

УДК 577.151

БИОКАТАЛИЗАТОР НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ НА ОКСИД ЦИРКОНИЯ**А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, Д.В. Балакина, В.Г. Матвеева***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия*

Имобилизованные ферменты широко используются при синтезе различных сложных лекарственных средств и их промежуточных соединений в мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов. Они используются для рекультивации загрязненной воды, воздуха и почвы, эффективно устраняя органические загрязнители, диагностируя заболевания и корректируя различные генетические синдромы, вызванные дефицитом метаболических ферментов. В промышленных масштабах используется иммобилизованный фермент – глюкозооксидаза (GOx, КФ 1.1.3.4, семейство оксигеназ, подкласс оксидоредуктаз). GOx используется в пищевой промышленности и медицине для измерений содержания глюкозы в реальном времени и на месте биосенсорами. Создание носителей для иммобилизации GOx позволяет сохранить их активность, чувствительность в расширенных диапазонах для биосенсоров глюкозы. Другое важное использование иммобилизации GOx – это создание биокатализатора для получения D-глюконовой кислоты, которая сама и ее соли используются в качестве лекарств, витаминов и пищевых добавок. Химические, биохимические, механические и кинетические свойства иммобилизованных ферментов существенно определяются физико-химическими свойствами носителей, используемых для их иммобилизации, что делает их управляющими факторами синтеза биокатализаторов. Тип носителя играет ключевую роль в свойствах иммобилизованных ферментов. Поверхность носителя должна иметь хорошую геометрическую комплементарность формы фермента и достаточную поверхностную плотность функциональных групп. Вспомогательные функциональные группы для иммобилизации ферментов должны быть активными, стабильными и создавать минимальные стерические трудности при каталитической реакции. Для пористых сред высокая площадь поверхности оказывает критическое влияние на способность связывать ферменты, хотя для небольших количеств пор диффузионные ограничения могут отрицательно влиять на активность катализатора. Таким образом, размеры пор должны контролироваться для оптимизации иммобилизации фермента и последующего выхода субстрата. Большое значение для иммобилизации ферментов имеет синтез магнитно-отделяемых носителей, обеспечивающих легкую магнитную сепарацию биокатализатора из реакционного раствора, экономию энергии, а также получение более дешевых и чистых целевых продуктов [1–4].

В данной работе мезопористый ZrO_2 был синтезирован методом реплики, где в качестве жесткого шаблона использовался мезопористый диоксид кремния с размером пор 6 нм. Шаблон импрегнировали кристаллогидратом $ZrOCl_2 \times 8H_2O$, прокаливали при температурах 300 °C, 400 °C и 600 °C и затем выщелачивали. Магнитоотделяемые носители получали *in-situ* кристаллизацией наночастиц Fe_3O_4 (магнетита) в мезопорах исходного оксида циркония. Таким образом, были синтезированы образцы исходных оксидов циркония ZrO_2 -300, ZrO_2 -400 и ZrO_2 -600 и магнитоотделяемые носители Fe_3O_4 - ZrO_2 -300, Fe_3O_4 - ZrO_2 -400 и Fe_3O_4 - ZrO_2 -600, соответственно. Методом низкотемпературной адсорбции азота было установлено, что средний диаметр пор составил 6 нм (рис. 1). По данным изображения просвечивающей электронной микроскопии было установлено, что формирование наночастиц магнетита происходит именно в порах исходного оксида циркония и размер наночастиц не превышает размера пор (рис. 2).

Исходные оксиды и их магнитные аналоги использовались в качестве подложек для иммобилизации фермента GOx. Процесс проводили в следующей последовательности: функционализация поверхности образцов 3-аминопропилтриоксисилоном (APTES); активация аминогрупп APTES глутаровым альдегидом (GA); иммобилизация – реакция альдегидных групп GA с аминогруппами GOx. Таким образом были синтезированы гетерогенные биокатализаторы как на основе исходных оксидов: ZrO_2 -300-GOx, ZrO_2 -400-GOx, ZrO_2 -600-GOx, так и на магнитоотделяемых носителях: Fe_3O_4 - ZrO_2 -300-GOx, Fe_3O_4 - ZrO_2 -400-GOx, Fe_3O_4 - ZrO_2 -600-GOx.

Для оценки количества иммобилизованного GOx определялась каталитическая активность супернатанта до и после иммобилизации фермента и рассчитывался коэффициент иммобилизации (IC). Полученные значения показывают, что IC зависит от температуры прокалывания ZrO_2 . Самые высокие значения IC получены для ZrO_2 -600 (70 %) и Fe_3O_4 - ZrO_2 -600 (76 %) и самые низкие значения для ZrO_2 -300 (52 %) и Fe_3O_4 - ZrO_2 -300 (55 %).

