

УДК 577.15

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ  
НА ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРАХ****Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева, М.Г. Сульман***Тверской государственной технической университет», Тверь, Россия*

Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4;  $\beta$ -D-глюкоза: кислород оксидоредуктаза) – димерный флавопротеин, состоящий из 2 идентичных полипептидных цепей, ковалентно связанных между собой с помощью дисульфидных связей [1]. Фермент содержит 2 молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД) в качестве кофермента (по одной на каждую субъединицу белковой молекулы) [2]. Глюкозооксидазу выделяют из различных грибов, преимущественно принадлежащих к родам *Aspergillus* и *Penicillium*; молекулярный вес фермента из разных источников варьируется от 130 до 175 кДа; оптимум pH для глюкозооксидазы из грибов варьируется в пределах от 4.0 до 7.0; фермент нестабилен при температурах выше 40 °C [2]. Глюкозооксидаза катализирует окисление  $\beta$ -D-глюкозы до D-глюконо- $\delta$ -лактона ( $\delta$ -глюконо – 1,5 – лактона) и  $H_2 O_2$  с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [1].

Глюкозооксидаза в последние десятилетия широко применяется в свободном или иммобилизованном виде в различных отраслях промышленности – химической, фармацевтической, пищевой, а также клинической и аналитической химии [3]. Благодаря достаточно низкой стоимости и высокой стабильности, глюкозооксидаза эффективно применяется в составе аналитических реагентов и биосенсоров для определения содержания глюкозы; в органическом синтезе глюкозооксидаза используется для коммерческого получения глюконовой кислоты – пищевой добавки и компонента лекарственных средств [2].

Во многих процессах целесообразнее использовать иммобилизованные формы глюкозооксидазы, что позволяет существенно повысить ее устойчивость к ингибирующим воздействиям, а также обеспечить возможность многократного использования биокатализатора [4]. Опубликован целый ряд работ, описывающих успешный опыт иммобилизации глюкозооксидазы на различных твердых носителях [3]. Среди наиболее перспективных носителей для иммобилизации глюкозооксидазы особое место занимают модифицированные различными способами биodeградируемые и экологически безопасные биополимеры. В частности, Dong и др. иммобилизовали глюкозооксидазу на модифицированном L-лизинном хитозане, имеющем увеличенную специфическую площадь поверхности, что существенно повысило операционную стабильность и термоустойчивость фермента [5]. В работе Wang и др. глюкозооксидаза была инкапсулирована в микросферах из альгината кальция и хитозана с использованием последовательного эмульгирования эмульсификации и внутреннего гелеобразования и покрытия микросфер хитозаном для последующего использования иммобилизованного фермента в качестве улучшителя муки [6]. Tang и др. иммобилизовали глюкозооксидазу на частицах «хитозан-триполифосфат натрия» и также использовали ее для улучшения хлебопекарных свойств пшеничной муки [7].

В связи с этим, целью данной работы было определение основных закономерностей иммобилизации глюкозооксидазы на природных биополимерах

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Для иммобилизации глюкозооксидазы были синтезированы 2 типа носителей на основе альгината натрия:

1) Макросферы: 10 мл раствора 1,5 %-ного раствора альгината натрия по капле через шприц вносили в 100 мл 1,5 %-ного раствора хлорида кальция, в результате чего образовывались шарики диаметром 2–2,5 мм. Они выдерживались в растворе 2 минуты, после чего промывались дистиллированной водой. Полученные макросферы выдерживались в течение 12 часов в 50 мл раствора, содержащего 0,394 г. карбодиимида и 0,144 г. N-гидроксисукцинимид. Далее они были промыты дистиллированной водой, выдержаны в течение 6 часов в растворе глюкозооксидазы (25 мг в 50 мл фосфатного буферного раствора с pH = 6,0), снова промыты дистиллированной водой и хранились до проведения экспериментов в холодильнике при температуре  $3\pm 1$  °C.

