

УДК: 66.094.3.098.

## ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СВОЙСТВА-СТРОЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИЦЫ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

*Н.В. Лакина<sup>1</sup>, В.Ю. Долуда<sup>1</sup>, В.Г. Матвеева<sup>1</sup>, Г.Ю. Рабинович<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Тверской государственный университет, Тверь, Россия

<sup>2</sup> ВНИИ меллиорированных земель, Тверь, Россия

В настоящее время большую популярность получают способы получения электричества с использованием механизмов живой природы. Этим занимается научное и прикладное направление энергетики, занимающееся получением энергии с использованием принципов живой природы, иначе называемое биоэнергетика. Все идеи связанные с этим направлением реализуются путем переработки экологически безопасных, неиссякаемых и недорогих биологических веществ. В качестве биокатализаторов могут быть использованы ферменты или даже целые клетки или их органеллы. Несмотря на большие потенциальные возможности использования иммобилизованных ферментов в производстве, в настоящее время реализованы лишь немногие [1].

Ферментативные биотопливные элементы представляют собой биоэлектронные устройства, которые используют ферменты оксидоредуктазы для катализа превращения химической энергии в электрическую. Одним из распространенных примеров биоэлектронного устройства является ферментный биотопливный элемент [2].

Получение ферментативных биотопливных элементов – достаточно трудоемкая процедура. Для их конструирования нужно учесть множество факторов: условия протекания реакции, pH буферных смесей, при которых ферменты будут более активны, затем подобрать такие ферментативные системы, сочетание которых будет давать наилучший результат.

При этом глюкооксидаза (GOx) является одним из наиболее широко используемых ферментов для анодного окисления глюкозы в присутствии пероксидазы (HRP) с выделением пероксида водорода. Пероксидаза (HRP) является ферментом, катализирующим окислительно-восстановительные реакции в присутствии пероксида водорода, который выступает в качестве акцептора электронов, многих видов органических субстратов за счет высвобождения кислорода [3].

GOx катализирует с высокой селективностью окисление β-D-глюкозы до глюконолактона с помощью процесса переноса  $2e^-$  и  $2H^+$  и регенерирует себя путем восстановления кислорода до пероксида водорода. Этот побочный продукт часто рассматривается как недостаток в применении биотоплива в клетках из-за его токсичности и денатурации белков. Однако используют HRP в качестве катализатора для восстановления пероксида водорода [4].

В восстановительной половине реакции GOX катализирует окисление β-D-глюкозы до D-глюконо-1,5-лактона, который не ферментативно гидролизуется до глюконовой кислоты. Впоследствии флавинадениндуклеотидное (ФАД) кольцо GOx восстанавливается до ФАДН<sub>2</sub>. В окислительной половине реакции восстановленный GOx переокисляется кислородом с образованием перекиси водорода. Перекись водорода расщепляется каталазой с образованием воды и кислорода. Это служит доказательством, что фермент лактоназа отвечает за катализ гидролиза D-глюконо-1,5-лактона до глюконовой кислоты (рисунок 1) [5]. Однако присутствие лактоназы не является ключевым, так как стадия гидролиза происходит самопроизвольно, но с более низкой скоростью.

Реакции, катализируемые окислительно-восстановительным комплексом ферментов, приведены на схемах (1,2).



Цель работы – изучение зависимости свойств окислительно-восстановительных ферментов, иммобилизованные в полимерные матрицы поливинилпирролидона (ПВП), ацетилцеллюлозы (АЦТ) и полиакрилонитрила (ПАН), от их химического строения.

В данной работе выбор носителя – поливинилпирролидона (ПВП) – обусловлен прежде всего его высокой механической прочностью и химической стабильностью, наличием высокорекционноспособных ионогенных групп (ОН-), что делает возможным модификацию носителя различными функциональными группами.

