

УДК 577.17

МАГНИТООТДЕЛЯЕМЫЕ ОКСИДЫ КРЕМНИЯ И АЛЮМИНИЯ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Д.В. Балакшина, М.БТ.ПБ.23.17, 1 курс магистратуры
Сульман Александрина Михайловна, кандидат химических наук
Тверской государственной технический университет
Тверь

Ферменты - природные биокатализаторы, нашедшие применение во многих отраслях промышленности, таких как пищевая химия, тонкая химия, медицина, производство топлива и борьба с экологическими проблемами. Как правило, эти вещества могут катализировать множество сложных химических реакций в мягких условиях, связывать свои субстраты, а затем использовать функциональную группу для достижения катализа [1].

Глюкозооксидаза является ферментом, который катализирует реакцию окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты (рис. 1), используемой в качестве консерванта или пищевой добавки [2].

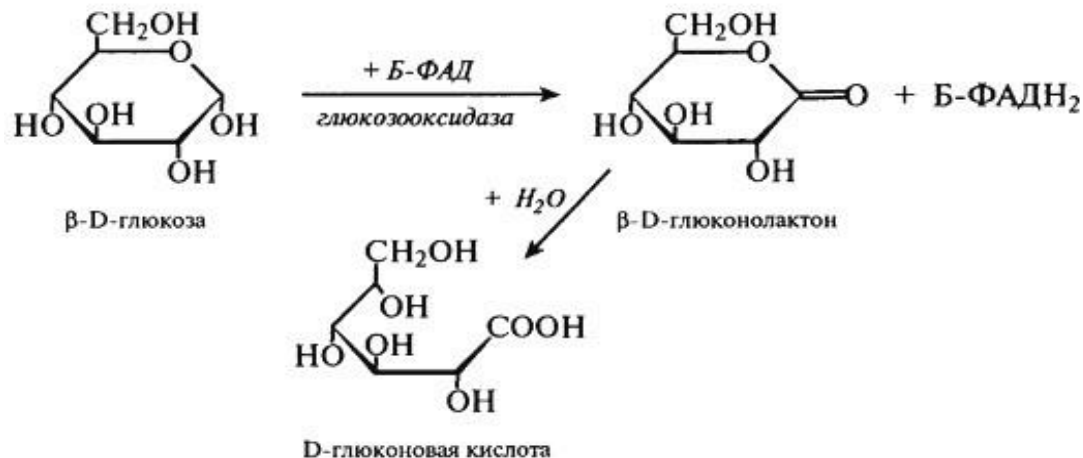


Рисунок 1 - Схема реакции окисления D-глюкозы в присутствии глюкозооксидазы

Несмотря на выдающиеся свойства ферментов (активность и специфичность), большинство из них представляют собой белки. Это означает, что они незначительно стабильны из-за чувствительности аминокислотных групп к агрессивной окружающей среде, а также растворимы в воде без возможности дальнейшего восстановления [3].

Чтобы решить эту проблему, учёными были разработаны методы иммобилизации и изучены различные носители для стабилизации состояния ферментов. Иммобилизация ферментов заключается в использовании

внешнего материала, чтобы обеспечить повторное использование ферментов и повысить их устойчивость в производственных процессах и лабораторных исследованиях.

На данный момент времени наиболее подходящими материалами для осуществления данного процесса можно назвать мезопористые носители (оксиды кремния и алюминия), благодаря широким порам и возможности регулирования их структуры. Помимо этого, они обладают химической и термической устойчивостью [4].

Их можно усовершенствовать, объединив с магнитными наночастицами (МНЧ). Полученный результат – это магнитоотделяемые носители, которые имеют возможность магнитного отделения, благодаря чему фермент не только беспрепятственного извлекается из реакционной среды, но и избегается его утечка [5].

В сочетании с методом иммобилизации ковалентным связыванием это обеспечивает образование прочной связи между магнитными носителями и глюкозооксидазой. Его суть состоит в активации фермента линкерной молекулой (глутаровым альдегидом) перед ковалентным сшиванием, то есть образованием «мостика» между ним и поверхностью [6].

Носители – магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия – были получены путем кристаллизации *in situ* оксида железа (III) (Fe_3O_4) в мезопорах, в результате чего в них образовывались магнитные наночастицы оксида железа (МНЧ), и функционализации поверхности 3-аминопропилтритоксисиланом (APTES).

