УДК 547.565.2 : 577.158: 544.478.41

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА МАГНИТООТДЕЛЯЕМЫХ ОКСИДАХ

А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, Е.М. Михайлова, М.Г. Сульман, В.Г. Матвеева

Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

Иммобилизованные ферменты широко используются в синтезах различных сложных лекарственных препаратов в мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов. Кроме того, иммобилизованные ферменты применяются для очистки загрязненной воды, воздуха и почвы путем эффективного удаления стойких органических загрязнителей, диагностики заболеваний и коррекции различных генетических заболеваний из-за отсутствия метаболических ферментов [1–8]. Оксидоредуктазы (К.Ф. – 1) – это большой класс ферментов, которые катализируют биологические реакции окисления / восстановления. Промышленно значимым иммобилизованным ферментом является глюкозооксидаза (GOx, (К.Ф. 1.1.3.4), семейство оксигеназ, подкласс оксидоредуктаз). GOx используется в биосенсорах для определения содержания глюкозы. Иммобилизация GOx позволяет разработать биосенсоры глюкозы с улучшенной прочностью, чувствительностью, линейными диапазонами и пределами обнаружения. Другое важное применение иммобилизованного GOx – это биокатализатор для получения D-глюконовой кислоты (схема 1). D-глюконовая кислота и ее соли используются в качестве лекарств, пищевых добавок и добавок, компонентов чистящих средств и т. д. [9–12].

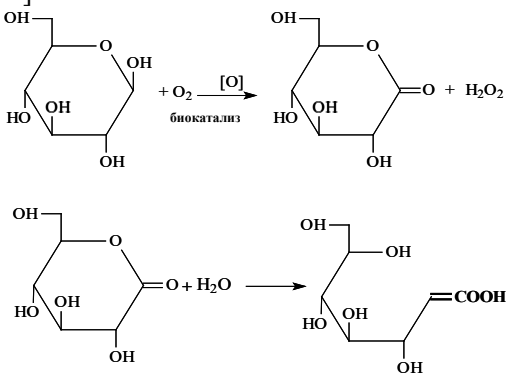

Схема 1. Схема окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты

Известно, что пористый диоксид кремния является отличным носителем для иммобилизации ферментов благодаря большой площади поверхности и легкой функционализации с использованием коммерчески доступных силанов. Существует множество примеров иммобилизации GOx и других ферментов семейства оксидоредуктаз (например, пероксидазы). на носителях на основе диоксида кремния. В последнее время, исследователи используют магнитные наночастицы (МНЧ), для создания магнитоотделяемых катализаторов, легкость выделения которых из реакционной смеси позволяет экономить энергию (исключается стадия очистки от катализатора) и создавать более дешевые и чистые целевые продукты [13–16].

Магнитный диоксид кремния, синтезированный в результате образования наночастиц оксида железа в порах SiO_2, был описан ранее как носитель магнитоотделяемых катализаторов. [17–21]. В этой статье представлены данные об иммобилизации GOx на мезопористых магнитных оксидах кремния (Fe_3O_4-SiO_2) и алюминия (Fe_3O_4-Al_2O_3). Магнитные оксиды модифицировались (3-аминопропил) триэтоксисиланом (APTES) для размещения аминогрупп на поверхности, а затем с помощью сшивающего агента (глутарового альдегида, GA) осуществлялось ковалентное связывание GOx. Оба магнитных носителя были синтезированы путем формирования наночастиц магнетита (Fe_3O_4) в результате термического разложения нитрата железа в порах мезопористых оксидов.

Для синтеза магнитного диоксида кремния (Fe_3O_4-SiO_2) использовался коммерческий мезопористый SiO_2 с порами 6 нм, в которых формировались МНЧ. Типичное изображение ПЭМ и рентгенограмма Fe_3O_4-SiO_2 представлены на рисунке 1.

Изображение ПЭМ четко отображает присутствие МНЧ в порах диоксида кремния. Рентгенограмма показывает широкий пик (22), который относится к диоксиду кремния, а также ряд более острых брэгговских пиков, интенсивность и положение которых типичны для шпинели (магнетит).

Для синтеза магнитного оксида алюминия использовался аналогичный подход с использованием коммерчески доступного мезопористого оксида алюминия. Для эффективного формирования МНЧ оксид алюминия предварительно обрабатывался 0,1 М раствором NH_4 OH в течение 12 часов. Изображение ПЭМ и рентгенограмма магнитного оксида алюминия представлены на рисунке 2.

Изображение ПЭМ показывает пористый носитель с небольшими наночастицами магнетита внутри пор. Рентгенограмма сложна из-за кристалличности исходного оксида алюминия. Он показывает набор пиков (обозначены черным), которые относятся к γ-Al_2 O_3, а также несколько (частично перекрывающихся) пиков, которые можно отнести к шпинели Fe_3 O_4.