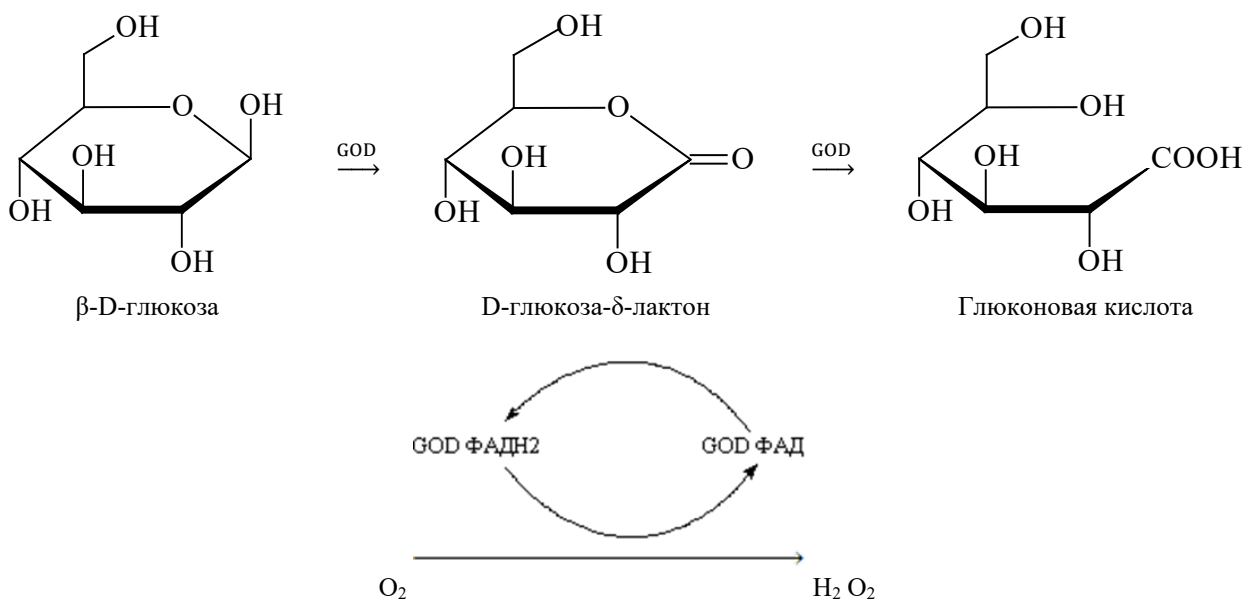


Рисунок 1. Реакция окисления  $\beta$ -D-глюкозы до глюконовой кислоты в присутствии фермента GOX

Хитозан (Хит) широко используется в каталитических процессах, катализируемых оксидоредуктазами, причем как в качестве носителя, так и в качестве коагулянта и защитной добавки для предотвращения инактивации фермента. Наиболее важным свойством хитозана является наличие аминогрупп, которые, во-первых, позволяют использовать его при ковалентной иммобилизации ферментов, во-вторых, обуславливают высокую адсорбционную способность хитозана по отношению к хинонам, являющимся продуктами реакции окисления многих фенолов, защищая тем самым активный центр фермента от инактивации. В то же время, многими исследователями была доказана неэффективность использования чистого хитозана в качестве носителя для иммобилизации из-за его растворимость исключительно в кислой среде и высокой способности к гелеобразованию.

Глутаровый диальдегид (Glu) является наиболее широко используемым активатором для ковалентной иммобилизации ферментов, при этом в механизме сшивки носителя с ферментом участвуют различные функциональные группы фермента: аминогруппы – в случае с глутаровым альдегидом. Применение глутарового альдегида основано на образовании в слабощелочной среде азометиновой связи (-CH=N-) в реакции альдегида с аминогруппами белковой части фермента и хитозана, присоединенного по донорно-акцепторному механизму к поверхности катионита.

В качестве субстрата для реакции окисления выбор ABTS – обусловлен достаточно широким применением этого соединения в различных областях промышленности (пирокатехин используется для синтеза красителей), а также тем, что для этого субстрата хорошо изучены механизмы его окисления оксидоредуктазами. Также необходимо отметить, что строение и свойства этого субстрата (в частности присутствие дополнительной гидроксильной группы, связанной с ядром) оказывает существенное влияние на ход процесса его ферментативного окисления и резко изменяет отношение ароматического ядра к окислителям [6].