Добавление APTES к немодифицированному коллоидному оксиду кремния

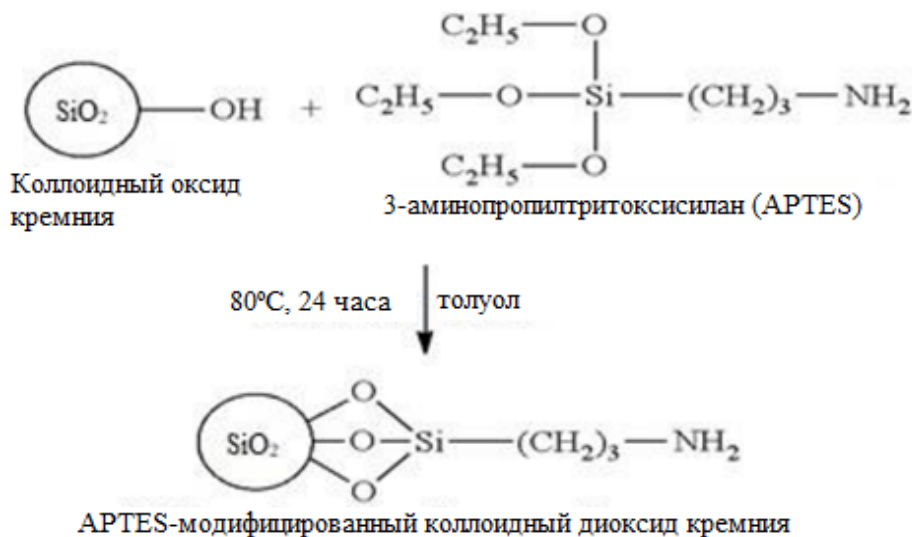


Рисунок 2 - Схема модификации поверхности носителя с помощью APTES

Физико-химическими методами - вибрационного магнитометра и низкотемпературная адсорбция азота – были получены результаты исследования их пористости и магнитных свойств. Каталитические свойства уже биокатализаторов, полученных путём ковалентного связывания фермента

с носителями, - магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия – анализировались с помощью спектрофотометрии.

Методом вибрационного магнитометра были получены кривые намагничивания и размагничивания (рис. 3). Кривые намагничивания подтверждают, что наночастицы Fe_3O_4 , независимо от способа получения обладают суперпарамагнитными свойствами. Анализ результатов показывает, что намагниченность $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ одинаковая (кривые намагничивания совпадают) и составляет 3.4 ($\text{Ам}^2/\text{кг}$).

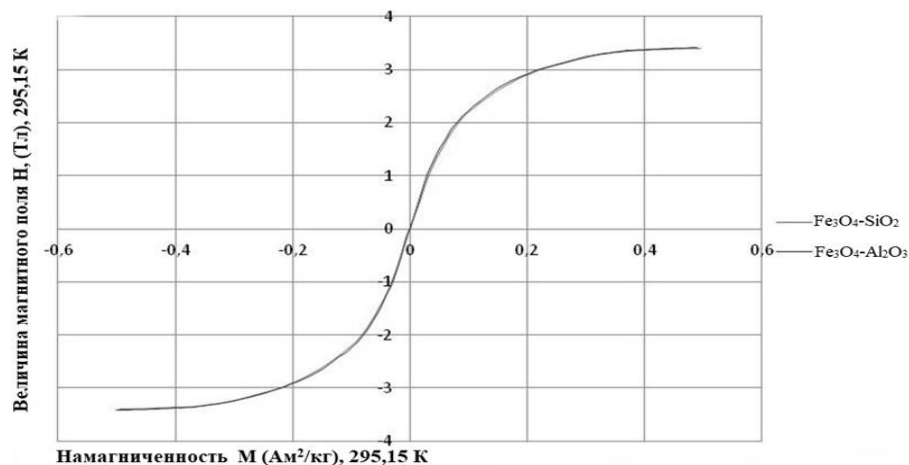


Рисунок 3 - Кривые гистерезиса магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия

Методом низкотемпературной адсорбции были получены изотермы адсорбции-десорбции IV типа (рис. 4, рис. 5), характерные для мезопористых материалов. Максимум распределения пор составил 6 и 5 нм. Площадь поверхности носителя $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ уменьшилась \approx на 34% по сравнению с исходным оксидом кремния, что в случае носителя на основе алюминия составляет \approx 23%.

