

УДК 54.05

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ КОРНЯ ХРЕНА НА МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Яковлева А.А., магистрант гр. М.БТ.ПБ, I курс

Научный руководитель: Гребенникова О.В., к.х.н., доцент
ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет»
Кафедра биотехнологии, химии и стандартизации
г. Тверь

Одной из важнейших и актуальных задач, стоящих перед промышленностью в настоящее время, является переход к более экологичным и устойчивым производственным процессам, которые сводят к минимуму или вообще избегают образования отходов и использования токсичных и/или опасных материалов. Биокатализ имеет много преимуществ в этом отношении. Сегодня ферменты широко используются в производстве фармацевтических препаратов, продуктов питания, тонких химикатов, ароматизаторов и других продуктов. Использование иммобилизованных ферментов позволяет повысить их активность, стабильность, легкое выделение продукта или более высокое качество продукта, достигаемое за меньшее количество стадий обработки. Благодаря ферментативным процессам, производится меньше отходов, чем при производстве традиционными синтетическими путями [1].

Использование магнитных наночастиц в биокатализе, за счёт их уникальных свойств, таких как контролируемый размер частиц, большая площадь поверхности и простота отделения их и реакционной смеси путем приложения внешнего магнитного поля, позволяет повторно использовать иммобилизованные на магнитных наночастицах ферменты для каталитических процессов [2,3].

В данной работе пероксидаза корня хрена (HRP) была иммобилизована на магнитные наночастицы Fe_3O_4 , синтезированные полиольным методом. Поверхность носителя перед иммобилизацией фермента была модифицирована и активирована двумя способами с использованием тетраэтилортосиликата (TEOS), 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTS) и глutarового альдегида (GA). Тестирование биокаталитических систем осуществлялось в реакции окисления 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо кислоты) диаммониевой соли (АБТС) с помощью пероксида водорода.

Магнитные наночастицы были синтезированы по известной методике [4]. Для окисления АБТС использовались две биокаталитические системы. Первый образец был получен с использованием TEOS, APTES, GA и HRP. Второй образец биокатализатора синтезировался аналогично, но без использования TEOS. Полученные биокаталитические системы обозначались как $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$ P и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$, соответственно.

Кинетические эксперименты проводили спектрофотометрически. Полученные биокаталитические системы и нативная HRP тестировались в реакции окисления АБТС с помощью пероксида водорода. За реакцией наблюдали по увеличению оптической плотности продукта окисления АБТС ($\lambda = 415$ нм). Для оценки влияния pH проводили серию экспериментов с различными значениями pH фосфатного буфера (5,5-7,4). Для определения температурного оптимума проводились эксперименты в диапазоне температур от 25 до 50 °С.

При значении pH = 6.0 у всех биокатализаторов были достигнуты лучшие результаты. По мере удаления pH от оптимума (6.0) начальная скорость реакции у всех образцов биокатализаторов снижалась, что, возможно, связано с деформацией активного центра фермента [5].

При определении оптимальной температуры лучшие результаты достигнуты при $T = 45$ °С для всех образцов биокатализаторов. Нативная HRP при увеличении температуры выше 45 °С снижает начальную скорость окисления субстрата, что указывает на потерю активности фермента, вероятно, из-за денатурации при более высоких температурах [6].

Для оценки возможности повторного использования биокатализаторов при многократном использовании, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$ были протестированы в пяти последовательных экспериментах при pH 6.0 и температуре 45 °С. После каждой каталитической реакции биокатализаторы отделяли неодимовым магнитом и использовали в следующем эксперименте. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

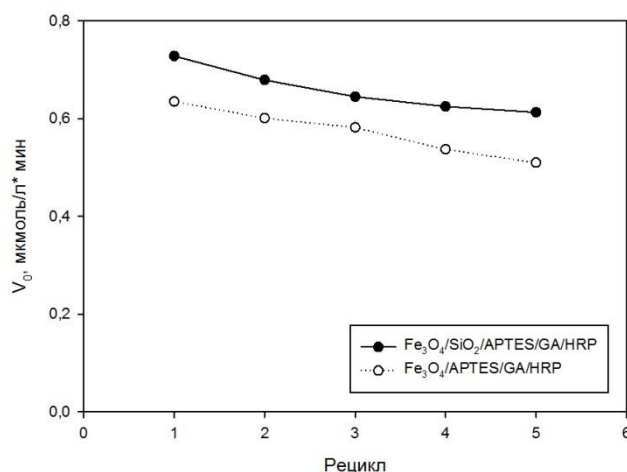


Рисунок 1 – Начальная скорость окисления АБТС при повторном использовании биокатализаторов

Из представленных данных можно сделать вывод о том, иммобилизованная на магнитных наночастицах HRP становится стабильной после нескольких рециклов, что объясняется стабилизирующим/активирующим влиянием оксида железа как усилителя ферментативной активности. По графику видно, что после пяти последовательных каталитических циклов $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$ потерял всего 15 % активности, а биокатализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$ – 19 %. Более высокая стабильность у биокатализатора

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$ может быть связана с содержанием в его составе диоксида кремния, благодаря которому поверхность носителя покрывается группами $\text{OH}-$, способными к взаимодействию с другими функциональными группами, обеспечивая тем самым прочное ковалентное связывание фермента с поверхностью носителя.

Иммобилизованная на магнитных наночастицах HRP проявила высокую эффективность в отношении окисления АБТС с помощью пероксида водорода. Были подобраны оптимальные условия проведения данной реакции в присутствии синтезированных биокатализаторов ($\text{pH} = 6.0$, температура 45°C). Наиболее высокую активность проявил биокатализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HRP}$, содержащий в своем составе TEOS. Синтезированные биокатализаторы могут успешно применяться для окисления различных фенольных соединений, обеспечивая тем самым эффективность процесса и простоту отделения биокаталитической системы от реакционной смеси.

Список литературы:

1. Federsel H.-J., Moody, T.S., Taylor S.J.C. Recent Trends in Enzyme Immobilization-Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox / H.-J. Federsel, T.S. Moody, S.J.C. Taylor // *Molecules*. 2021. 26. с. 2822
2. Deepthi S.S., Reddy B.V. Green Approach towards the Synthesis of Enantio Pure Diols Using Horse Radish Peroxidase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles // *Green and Sustainable Chemistry*. 2014. № 4. p.15-19.
3. Grebennikova O., Sviridova I., Matveeva V., Sulman M. Magnetic nanoparticles in biocatalysis // *Journal of Physics: Conference Series*. 2020. 1658. 012018.
4. Cheng C., Xu F., Gu H. Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes // *New J. Chem*. 2011. № 35. P. 1072–1079.
5. Buchholz K., Kasche V., Theo U. Bornscheuer Biocatalysts and Enzyme Technology, 2nd Edition // Wiley-Blackwell. 2012. 626 p.
6. Singh A., Negi M. S., Dubey A., Kumar V., Verma A. K. Methods of Enzyme Immobilization and Its Applications in Food Industry // *Enzymes in Food Technology*. 2018. Vol. 34. P.103-124.