Методы синтеза полимерных матриц и проведения иммобилизации комплекса ферментов пероксидазы (HRP) и глюкооксидазы (GOx)

**Метод иммобилизации ферментов в матрицу поливинилпиролидона (ПВП).**

К 10.0 г. 40 %-ного водного раствора ПВП добавили 10.0 г. 2 %-ного водного раствора хитозана. Смесь перемешивали в течение одной минуты до гелеобразного состояния. Гель при помещении в среду с избытком воды или соли при комнатной температуре абсорбирует дополнительную жидкость, но не растворяется и не разрушается. К 10 мл полученного геля добавили 1 мл глутарового диальдегида (Glu) 0.1 % и перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 6 часов. Из полученного полимерного геля готовили пленку толщиной 1 мм. Высушивали на воздухе, затем добавляли ацетатный буферный раствор фермента пероксидазы (0.01 г./л) и выдерживали в течение 12 часов. Тщательно промыли буферным раствором до отсутствия реакции на нингидрин, свидетельствующей о наличии белка в растворе. Исследуемый образец фермента обозначили в работе ПВП/Хит/Glu/HRP/GOX.

**Метод иммобилизации ферментов в матрицу ацетилцеллюлозы (АЦТ).**

1 г ацетилцеллюлозы растворяли в 20 мл полиэтиленгликоля в течение 24 часов при  $t=60^{\circ}\text{C}$ , в качестве нерастворителя (осадителя) использовали глицерин в объеме 30 мл. Смесь охладили, отфильтровали, из полученного полимерного геля сформировали пленку толщиной 1 мм. Полученную ацетилцеллюлозную пленку пропитали раствором хитозана 2 % в течении 6 часов, промыли дистиллированной водой и высушили. Затем полученную полимерную матрицу выдерживали в растворе глутарового диальдегида (Glu) 0.1 %, объемом 50 мл, в течение 6 часов, тщательно промыли и высушили на воздухе. Полученную модифицированную полимерную матрицу выдерживали в течение 12 часов в 100 мл ацетатного буферного раствора фермента пероксидазы (0,01 г./л). Тщательно промыли буферным раствором до отсутствия реакции на нингидрин, свидетельствующей о наличии белка в растворе. Таким образом получили иммобилизованный фермент в матрице АЦТ. Исследуемый образец фермента обозначили в работе АЦТ / Хит/Glu/HRP/GOX.

**Метод иммобилизации ферментов в матрицу полиакрилонитрила (ПАН).**

1 г полиакрилонитрила нагревали до полного расплавления при  $t=90^{\circ}\text{C}$ , из полученного полимерного геля сформировали пленку толщиной 1 мм, высушили на воздухе. Далее проводили все стадии модификации, как и при получении АЦТ / Хит/Glu/HRP. Исследуемый образец фермента обозначили в работе ПАН / Хит/Glu/HRP/GOX.

Реакционная смесь содержала 0.36 мМ АВТС и 5 мМ D-глюкозы в случае изучения ферментного комплекса) в 0.1 М Na-ацетатном буфере. Скорость реакции определяли по изменению поглощения при 405 нм, используя коэффициент экстинкции окисленного АВТС  $36.8\text{ мМ}^{-1}\text{ см}^{-1}$ . Измерения проводили спектрофотометрическим методом с помощью спектрофотометра UV/VIS Excellence.

Для определения активности полученного ферментативного комплекса по АВТС при варьировании рН от 3.05 до 8.45 проводили разбавление АВТС в пределах концентраций  $0.87 - 3.47 \times 10^{-3}$  моль/л. Для этого отбирали 1 мл раствора АВТС и добавляют 2 мл ацетатного буфера. Затем методом последовательного разбавления готовили разведения. После этого в каждую пробирку добавляли 1 мл раствора комплекса ферментов GOX:HRP. Непосредственно перед началом измерения оптической плотности вносили в кювету (толщина кюветы 1 см) 1 мл раствора D-глюкозы 0.026 моль/л.