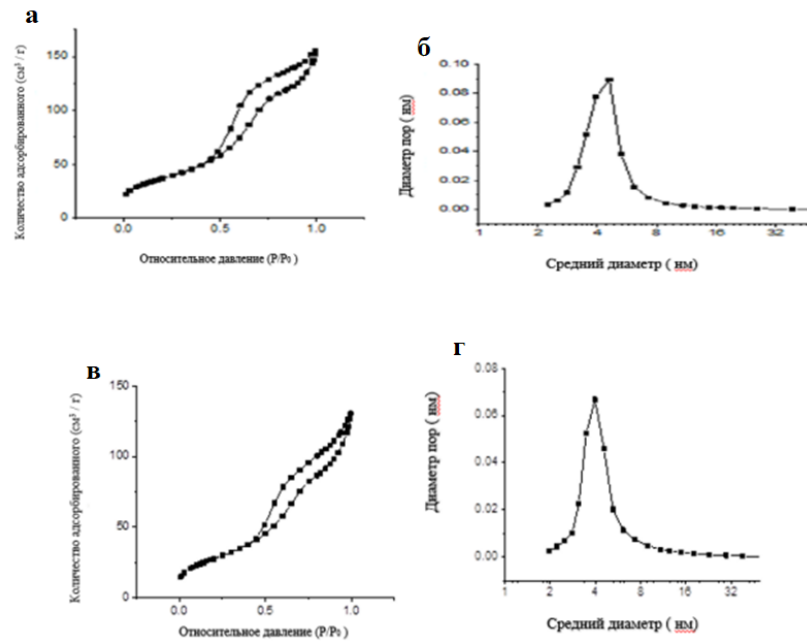


Рисунок 4 - Изотермы адсорбции-десорбции N_2 (а, в) и распределение пор (б, г) исходного Al_2O_3 (а, б) и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ (в, г)

