

УДК 577.151

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА ГЕТЕРОГЕННЫХ НОСИТЕЛЯХ, СОДЕРЖАЩИХ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ: КЛЮЧЕВЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ БИОКАТАЛИЗАТОРА

В.Г. Матвеева, А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, Ю.Ю. Косивцов, В.Ю. Долуда

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

Носители, содержащие магнитные наночастицы (НЧ), для каталитических и биокаталитических систем, получили значительное внимание, поскольку они позволяют улучшить интенсификацию процесса и экономию как энергии, так и материалов за счет магнитного отделения [1–4]. В процессах периодического действия магнитная сепарация обеспечивает легкое отделение катализатора и его дальнейшее повторное использование. В данной работе, основное внимание сосредоточено на биокатализаторах, т. е. иммобилизованных ферментах, нанесенных на магнитные носители, хотя взаимосвязь между свойствами катализатора и характером магнитного носителя может быть довольно общей как для обычных катализаторов, так и для биокатализаторов. Очевидно, что для всех этих систем магнитное отделение является очевидным преимуществом, которое обычно обсуждается в литературе. В тоже время, имеют место другие важные параметры, которые могут существенно повлиять на биокаталитические характеристики, независимо от того, изолированы ли магнитные НЧ от ферментов (кремнеземной оболочкой, полимером и т. д.) или подвергаются воздействию из реакционной среды. Одним из наиболее значимых параметров является иерархическая пористость, где размеры пор могут варьироваться от микропор до макропор, обеспечивая как эффективный массоперенос в биокаталитической реакции, так и правильное расположение ферментов внутри пор для максимальной активности. Такие параметры, как введение агентов, модифицирующих поверхность, или использование специальных ферментативных реакторов, также могут иметь решающее значение для эффективности иммобилизованных ферментов на магнитной основе.

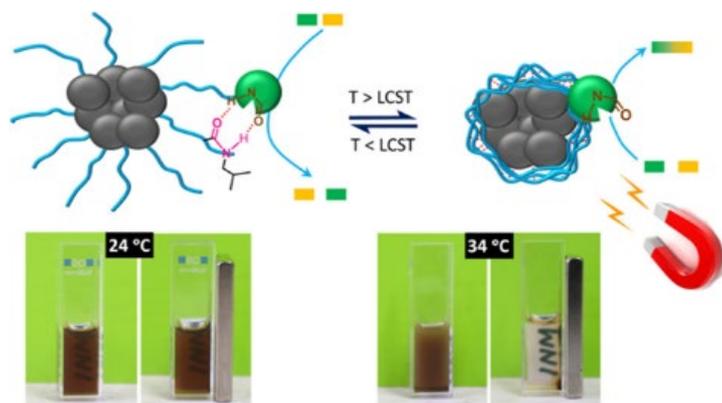


Рисунок 1. Схематическое изображение биокатализатора, сформированного из магнитных кластеров НЧ, покрытых термочувствительной оболочкой с прикрепленным ферментом. LCST означает более низкую критическую температуру раствора (INM – это аббревиатура Института новых материалов) [6]

оболочки [6] терминальная функциональность макромолекул была использована для присоединения фермента. В это же время термочувствительной характер оболочки позволяет контролировать ферментативную активность (рис. 1). Наконец, образование магнитных НЧ в присутствии полимеров часто является предпочтительным, поскольку оно упрощает процесс приготовления биокатализатора [9].

Магнитное отделение иммобилизованных ферментов обычно осуществляется путем связывания ферментов с магнитными НЧ посредством некоторых связующих агентов, таких как полимеры, дифункциональные молекулы и т. д. [5, 6]. Чтобы создать заметный магнитный момент для успешного разделения, магнитные наночастицы часто организуются в кластеры [6], внедряются в гели, другие полимерные или неорганические матрицы [4, 8] или самособираются в более крупные структуры. Другой путь в магнитных НЧ-полимерных композитах реализуется, когда макромолекулы образуют сетку, привязанную к поверхности НЧ [6], или полимерную оболочку с использованием полимеризации *in situ*. Для термочувствительной полимерной