Для ковалентного присоединения GOx, магнитный носитель первоначально функционализировали аминогруппами с использованием APTES, затем проводили реакцию с GA, после чего было взаимодействие альдегидных групп GA с аминогруппами GOx (схема 2).

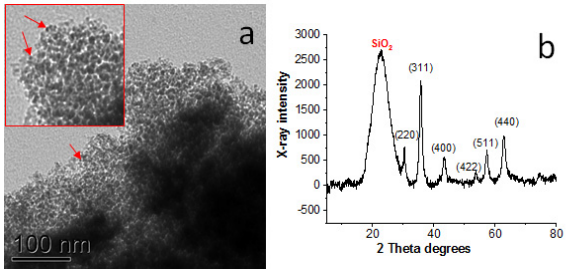

Рисунок 1-ПЭМ-изображение (a) и рентгенограмма (b) Fe3 O4-SiO2. На вставке в (a) показано изображение с большим увеличением. Красные стрелки указывают на наночастицы оксида железа

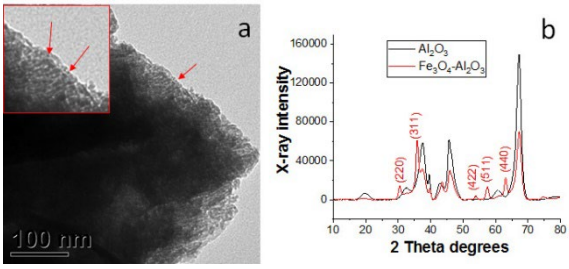

Рисунок 2-ПЭМ-изображение (a) и рентгенограмма (b) Fe3 O4-Al2 O3. На вставке в (a) показано изображение с большим увеличением. Красные стрелки указывают на наночастицы оксида железа

Активность иммобилизованного фермента исследовалась в процессе окисления D-глюкозы. Для характеристики поведения биокатализатора использовался параметр относительной активности, который определяли по формуле: $R = (A_i/A_0)x100$ % ,где A_0 и A_i – активности нативного GOx и иммобилизованного GOx, соответственно.

Все разработанные биокатализаторы были исследованы на окисление D-глюкозы в диапазоне pH 4–8. На рисунке 3 (a) представлена зависимость относительной активности от pH. Для сравнения биокаталитических свойств использовался нативный фермент и GOx, иммобилизованный на исходных (немагнитных) оксидах кремния и алюминия. Зависимость относительной активности для нативного GOx показывает резкий максимум (100 %) при pH 6, тогда как при более высоких и более низких значениях pH относительная активность резко уменьшается. Для всех иммобилизованных биокатализаторов GOx, разработанных в этой работе, относительная активность высока во всем диапазоне pH (рис. 3a). Кроме того, GOx на основе оксида алюминия показывает более низкую относительную активность (82 %), чем GOx на основе оксида кремния (89 %). В случае магнитных носителей, иммобилизованный GOx демонстрирует более высокую относительную активность (90 и 95 % для Fe_3 O_4-Al_2 O_3-GOx и Fe_3 O_4-SiO_2-GOx соответственно). Наилучшая относительная активность 95 % при pH 6 и 7 наблюдалась для Fe_3 O_4-SiO_2-GOx, тогда как нативный GOx в этих условиях показывает только 40 % от активности нативного фермента (100 %).

Влияние температуры на окисление D-глюкозы изучалось в 30–60°C при pH 6 для лучшего сравнения с нативным GOx. Зависимость относительной активности биокатализатора от температуры представлена на рисунке 3 (b). Нативный фермент проявляет максимальную активность при 40° C с последующим резким снижением выхода продукта, что указывает на потерю активности фермента, наиболее вероятную из-за денатурации при более высоких температурах. В случае иммобилизованного GOx, наблюдается более низкая относительная активность на 5–18 % при 40° C (в зависимости от носителя) по сравнению с активностью нативного GOx. С повышением температуры до 50 °C относительная активность значительно увеличивается (на 8–30 %) для иммобилизованного фермента по сравнению с нативным. При 60°C (самая высокая температура, используемая для тестирования биокатализатора в этой работе), нативный фермент теряет около 60 % каталитической активности, в то время как активность биокатализаторовна основе иммобилизованнного GOx снижается только на 4–18 %, в зависимости от типа носителя. Опять же, лучшие результаты были получены для Fe_3 O_4-SiO_2-GOx с относительной активностью 95 % в температурном диапазоне 35–50°C.