За единицу активности ферментного комплекса принимали такое его количество, которое превращает 1.0 ммоль АВТС в минуту. Полученное значение активности комплекса пересчитывали на удельную активность относительно нативной формы ферментов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ****Исследование влияния рН раствора АВТС на активность иммобилизованных ферментов**

В процессе выполнения исследования были исследованы образцы:

1) нативного ферментативного комплекса (HRP/GOx), 2) ферментативного комплекса, иммобилизованного на модифицированную хитозаном полимерную матрицу поливинилпирролидона с помощью глутарового диальдегида (ПВП / Хит/Glu/HRP/GOx), 3) ферментативного комплекса, иммобилизованного на модифицированную хитозаном полимерную матрицу ацетилцеллюлозы с помощью глутарового диальдегида (АЦТ / Хит/Glu/HRP/GOx), 4) ферментативного комплекса, иммобилизованного на модифицированную хитозаном полимерную матрицу полиакрилонитрила с помощью глутарового диальдегида (ПАН / Хит/Glu/HRP/GOx). Для получения заданного значения рН использовались ацетатные буферные растворы. Полученные данные представлены на рисунке 2.

Полученные данные показывают, что максимальная активность нативного ферментного комплекса (HRP/GOx) наблюдается при рН 6.5–7.2. При рН ниже 6 и выше 8 активность биокатализатора сильно уменьшается. Показано, что в диапазоне рН = 5.0–8.5 для иммобилизованных ферментов наблюдается наибольшее увеличение каталитической активности, в то время как для свободных ферментов увеличение концентрации продуктов реакции окисления АВТС+ с меньшей скоростью. Полученные данные подтверждают литературные данные об увеличении лабильности ферментов к изменениям рН при их иммобилизации. Полученные данные можно объяснить изменением мобильности третичной структуры, обусловленной определенной локализацией заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы фермента, что затрудняет образование фермент-субстратного комплекса. Для свободных ферментов мобильность поверхностных зарядов увеличивается за счет изменения конформации молекулы, что сопровождается значительным увеличением каталитической активности по сравнению с иммобилизованными ферментами.

**Исследование стабильности ферментативного комплекса**

Для оценки стабильности полученных образцов биокатализаторов было выполнено 10 рециклов реакций окисления глюкозы с использованием в качестве индикатора ABTS с участием биокатализаторов. Определена зависимость значений активности образцов биокатализаторов от количества рециклов биокаталитической окислительно-восстановительной реакции.

Полученные данные представлены на рисунке 3.