2) Микросферы: для их получения использовался модифицированный метод внутреннего гелеобразования раствора альгината натрия, превращенного в эмульсию в растительном масле [6]. 0,08 г. микрокристаллического порошка  $\text{CaCO}_3$  добавляли в 20 мл 1,5 % раствора альгината натрия (0,3 г в 20 мл воды) при постоянном перемешивании. Полученная суспензия диспергировалась в 40 мл подсолнечного масла, содержащего Span 80 (2 % об.) и интенсивно перемешивалась в течение 2 минут. После эмульгирования в смесь добавлялось 30 мл подсолнечного масла, содержащего 2 % (об.) Span 80 и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивное перемешивание продолжалось в течение 10 минут. Далее в смесь добавляли 150 мл дистиллированной воды, и перемешивание продолжалось при меньшей интенсивности в течение 30 минут. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных шариков от масляной фазы добавляли 250 мл 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждали из масляной фазы, масло удаляли из системы путем декантации. Далее осадок альгинатных микросфер промывали 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Микрочастицы отмывали несколько раз с водой до полного удаления следов масла.

Для определения активности микросферы с нанесенной глюкозооксидазой были смешаны с 40 мл раствора глюкозы (2,2 ммоль/л) и проводилась реакция окисления при постоянном перемешивании при температуре 25 °С в течение 60 минут с периодическим отбором пробы из реакционной смеси микропипеткой. Показателем активности глюкозооксидазы была концентрация пероксида водорода в реакционной смеси, которая определялась описанным ранее методом [8], основанном на взаимодействии образующегося в реакции пероксида водорода с йодидом калия в кислой среде и фотометрировании образующегося синего комплекса «йод-крахмал». В кювету спектрофотометра СФ-2000 вносили микропипеткой 10 мкл реакционной смеси, после чего строго последовательно добавляли 2,0 мл раствора  $\text{HCl}$  (0,05 н.), 0,2 мл раствора  $\text{KI}$  (16,6 % масс.), 0,2 мл раствора молибдата аммония (0,12 % масс.), 0,2 мл раствора крахмала Линтнера (5 %) и через 3 минуты измеряли оптическую плотность смеси относительно дистиллированной воды при длине волны 570 нм.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был построен калибровочный график по стандартным растворам  $\text{H}_2\text{O}_2$ , приготовленным методом последовательного разбавления (рисунок 1).

Полученные значения оптической плотности для каждой отобранной пробы пересчитывались в концентрации пероксида водорода с помощью калибровочного графика. Ход реакции в виде изменения концентрации образующегося пероксида водорода во времени для свободной глюкозооксидазы представлен на рисунке 2, для иммобилизованной на альгинатных макросферах – на рисунке 3, для иммобилизованной на альгинатных микросферах – на рисунке 4.

Из рисунков 2–4 видно, что иммобилизованные препараты глюкозооксидазы обладают гораздо меньшей активностью по сравнению с ее свободной формой, что связано прежде всего с гетерогенизацией процесса, а также с потерями фермента во время иммобилизации. Однако иммобилизация позволяет легко отделить фермент от реакционной среды и использовать его повторно, что компенсирует потерю активности при однократном использовании. Кроме того, как показали эксперименты, иммобилизация на альгинатных микро- и макросферах немного расширила оптимальные диапазоны температуры и значений рН по сравнению с растворимой формой фермента, что свидетельствует о более высокой устойчивости синтезированных биокатализаторов к ингибирующим воздействиям.

На основании проведенных экспериментов были выявлены следующие основные аспекты, влияющие на эффективность исследуемого процесса:

1) Одним из важнейших параметров, влияющих на успешность иммобилизации ферментов на альгинатных сферах, является размер частиц. Оптимальный для использования диаметр макросфер – не более 2 мм. При увеличении диаметра существенно увеличивается «мертвый объем» макросфер, в котором не осуществляется реакция из-за отсутствия в нем молекул фермента. Уменьшение размера макросфер менее 2 мм практически неосуществимо из-за особенностей капельного метода. Для микросфер при увеличении размера более 100 мкм происходит их агрегирование и образование крупных кластеров, которые также увеличивают неиспользуемый объем системы, что существенно снижает эффективность процесса.

2) Для ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы на сферах из альгината натрия целесообразно использовать карбоксильные группы молекул альгината натрия, для активации которых используются карбодиимид и N-гидроксисукцинимид. Схема активации карбоксильных групп альгината натрия представлена на рисунке 5.