Для проверки стабильности магнитоотделяемых биокатализаторов при многократном использовании, проводилось десять последовательных экспериментов окисления D-глюкозы в оптимальных условиях (pH 6 и 40 °C). Биокатализатор был отделен с помощью редкоземельного магнита в течение 30–40 секунд после каждой каталитической реакции и снова использовался в следующем эксперименте. Результаты исследования показали, что для исходного оксида алюминия и диоксида кремния относительная активность уменьшается на 30 и 24 % соответственно после десяти последовательных экспериментов, что согласуется с данными литературы. Для биокатализаторов на основе магнитного оксида алюминия и диоксида кремния относительная активность уменьшается только на 13 и 11 % соответственно после того же количества последовательных реакций, демонстрируя гораздо более высокую стабильность катализатора.

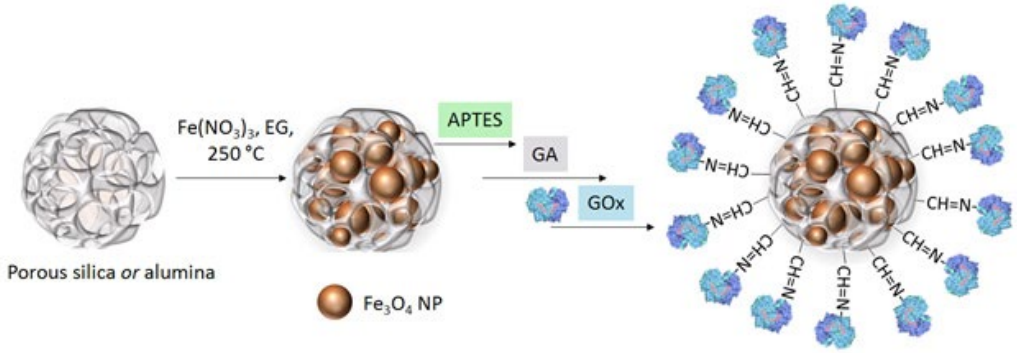

Схема 2-Схема синтеза биокатализатора

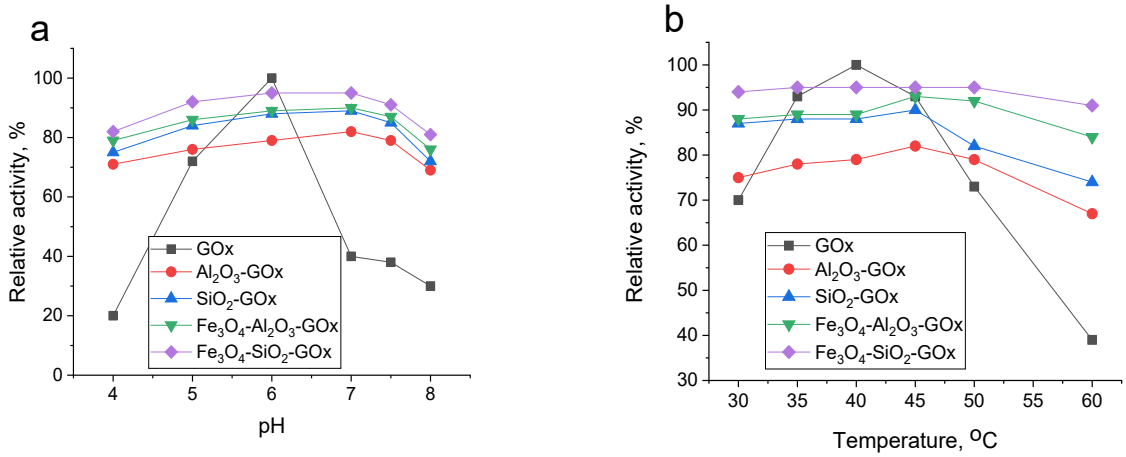

Рисунок 3, Влияние pH (a) и температуры (b) на относительную активность нативного и иммобилизованного GOx.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны высокоэффективные магнитоотделяемые биокатализаторы, путем иммобилизации GOx на мезопористые магнитные оксиды кремния и алюминия. Биокатализаторы были охарактеризованы с использованием физико-химических методов и исследованы в окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Разработанные биокатализаторы показали более высокую каталитическую активность при окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты по сравнению с GOx, иммобилизованным на исходном оксиде алюминия и диоксиде кремния.