В то же время, различия значения ИС между образцами с температурой обработки 400 °С и 600 °С невелики. Кроме того, эффективность иммобилизации несколько выше для магнитных носителей, что, вероятно, связано с введением наночастиц Fe_3O_4 [5]. Учитывая сложность синтезированных биокатализаторов, невозможно напрямую оценить какие-либо структурные и конформационные изменения GOx при иммобилизации. Однако эта оценка может быть проведена косвенно с использованием относительной активности биокатализатора по сравнению с GOx и предполагает, что высокая относительная активность биокатализатора определяет иммобилизованную структуру GOx [6–8].

Гетерогенные биокатализаторы на основе GOx, иммобилизованного на оксидах циркония, были исследованы в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в интервале pH 4–8 при T 40 °С. Известно, что активность фермента во многом зависит от степени ионизации аминокислотных остатков в активном центре, что делает pH основным фактором каталитической реакции. Сравнительные опыты проводились с нативным и иммобилизованным ферментом. Активность нативной GOx (~100 %) максимальна при pH 6 и резко снижается при изменении pH (рис. 3а). Для гетерогенных биокатализаторов зависимость относительной активности от pH носит слабый характер, она сохраняется на высоком уровне от pH 4 до pH 8. Известно, что иммобилизация GOx приводит к поддержанию относительной активности в широком диапазоне pH, что согласуется с данными литературы. Относительная активность для $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$ составляла 98 % при pH 7, а для нативного GOx – 40 %. Магнитные биокатализаторы имеют более высокую эффективность по сравнению с исходными оксидами циркония, как показано на рис. 1а, что вероятно связано с влиянием наночастиц оксида железа, обладающих ферментоподобной активностью. Результаты представленные на рисунке 3а указывают на то, что температура обработки ZrO_2 влияет на каталитические свойства биокатализатора, хотя различия в кристаллической структуре между образцами, обработанными при 400 и 600 °С невелики.

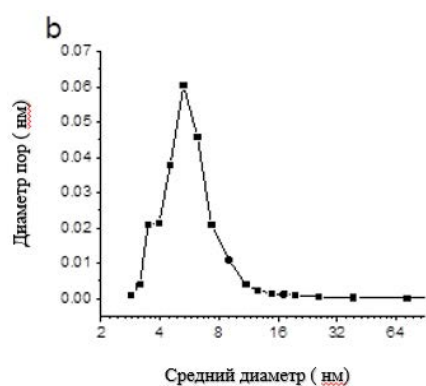


Рисунок 1 Распределение пор по размерам для $\text{ZrO}_2\text{-600}$

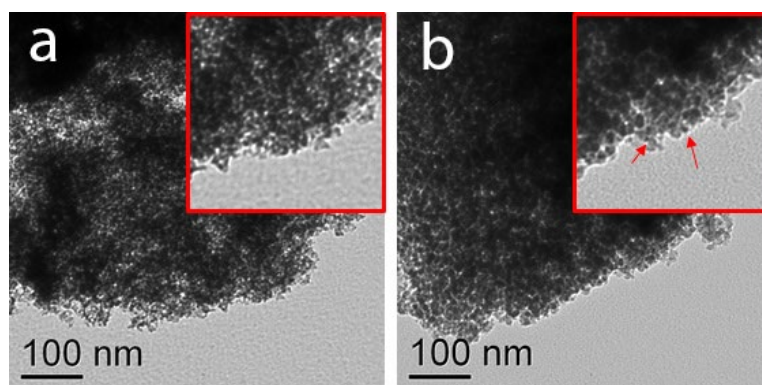


Рисунок 2 – ПЭМ $\text{ZrO}_2\text{-600}$ (а) и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$ (б)

Влияние температуры на окисление D-глюкозы изучалось в интервале от 30 до 70 °С при pH 6 (рис. 3б). При 40 °С нативный GOx проявляет максимальную активность (~100 %) и впоследствии происходит резкое снижение до 73 % при 50 °С, в то время как иммобилизованные биокатализаторы, как видно из приведенных данных, менее чувствительны к изменениям температуры. Таким образом, активность $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-400-GOx}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$ остается в пределах 87–98 % в диапазоне 35–50 °С (рис. 3б). При 60 °С нативный фермент теряет около 60 % каталитической активности, тогда как активность гетерогенных биокатализаторов снижается лишь на 4–18 % в зависимости от типа носителя. Среди иммобилизованных биокатализаторов наилучшие результаты были получены для $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$ с относительной активностью 98 % при 40–45 °С.

Для оценки возможности повторного использования гетерогенных биокатализаторов были проведены десять последовательных испытаний при температуре 40 °С и pH 6. Для биокатализатора на основе исходного оксида циркония относительная активность снизилась на 14 % (рис. 4), в то время как снижение относительной активности магнитоотделяемого $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-400-GOx}$ составляет всего 7 % (рис. 4). Высокая каталитическая стабильность при многократном использовании магнитоотделяемых гетерогенных биокатализаторов объясняется, вероятно, положительным эффектом наночастиц оксида железа.