Повышение ферментативной активности в магнитных биокатализаторах может быть достигнуто многими способами. Суо и др. сообщали о значительном повышении активности магнитного биокатализатора на основе липазы из-за ограниченных ионных жидкостей, присутствие которых улучшало микроокружение иммобилизованной липазы за счет уменьшения гидрофобности носителя, а также модифицировало вторичную структуру липазы и позволяло экспонировать активный центр фермента [7]. Сшивание магнитного носителя НЧ на основе хитозана с иммобилизованной ксиланазой позволило значительно повысить активность по сравнению с несшитым биокатализатором. Это было связано с более высокой локальной концентрацией субстрата в ограниченном пространстве, что приводило к увеличению числа взаимодействий между субстратами и иммобилизованными ферментами. Значительное усиление активности фермента наблюдалось, когда оба фермента и НЧ оксида железа располагались поблизости друг от друга. Сравнение активности глюкозооксидазы (GOx), иммобилизованной в пористом диоксиде кремния (SiO_2), оксиде алюминия (Al_2O_3) и диоксиде циркония (ZrO_2) или в тех же носителях, но содержащих НЧ магнетита в порах оксидной матрицы ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$), показало, что биокатализаторы основанные на магнитных подложках заметно более активны, чем те, которые основаны на немагнитных подложках [4, 8]. Это было связано с присущей ферментоподобной активностью НЧ оксида железа и усилением активности иммобилизованного GOx за счет синергетического эффекта, поскольку Fe_3O_4 служил со-катализатором для фермента [10].

На эффективность биокатализаторов большое влияние оказывает пористость носителя. Магнитные пористые носители были получены путем комбинирования магнитных НЧ и неорганических [4, 8], полимерных [11] или углеродных пористых материалов. Наночастицы магнетита в сочетании с пластинами восстановленного оксида графена использовались в качестве прекурсоров для изготовления распылительным пиролизом почти сферических пористых магнитных носителей для высокоэффективной иммобилизации ферментов. Среди пористых полимеров значительное внимание уделялось термореактивным полимерам [11]. Шен и др. разработал управляемую термочувствительную мембрану, образованную блок-сополимером с внедренными НЧ магнетита и иммобилизованными ферментами, производительность которой была протестирована при различных температурах от 25 до 39 °C [11]. Во многих случаях магнитные пористые носители создаются путем размещения пористой оболочки на магнитном сердечнике [12], что позволяет изолировать магнитные НЧ от части пористой оболочки, где иммобилизованы ферменты. Это также традиционный путь предотвращения агрегации магнитных НЧ или их влияния на ферментативное поведение.

Многочисленные исследования показали, что иерархическая пористость субстратов биокатализатора имеет решающее значение для влияния на производительность биокатализатора [13, 14]. Преимущества иерархической пористости заключаются в трех аспектах: (i) мелкие поры (микропоры) обеспечивают структурную целостность носителя, (ii) крупные поры (крупные мезо- и макропоры) обеспечивают улучшенный массоперенос подложки, (iii) в то время как поры среднего размера (мезопоры, которые больше, чем размер фермента) это может привести к оптимальной самосборке молекул фермента внутри пор, напоминая степень скученности, реализуемую в клетках. Этот фактор может значительно повысить активность иммобилизованных ферментов. Магнитные микросферы с иерархической пористостью (PFMMs) были изготовлены с использованием нетрадиционного предшественника – нового жестко-гибкого дендримера, синтезированного межфазной полимеризацией хлорида тримезоила и 1,6-гександиамина (рис. 2) [14]. PFMMs обладают размерами пор в диапазоне 5–75 нм и превосходной грузочной способностью для ковалентной иммобилизации липазы *Pseudomonas fluorescens* (PFL). Повышенная жесткость этой матрицы по сравнению с носителем на основе полностью гибких дендримеров также позволила улучшить возможность повторного использования иммобилизованного PFL.

Магнитные металлоорганические каркасы (MOF), содержащие микро-, мезо- или даже макропоры, продемонстрировали перспективность в качестве носителей для иммобилизации фермента благодаря сочетанию пористости, магнитного разделения и упорядочения пор, что позволяет обеспечить больший порядок в расположении фермента. Обычно в иерархических MOF мезопоры формируются в микропористых каркасах, таким образом, более крупные поры соединяются каналами микропор, препятствующими доступу к большим субстратам.

