа. 1987. -159 с.
12. Ş.Z.Tapdıqov// AMEA Aspirantların Elmi Konfransının Materialları, Bakı, iyun 2009, s.188-190
13. А.Д.Помогайло.«Полимерные иммобилизованные металлокомплексные катализаторы» М.Наука, 1988, с.260-263
14. Ш.З.Тапдыгов, Н.А.Зейналов, И.Д.Ахмедов и др.// XXIV Международная Чугаевская конференция по координационной химии.15-19 июня 2009 года. Тезисы Докладов. Санкт-Петербург.с.598
15. Тривен М.«Иммобилизованные ферменты».- М.:Мир.1983.-213с.
16. Кирш Ю.Э. «Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды». М.: Наука, 1998.

References

1. V.V.Korshak, M.I.Shtilman. Polimeri v processah immobilizacii i modifikacii prirodnih soedinenii. M. : Nauka. 1984. 34 s.
2. I.A.Yamakov, M.V.Budanov, V.A.Davankov // Bioorganicheskaya Himiya. Tom 6. №9. 1980. s.1404-1409.
3. Jianmin Wu, Mingming Luan, Jiayin Zhao // International Journal of Biological Macromolecules, Volume 39, Issues 4-5, November 2006, pages 185-191
4. F.P.Sidelkovskaya. Himiya N_vinilpirrolidona i ego polimerov. M.: Nauka.1970. 73. 93-94.s
5. Sh. Z. Tapdıqov, N.A.Zeynalov, N.Y.Melnikova, İ.D.Ahmədov, Z.M.Aliyeva //Azərbaycan Kimya Jurnalı, №1, 2010,
6. L.I.Valuev, T.A.Valueva, N.A.Plate i dr //Uspehi biologicheskoi himii. t.43.2003. s.308_309.
7. C.Rocha, L.Ducso, M.P.Gonçalves, J.A.Teixeira //2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, ENPROMER, Costa Verde RJ, Brazil, 2005
8. N.A.Zeynalov, Sh.Z.Tapdıqov, İ.D.Ahmədov və başq // Azerb. Kimya Jurnalı, 2-2009, s. 39-44.
9. Nagano R., Nakasone T., Yamada K., M.Hirata //J.Nippon Kagakkai Koen Yokoshu, Vol.76, №.1, page.609,(1999)
10. Reynaldo V., Alex F., Roberto C., Pedro D. O., Maria L. V. //Supramolecular Chemistry, Volume 17, Issue 5 July 2005 , pages 387 - 391
11. Berezin I.V., Klyachko N.L., Levashov A.V. i dr. Immobilizovannie fermenti. M._ Visshaya shkola. 1987. 159 s.
12. Sh.Z.Tapdıqov // AMEA Aspirantların Elmi Konfransının Materialları, Bakı, iyun 2009, s.188-190
13. A.D.Pomogailo.«Polimernie immobilizovannie metallokompleksnie katalizatori» M.Nauka: 1988. s.260_263
14. Sh.Z.Tapdigov, N.A.Zeynalov, İ.D.Ahmedov i dr // HHIV Mejdunarodnaya Chugaevskaya konferenciya po koordinacionnoi himii. 15-19 iyunya 2009 goda. Tezisi Dokladov. Sankt_Peterburg. s.598.
15. Triven M.«Immobilizovannie fermenti». M.: Mir.1983. 213s.
16. Kirsh Yu.E. «Poli_N_vinilpirrolidon i drugie poli-N-vinilamidi». M.: Nauka. 1998.

Получение металло-гелевых биоконплексов с ионами Cu (II), Co (II) и Ni (II) поли-н-винилпирролидона и исследование иммобилизации трипсинов

Ш.З.Тандыгов

НИПИ «Нефтегаз», SOCAR, Баку, Азербайджан

Реферат

Металлогелевые комплексы ионов Cu (II), Co (II) и Ni (II) гидрогелей, полученных путем конструирования поли-N-винилпирролидона (PVPr) с N, N -метиленисакриламидом (МБАА) со средней молекулярной массой 10 кДа и 40 кДа. Емкость полученных биологически важных комплексов по ионам металлов составила 3.3-3.6 мг/г. Проведена иммобилизация трипсина в комплексах полимер-металл, а для трипсов металло-гель комплексов емкость увеличена в 7-8 раз, степень иммобилизации в 2 раза, а удельная активность фермента с 38 до 92 ЕД./мг. Было обнаружено, что тройные системы полимер-металл-трипсин обладают большей устойчивостью к связи, чем двойные системы полимер-трипсин, что обусловлено связыванием трипсина с полимерной сеткой ионами металлов. Кроме того, структура полученных комплексов идентифицирована методами ИК-Фурье и УФ-спектроскопии.

Ключевые слова: поли-н-винилпирролидон; биоконплекс; трипсин; иммобилизация.

Poli-n-vinilpirrolidonun Cu(II), Co(II) və Ni(II) ionları ilə metal-gel biokomplekslərinin alınması və onlara tripsinin immobilizasiyasının tədqiqi

Ş.Z.Tapdıgov

«Neftqazəlmətdəqiqatlayihə» İnstitutu, SOCAR,
Bakı, Azərbaycan

Xülasə

Orta molekul kütləsi 10 kDa və 40 kDa olan poli-N-vinilpirrolidonun (PVPr) N, N-metilenbisakrilamidə (MBAA) tikilməsindən alınan hidrogellərin Cu(II), Co(II) və Ni(II) ionları metal gelkompleksləri sintez edilmişdir. Alınmış bioloji vacib komplekslərin metal ionlarına görə tutumları 3.3-3.6 mq/qır olması müəyyən edilmişdir. Polimer-metal komplekslərinə tripsinin immobilizə olunması aparılmış və metal gelkomplekslərin tripsinə görə tutumun 7-8 dəfə, immobilizə dərəcəsinin 2 dəfəyə, enzimin spesifik aktivliyinin isə 38-dən 92 ED/mq-a qədər artması müşahidə olunmuşdur. Müəyyən olunmuşdur ki, polimer-metal-tripsin üçlü sistemləri, polimer-tripsin ikili sistemlər ilə müqayisədə onların rabitə davamlılığı böyükdür, bu isə tripsinin polimer toruna metal ionları hesabına birləşməsi ilə izah olunur. Bununla yanaşı alınan komplekslərin quruluşu İQ-Furıye və UB spektroskopik üsullarla identifikasiya edilmişdir.

Açar sözlər: poli-n-vinilpirrolidon; biokompleks; tripsin; immobilizasiya.