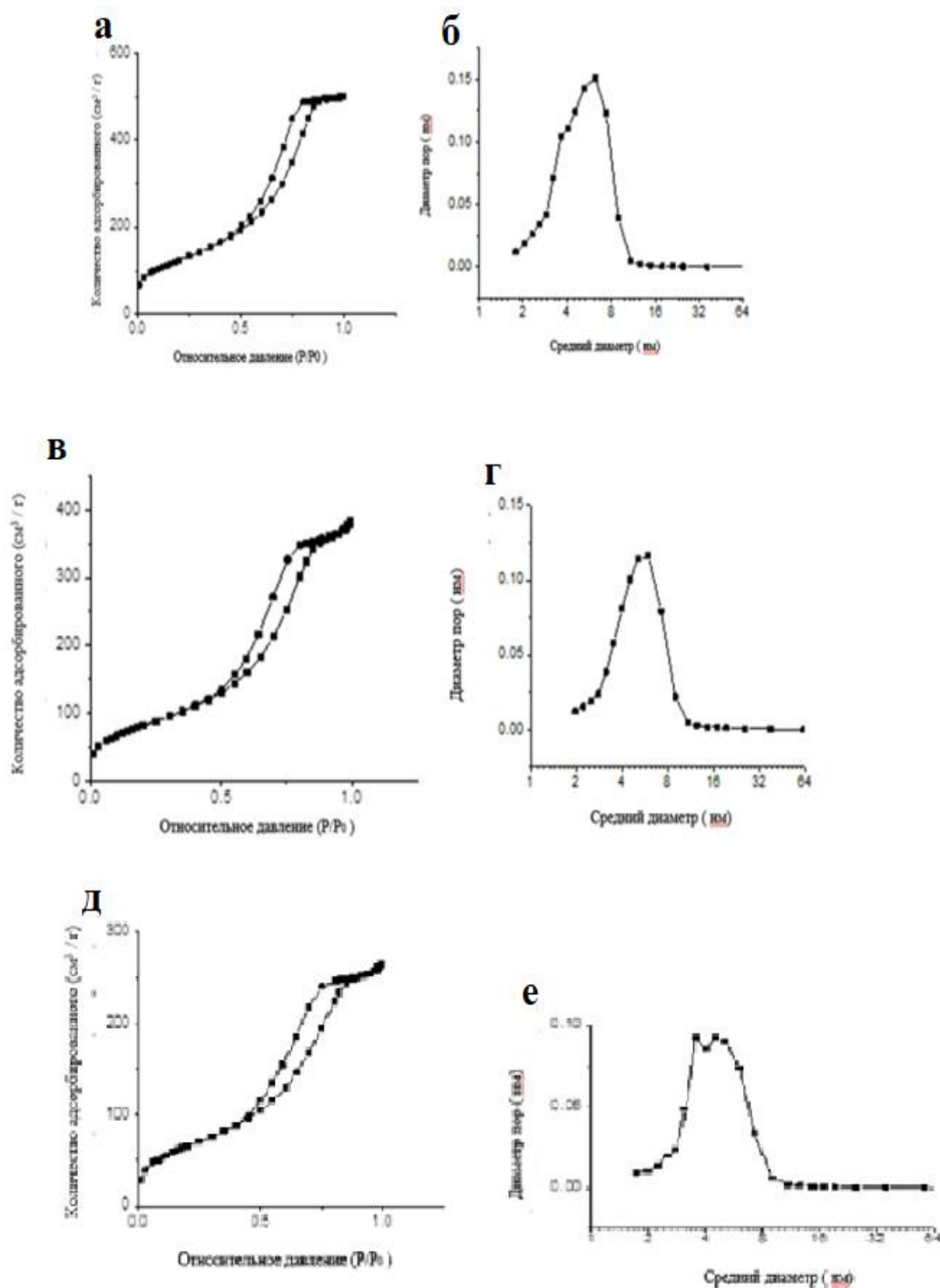


Рисунок 5 - Изотермы адсорбции-десорбции N_2 (а, в, д) и распределение пор (б, г, е) исходного SiO_2 (а, б) $Fe_3O_4-SiO_2$ (в, г), $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ (д, е)

Активность биокатализаторов, изучаемая методом спектрофотометрии, при pH 7 составляла 95% и 90%, а при 35-50°C активность в 95% показал биокатализатор $Fe_3O_4-SiO_2-GOx$.

Относительная активность иммобилизованной глюкозооксидазы составила 94% от нативного фермента для $Fe_3O_4-SiO_2-GOx$. По изменению оптической плотности анализировали протекания реакции окисления D-глюкозы кислородом воздуха в присутствии ABTS с нативной и

иммобилизованной глюкозооксидазой. Максимальное значение оптической плотности в случае $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-GOx}$ достигалось за 770с (рис. 6).

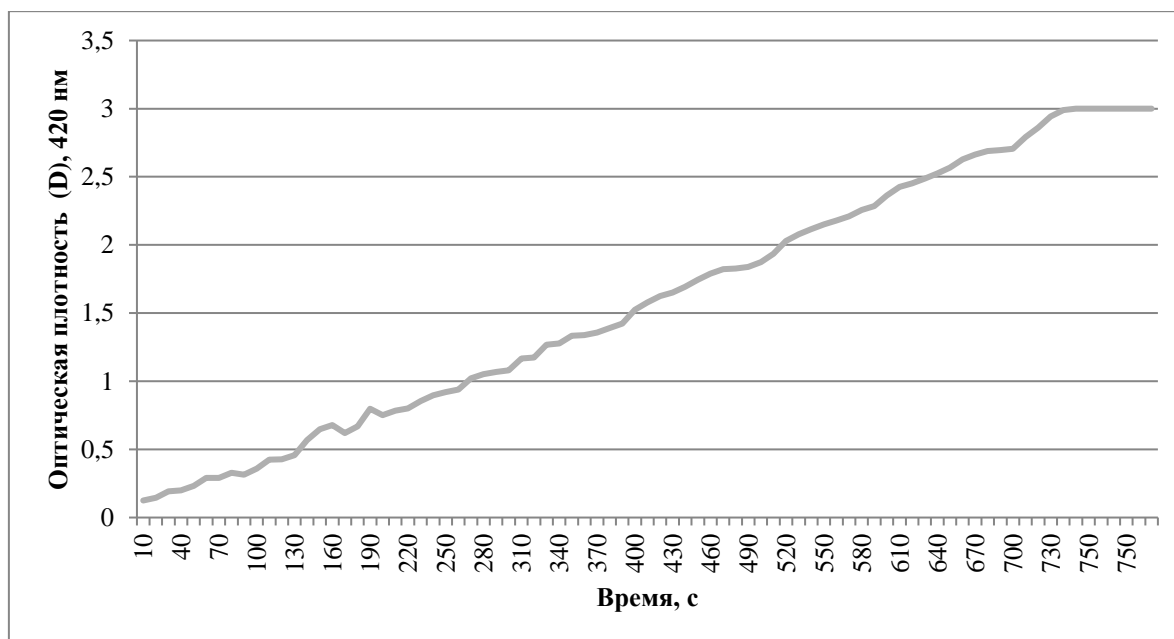


Рисунок 6 - Изменение оптической плотности раствора при окислении D-глюкозы на спектрофотометре ПЭ-3400ВИ в присутствии биокатализатора $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-GOx}$

Это уступало в активности нативной глюкозооксидазе – 310с. В случае $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-GOx}$ относительная активность 87% от нативного фермента, а максимальное значение оптической плотность достигалось за – 850с, что уступают другому биокатализатору (рис. 7).