Новый магнитный иерархически пористый MOF был получен с помощью стратегии дефектообразования, индуцируемого модулятором (рис. 3) [13]. Полидопамин (PDA) использовали в качестве источника аминогрупп для координации Zr^{4+} с последующим удалением додекановой кислоты (DA, конкурентный лиганд) с использованием HCl для образования сравнительно больших мезопор. Полученный в результате материал обладает четко выраженной структурой ядро-оболочка, иерархической пористостью (микропоры и мезопоры) и сильной магнитной чувствительностью. После иммобилизации амидазы с высокой нагрузкой на этот магнитный носитель биокатализатор показал более высокую эффективность, термостабильность, стабильность при хранении, возможность повторного использования и т. д. по сравнению с нативным ферментом или аналогичным катализатором без иерархической пористости.

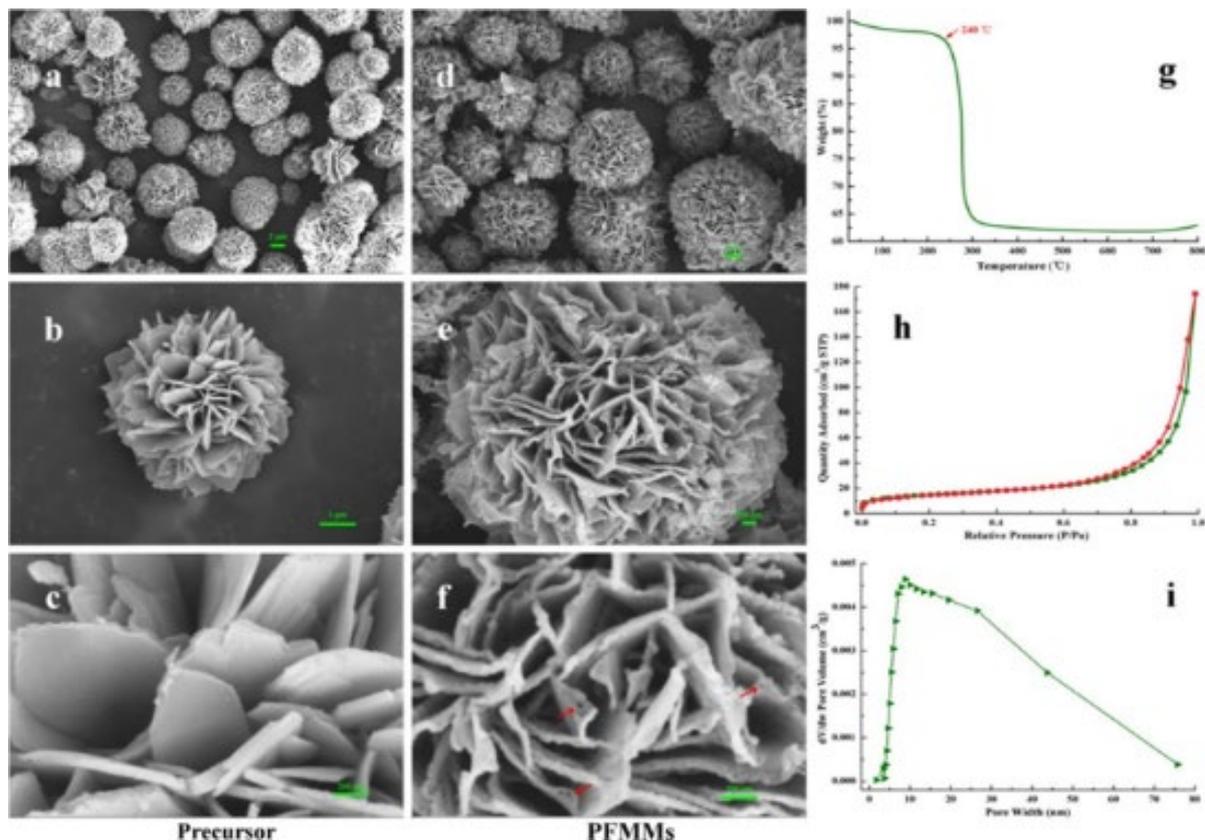


Рисунок 2. Микрофотографии сканирующей электронной микроскопии и свойства PFMMs и его предшественника (а–с) прекурсор PFMMs. Их шкала составляет 2 мкм, 1 мкм и 200 нм соответственно. (d–f) PFMMs. Их шкала составляет 1 мкм, 1 мкм и 200 нм соответственно. (g) Кривая TGA предшественника PFMMs. (h) Изотерма адсорбции–десорбции N_2 . (i) Распределение пор по размерам PFMM [14]