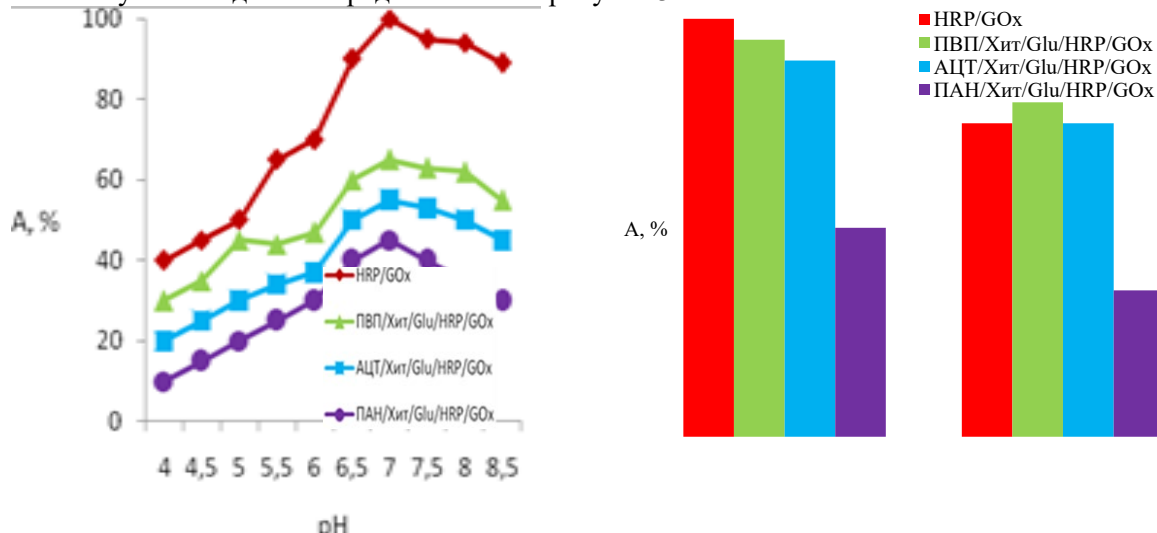


Рисунок 2. Зависимость активности нативного и иммобилизованного ферментного комплекса ферментов от pH реакционного раствора, где А, % – активность ферментного комплекса в %

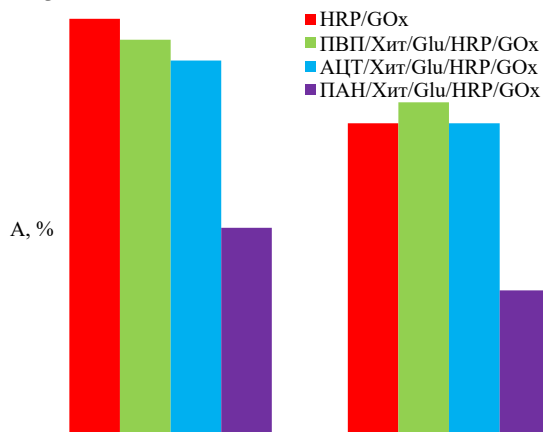


Рисунок 3. Изменение активности биокатализаторов на основе ферментного комплекса после 10 рециклов (1 – начальная активность, 2 – активность после 10 рециклов)

Из данных диаграммы видно, что наиболее эффективной биокаталитической системой является система, приготовленная с использованием ПВП, так как в данной системе иммобилизация пероксидазы (глюкооксидазы) прошла более успешно. Это можно объяснить наибольшим количеством доступных для субстрата активных центров фермента, которое определяется степенью приемлемости структурной решетки и окружением функциональных групп для удержания фермента в полимерной матрице ПВП в отличие от матриц АЦТ и ПАН.

Также, можно отметить, что окислительно-восстановительные ферментные системы, включенные в полимерные матрицы проявляют высокую каталитическую активность по отношению к своим специфическим субстратам. Для наиболее активной ферментной системы на основе HRP константа Михаэлиса составила 14 мМоль/л, а для наиболее активной ферментной системы на основе GOx константа Михаэлиса составила 16 мМоль/л.

Полученные данные позволяют выделить наиболее эффективные полимерные носители на основе поливинилпирролидона и ацетилцеллюлозы. Данный факт можно объяснить более выгодным соотношением размерностей наносимых ферментов и пор изучаемых полимерных сеток.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-08-00186).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. Вводный курс и применение в биотехнологии. – М.: Мир, 1983. – 213 с.
2. Toher J. et al. Stability properties of two supports for immobilization of enzymes. Biochem. SOC. Trans. 2016. 18: 313–314.
3. Guisan, Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells / Guisan, M. Jose. – Second Edition, 2016.
4. Elouarzaki, K. [et. al.] Freestanding HRP–GOx redox buckypaper as an oxygen-reducing biocathode for biofuel cell applications // Energy Environ. Sci. – 2015. – V. 8, p. 2069–2074.
5. Hyun, K.H. et al. Fabrication of biofuel cell containing enzyme catalyst immobilized by layer-by-layer method // J. Power Sources – 2015. – Vol. 286, p. 197–203.
6. Rasmussen M., [et al.]. Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancement // Biosensors and Bioelectronics – 2016 – Vol. 76, p. 91–102.