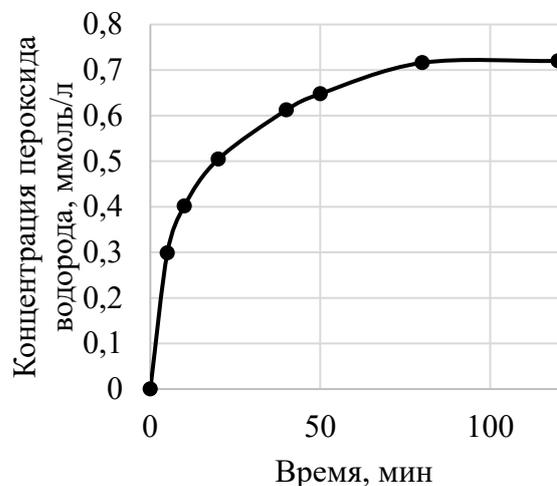
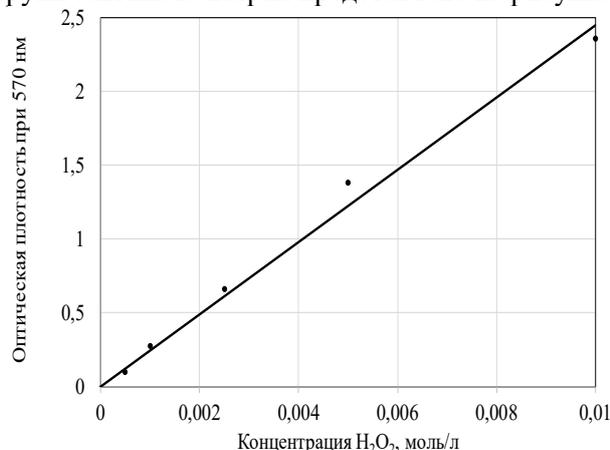


Рисунок 1 – Калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода

Рисунок 2 – Ход реакции окисления глюкозы свободной глюкозооксидазой

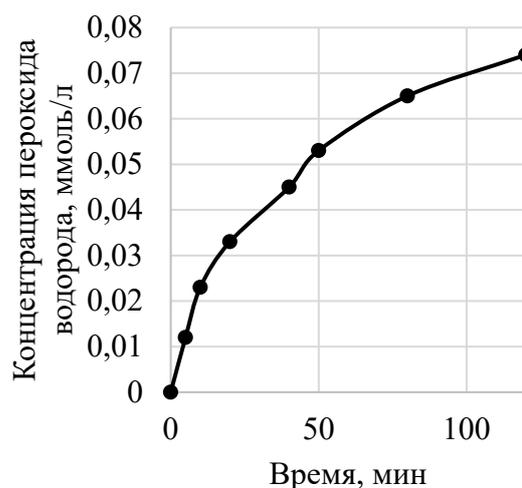
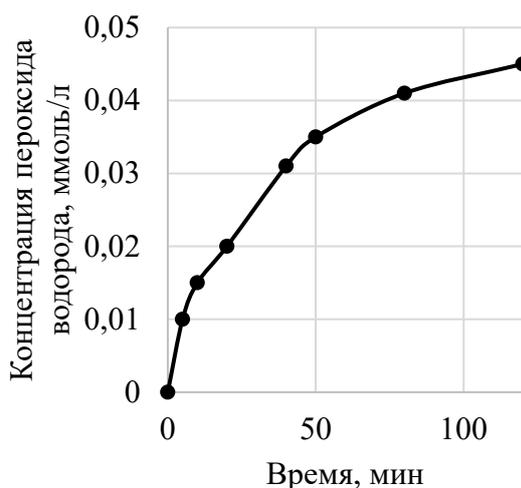


Рисунок 3 – Ход реакции окисления глюкозы иммобилизованной на альгинатных макросферах глюкозооксидазой

Рисунок 4 – Ход реакции окисления глюкозы иммобилизованной на альгинатных микросферах глюкозооксидазой

В результате образуется прочная ковалентная связь молекул альгината натрия с молекулами фермента. Использование дополнительной модификации альгинатных сфер для получения других функциональных групп на поверхности (например, аминогрупп – с помощью глутарового диальдегида) нецелесообразно из-за усложнения системы и внесения в ее состав опасных реагентов, что может исключить ее использование в пищевой и фармацевтической промышленности.

3) В качестве источника глюкозооксидазы могут быть использованы только плесневые грибы *Aspergillus niger*, так как использование глюкозооксидазы из других микробиологических источников в пищевых технологиях запрещено.

4) Для повышения устойчивости биокатализаторов к ингибирующим воздействиям микро- и макросферы из альгината натрия (полианиона) могут быть покрыты оболочкой природных поликатионов (например – хитозана). Такие системы могут быть использованы, в частности, в качестве систем доставки лекарств в определенные отделы желудочно-кишечного тракта.