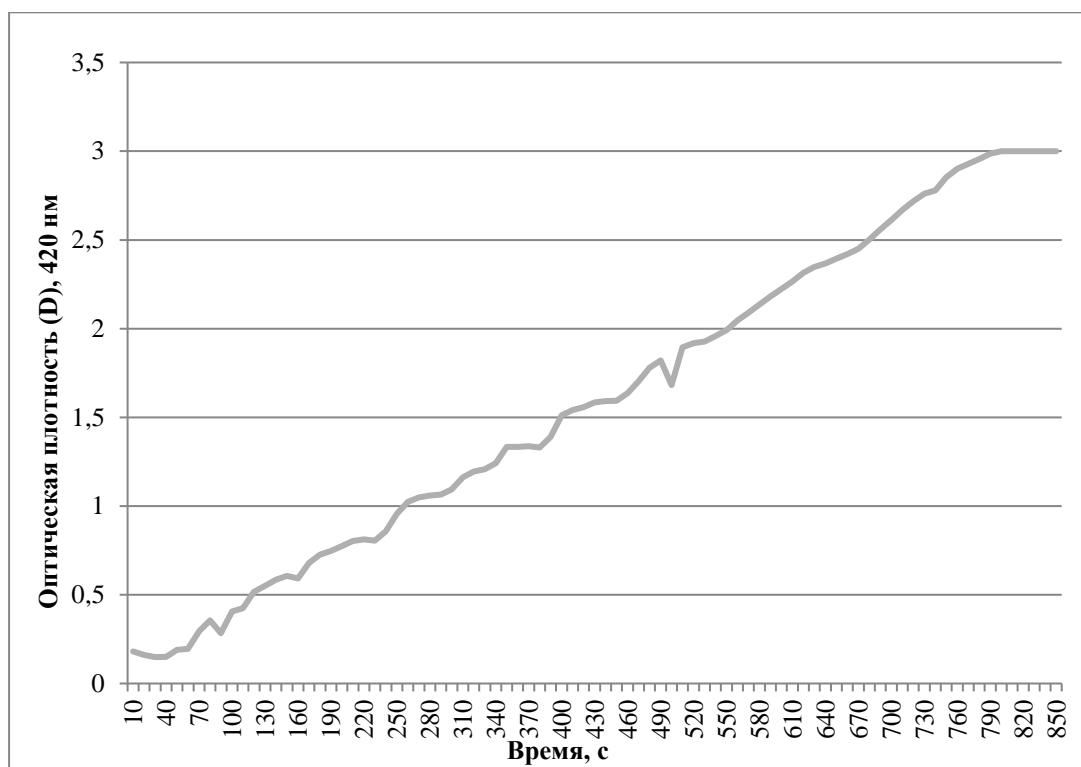


Рисунок 7 - Изменение оптической плотности раствора при окислении D-глюкозы на спектрофотометре ПЭ-3400ВИ в присутствии биокатализатора $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-GOx}$

В результате при проведении исследований было замечено повышение стабильного состояния глюкозооксидазы в случае использования магнитоотделяемых носителей.

Список литературы:

1. Wilson R., Turner A.P.F., Glucose oxidase: An ideal enzyme // Biosens. Bioelectron. – 1992. – no. 7. – pp. 165–185.
2. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L., Glucose oxidase // An overview. Biotechnol. Adv. – 2009. – no. 27. – pp. 489–501.
3. Bauer J.A., Zamocka M., Majtan J., Baueroва-Hlinkova V., Glucose Oxidase, an Enzyme “Ferrari”: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications // Biomolecules. - 2022. no. 12. – p. 472.
4. Hecht H.J., Kalisz H.M., Hendle J., Schmod R.D., Schomburg D., Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Resolution // J. Mol. Biol. – 1993. – no. 229. – pp. 153–172.
5. Wohlfahrt G., Witt S., Hendle J., Schomburg D., Kalisz H.M., Hecht H.J., 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes // Acta Crystallogr. D Struct. Biol. – 1999. – no. 55. – pp. 969–977.
6. Spicka N., Forte P., Glucose Oxidases – Potential Enzymes for Bleaching Textile Fibres. // Tekstilec. – 2021. – no. 54. – pp. 16-29.