Модификация поверхности зависит от способа получения магнитного носителя и от компонентов биокатализатора [9]. При модификации поверхности магнитных носителей преследуются две основные цели. Один из них сосредоточен на функционализации носителей с такими группами, как альдегидная, amino, диимидная, карбоксильная, гидроксильная и т. д. для дальнейшего связывания ферментов и других модифицирующих молекул [15]. Функциональные группы могут быть получены путем присоединения дифункциональных молекул, полимеров, дендримеров или олигомеров [16]. Полигистидиновая метка (His-tag) была использована для модификации поверхности НЧ в форме “морского ежа”, состоящих из Ni-силикатной оболочки и магнетитовой сердцевины [12]. Такая модификация была возможна благодаря высокому сродству His-tag к ионам Ni. В то же время, His-tag легко присоединяет протеазу вируса травления табака (TEV), повышая совместимость между носителем и ферментом (рис. 4).

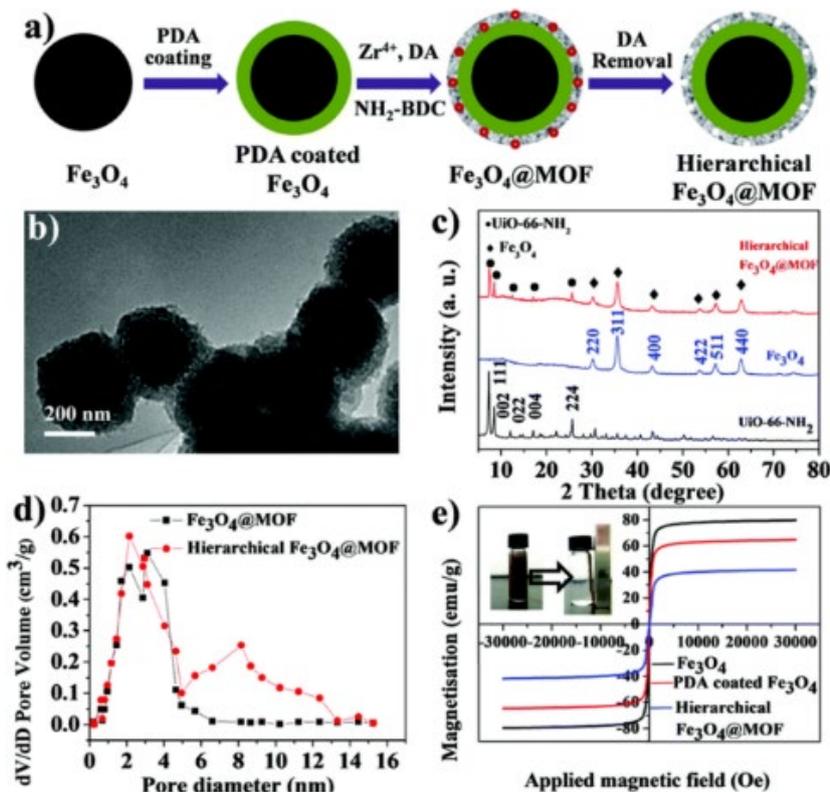


Рисунок 3. Синтез и характеристика магнитного иерархически пористого MOF (иерархический $Fe_3O_4@MOF$). (а) Схематическое изображение для трехэтапной подготовки; (б) ПЭМ-изображение иерархического $Fe_3O_4@MOF$; (в) Рентгеновские профили UiO-66-NH₂ (MOF, внизу), Fe_3O_4 (посередине) и иерархического $Fe_3O_4@MOF$ (вверху); (г) размер пор кривые распределения $Fe_3O_4@MOF$ (черный) и иерархический $Fe_3O_4@MOF$ (красный); и (е) петли магнитного гистерезиса Fe_3O_4 , Fe_3O_4 с покрытием PDA и иерархический $Fe_3O_4@MOF$, вставка – фотографии магнитной чувствительности [13]