Оценивая влияние компонентов носителя на каталитические свойства, показана корреляция между структурой и свойствами носителя и выявляние синергизма от комбинации GOx и оксида железа в биокатализаторе. Высокая стабильность Fe_3O_4-SiO_2-GOx и легкость отделения от реакционного раствора в сочетании с исключительной активностью в широком диапазоне pH и температуры делает этот катализатор перспективным для практического применения.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований (грант № 18–08–00468) и Российский научный фонд (проект № 19–79–00134) за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

Pal, P.; Kumar, R.; Banerjee, S., Manufacture of Gluconic Acid: A ReviewTowards Process Intensification for Green Production. Chem. Eng. Process. 2016, 104, 160–171.
Mohamad, N.R.; Marzuki, N.H.; Buang, N.A.; Huyop, F.; Wahab, R.A., Review; Agriculture and Environmental Biotechnology. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. Biotechnol. Biotec. Eq. 2015, 29, 205–220.
Ahmad, R.; Sardar, M., Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. Biochem. Anal. Biochem. 2015, 4, 1–8.
Chen, S.; Wen, L.; Svec, F.; Tan, T.; Lv, Y., Magnetic metal–organic frameworks as scaffolds for spatial co-location and positional assembly of multi-enzyme systems enabling enhanced cascade biocatalysis. RSC Adv. 2017, 7, 21205–21213.
Sulman, E.M.; Matveeva, V.G.; Bronstein, L.M., Design of biocatalysts for efficient catalytic processes. Current Opinion in Chemical Engineering. 2019, 26, 1–8.
Drout, R.J.; Robison, L.; Farha, O.K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal-organic frameworks, Coord. Chem. Rev. 2019, 381, 151–160.
Sheldon, R.A.; Brady, D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. Chem. Commun. 2018, 54, 6088–6104.
Bilal, M.; Asgher, M.; Shah, S.Z.H.; Iqbal, H.M.N. Engineering enzyme-coupled hybrid nanoflowers: The quest for optimum performance to meet biocatalytic challenges and opportunities. Int. J. Biol. Macromol. 2019, 135, 677–690.
Тихонов, Б.Б.; Сульман, Э.М.; Стадольникова, П.Ю.; Сульман, А.М.; Голикова, Е.П.; Сидоров, А.И.; Матвеева, В.Г. Катализ в промышленности, 2019, 19(1), 59–72.
Vranish, J.N.; Ancona, M.G.; Walper, S.A.; Medintz, I.L. Pursuing the Promise of Enzymatic Enhancement with Nanoparticle Assemblies. Langmuir, 2018, 34, 2901–2925.
Devine, P.N.; Howard, R.M.; Kumar, R.; Thompson, M.P.; Matthew D.; Truppo, M.D.; Turner, N.J. Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development. Nature Rev. Chem., 2018, 2, 409–421.
Kobayashi, Y.; Kohara, K.; Kiuchi, Y.; Onoda, H.; Shoji, O.; Yamaguchi, H. Control of microenvironment around enzymes by hydrogels. Chem. Commun., 2020, 56, 6723–6726.
Gao, L.; Fan, K.; Yan, X., Iron Oxide Nanozyme: A Multifunctional Enzyme Mimetic for Biomedical Applications. Theranostics 2017, 7, 3207–3227.
Uc-Cayetano, E.G.; Ordóñez, L.C.; Cauich-Rodríguez, J.V.; Avilés, F., Enhancement of Electrochemical Glucose Sensing by Using Multiwall Carbon Nanotubes decorated with Iron Oxide Nanoparticles. Int. J. Electrochem. Sci. 2016, 11, 6356 – 6369.
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, 12, 20982–20990.
Shen, H.; Song, J.; Zhou, Z.; Li, M.; Zhang, R.; Su, P.; Yang, Y. DNA-Directed Immobilized Enzymes on Recoverable Magnetic Nanoparticles Shielded in Nucleotide Coordinated Polymers, Ind. Eng. Chem. Res., 2019, 58, 8585–8596.
Hilterhaus, L.; Liese, A.; Kettling, U.; Antranikian, G., Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2016; p 429.
Wang, Y.; Nor, Y.A.; Song, H.; Yang, Y.; Xu, C.; Yu, M.; Yu, C., Small-sized and large-pore dendritic mesoporous silica nanoparticles enhance antimicrobial enzyme delivery. J. Mater. Chem. B 2016, 4, 2646–2653.
Gonzalez-Delgado, I.; Segura, Y.; Martin, A.; Lopez-Munoz, M. – J.; Morales, G., β-galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). Microporous Mesoporous Mater. 2018, 257, 51–61.
Santos, K.M.A.; Albuquerque, E.M.; Innocenti, G.; Borges, L.E.P.; Sievers, C.; Fraga, M.A., The Role of Bronsted and Water-Tolerant Lewis Acid Sites in the Cascade Aqueous-Phase Reaction of Triose to Lactic Acid. ChemCatChem 2019,11, 3054–3063.
Liu, J.; He, Y.; Yan, L.; Li, K.; Zhang, C.; Xiang, H.; Wen, X.; Li, Y., Nano-sized ZrO2 derived from metal-organic frameworks and their catalytic performance for aromatic synthesis from syngas. Catal. Sci. Technol. 2019,9, 2982–2992.