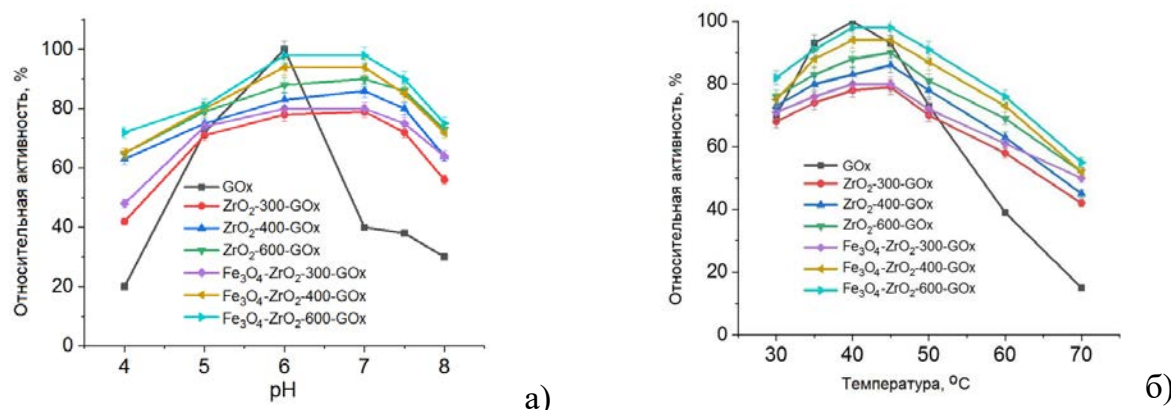


Рисунок 3 – Влияние pH (а) и температуры (б) на относительную активность нативной и иммобилизованной GOx

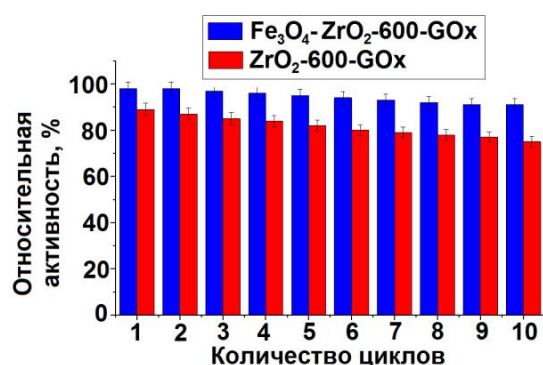


Рисунок 4 – Относительная активность иммобилизованной GOx при повторном использовании для биокатализаторов на основе оксидов циркония (на примере ZrO_2 -600-GOx и Fe_3O_4 - ZrO_2 -600-GOx)

Синтезирован мезопористый оксид циркония с размером пор до 6 нм. Магнитоотделяемый образец получен в результате формирования наночастиц магнетита в порах оксида циркония. Изучена активность и стабильность глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемый мезопористый оксид циркония в процессе окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. При проведении десяти последовательных циклов лучший магнитоотделяемый биокатализатор Fe_3O_4 - ZrO_2 -600-GOx (относительная активность 98 %) теряет только 7 % своей активности, что объясняется высокой износостойкостью ZrO_2 . Высокая ферментативная активность биокатализаторов делает их перспективными для практического применения в широком диапазоне pH и температуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 22-79-00052).

Литература

1. Zdarta, J. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility / J. Zdarta, S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo // Catalysts. – 2018. – Vol. 8. – P. 92.
2. Cowan, D.A. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization / D.A. Cowan, R. Fernandez-Lafuente // Enzyme Microb. Technol. – 2011. – Vol. 49. – P.326–346.
3. Wohlgemuth, R. Biocatalysis – Key to sustainable industrial chemistry / R. Wohlgemuth // Curr. Opin. Biotechnol. – 2010. – Vol. 21. – P.713–724.
4. Jesionowski, T. Enzymes immobilization by adsorption: A review / T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska // Adsorption. – 2014. – Vol. 20. – P. 801–821.
5. Zhang, Y. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes / Y. Zhang, J. Ge, Z. Liu // ACS Catal. – 2015. – Vol. 5. – P. 4503–4513.
6. Marzadori, C. Immobilization of jack bean urease on hydroxyapatite: Urease immobilization on alkaline soils / C. Marzadori, S. Miletto, C. Gessa, S. Ciurli // Soil Biol. Biochem. – 1998. – Vol. 30. – P. 1485–1490.
7. Mateo, C.; et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente // Enzyme Microb. Technol. – 2007. – Vol. 40. – P.1451–1463.
8. Sheldon, R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance / R.A. Sheldon // Adv. Synth. Catal. – 2007. – Vol. 49. – P. 1289–1307.