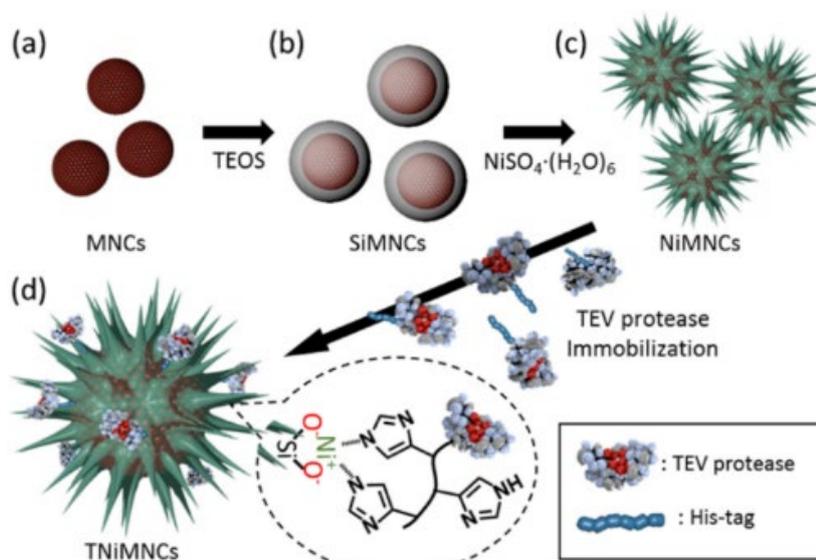


Рисунок 4. Синтез NiMNCs и иммобилизация протеазы TEV. ((а) Суперпарамагнитный магнитный нанокластер оксида железа (MNCs) был получен методом термического разложения. Образование (б) кремнеземной оболочки на поверхности MNC (SiMNCs) (TEOS расшифровывается как тетраэтоксисилан). (с) Кремнеземная оболочка, перенесенная в силикат никеля (NiMNCs) и (д) His-меченая протеаза TEV, иммобилизованная на поверхности NiMNCs (TNiMNCs)) [12]

Другая цель модификации поверхности связана с настройкой баланса гидрофобности и гидрофильности для лучшей совместимости фермента, носителя и субстрата [16, 17]. Так, например, липаза является типичным ферментом, требующим модификации поверхности из-за ее высокого сродства к гидрофобным молекулам.

Заключение

В данной работе показаны основные преимущества магнитных носителей для иммобилизации ферментов и влияние их структурных особенностей на биокаталитические свойства. Наиболее очевидным преимуществом магнитных биокатализаторов является легкая магнитная сепарация. Это позволяет экономить энергию, материалы и время, облегчает повторное использование и приводит к снижению затрат на технологические процессы, открывая путь для будущего промышленного применения. Еще одно замечательное преимущество достигается, когда ферменты присоединяются в непосредственной близости от НЧ оксида железа, что обеспечивает синергию между ферментом и НЧ оксида железа из-за присущей последнему ферментоподобной активности. Другим важным преимуществом магнитных биокатализаторов является направленно разработанная иерархическая пористость магнитных подложек и, в частности, иерархическая пористость, которая широко используется для контролируемой иммобилизации ферментов при дизайне эффективных биокатализаторов. Преимущества иерархической пористости включают легкий массоперенос реагирующих молекул в больших порах, оптимальную самосборку молекул фермента внутри пор среднего размера (что приводит к повышению активности фермента) и сохранение структурной целостности биокатализатора за счет малых пор. Наконец, агенты, модифицирующие поверхность, играют важную роль в повышении биокаталитических характеристик, например, в случае гидрофобных липаз, позволяя регулировать гидрофобность носителя или липазы и улучшать совместимость между магнитным носителем, ферментом и реагирующими молекулами. Таким образом, сочетание преимуществ магнитных наночастиц (магнитное разделение и ферментоподобные свойства) с хорошо продуманной пористостью и целенаправленной модификацией поверхности является многообещающим направлением для дальнейшего успешного развития эффективных магнитных биокатализаторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21-19-00192)