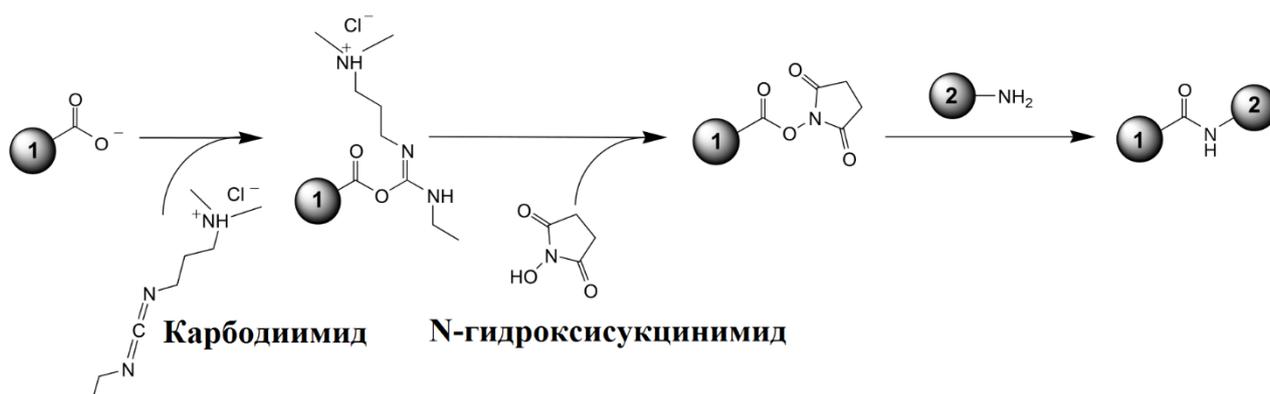


Рисунок 5 – Схема активации карбоксильных групп альгината натрия карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом.

5) Также разработанные биокатализаторы могут быть эффективно использованы в качестве биосенсоров для определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях (после построения калибровочного графика по стандартным растворам глюкозы).

6) Все стадии синтеза биокатализаторов целесообразно проводить при комнатной температуре, так как повышение температуры может привести к необратимым изменениям в структуре биополимеров и ферментов, являющихся компонентами биокатализаторов, что отрицательно скажется на активности и стабильности синтезируемых биокатализаторов. Также, во избежание необратимого ингибирования биокатализаторов ионами металлов и органическими соединениями, при синтезе биокатализаторов важно использовать чистую посуду и инструменты.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования доказали эффективность иммобилизации глюкозооксидазы на микро- и макросферах из альгината натрия, карбоксильные группы которого активированы карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом. Разработанные биокатализаторы могут быть использованы в пищевой промышленности качестве хлебопекарных улучшителей, в химической промышленности для получения глюконовой кислоты и в аналитической химии для определения концентрации глюкозы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-08-00424)*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson R., Turner A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme // *Biosens. Bioel.* 1992. Vol. 7. pp. 165–185.
2. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. Glucose oxidase – An overview // *Biotech. Adv.* 2009. Vol. 27. pp. 489–501.
3. Tikhonov B., Sulman E., Stadol'nikova P., Sulman A., Golikova E., Sidorov A., Matveeva V., Immobilized enzymes from the class of oxidoreductases in technological processes: a review // *Catalysis in Industry.* 2019. Vol. 11. P. 251–263.
4. Schmidt A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow // *Nature.* 2001. Vol. 409. pp. 258–268.
5. Dong L.C., Wang G., Xiao Y., Xu Y., Zhou X., Jiang H., Luo Q. Immobilization of Glucose Oxidase on a Novel Crosslinked Chitosan Support Grafted with L-Lysine Spacers // *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2011. Vol. 25 (3). P. 395–402.
6. Wang X., Zhu K. – X., Zhou H. – M. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules // *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 3042–3054.
7. Tang L., Yang R., Hua X., Yu C., Zhang W., Zhao W. Preparation of immobilized glucose oxidase and its application in improving breadmaking quality of commercial wheat flour // *Food Chemistry.* 2014. Vol. 161. P. 1–7.
8. Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Метод определения активности глюкозооксидазы // Сборник трудов девятой международной научной конференции «Химическая термодинамика и кинетика, Тверь, 2019, с. 336–337.