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang, D.; et al. Growing Field of Magnetically Recyclable Nanocatalysts. // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114. P. 6949–6985.
2. Asmat, S.; Husain, Q. A robust nanobiocatalyst based on high performance lipase immobilized to novel synthesised poly(o-toluidine) functionalized magnetic nanocomposite: Sterling stability and application. // *Mater. Sci. Eng., C.* 2019. Vol. 99. P. 25–36.
3. Lawson, B.P et al. Insights into Sustainable Glucose Oxidation Using Magnetically Recoverable Biocatalysts. // *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2018. Vol. 6. P. 9845–9853.
4. Jaquish, R. et al. Immobilized glucose oxidase on magnetic silica and alumina: Beyond magnetic separation. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 120. P. 896–905.
5. Gennari, A. et al. Immobilization of β -Galactosidases on Magnetic Nanocellulose: Textural, Morphological, Magnetic, and Catalytic Properties. // *Biomacromolecules.* 2019. Vol. 20. P. 2315–2326.
6. Krishnan, B.P.; Prieto-Lopez, L.O.; Hoefgen, S.; Xue, L.; Wang, S.; Valiante, V.; Cui, J. Thermomagneto-Responsive Smart Biocatalysts for Malonyl-Coenzyme A Synthesis. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020. Vol. 12. P. 20982–20990.
7. Suo, H.; Xu, L.; Xue, Y.; Qiu, X.; Huang, H.; Hu, Y. Ionic liquids-modified cellulose coated magnetic nanoparticles for enzyme immobilization: Improvement of catalytic performance. // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 234. P. 115914.
8. Haskell, A.K et al. Glucose Oxidase Immobilized on Magnetic Zirconia: Controlling Catalytic Performance and Stability. // *ACS Omega.* 2020. Vol. 5. P. 12329–12338.
9. Bilal, M.; Zhao, Y.; Rasheed, T.; Iqbal, H.M.N. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 120. P. 2530–2544.
10. Yang, Z.; Si, S.; Zhang, C. Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activity and stability. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 367. P. 169–175.
11. Shen, J.; Qiao, J.; Qi, L. Thermoresponsive Porous Polymer Membrane as a Switchable Enzyme Reactor for D-Amino Acid Oxidase Kinetics Study. // *ACS Appl. Bio Mater.* 2021. Vol. 4. P. 966–973.
12. Shin, M et al.. Synthesis of Fe₃O₄@nickel-silicate core-shell nanoparticles for His-tagged enzyme immobilizing agents. // *Nanotechnology.* 2016. Vol. 27. P. 495705/495701–495705/495709.
13. Lin, C.; Xu, K.; Zheng, R.; Zheng, Y. Immobilization of amidase into a magnetic hierarchically porous metal-organic framework for efficient biocatalysis. // *Chem Commun (Camb).* 2019. Vol. 55. P. 5697–5700.
14. Wang, J.; et al. Lipase Immobilized on a Novel Rigid-Flexible Dendrimer-Grafted Hierarchically Porous Magnetic Microspheres for Effective Resolution of (R, S) – 1-Phenylethanol. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020. Vol. 12. P. 4906–4916.
15. de, L.J.M.; Furlani, I.L.; da, S.L.R.G.; Valverde, A.L.; Cass, Q.B. Micro – and nano-sized amine-terminated magnetic beads in a ligand fishing assay. // *Anal Methods.* 2020. Vol. 12. P. 4116–4122.
16. Francolini, I.; Taresco, V.; Martinelli, A.; Piozzi, A. Enhanced performance of *Candida rugosa* lipase immobilized onto alkyl chain modified-magnetic nanocomposites. // *Enzyme Microb Technol.* 2020. Vol. 132. P. 109439.
17. Suo, H.; Gao, Z.; Xu, C.; Yu, D.; Xiang, X.; Xu, L.; Huang, H.; Hu, Y. Synthesis of functional ionic liquid modified magnetic chitosan nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019. Vol. 96. P. 356–364.