

УДК 577.152.1

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ХИТОЗАНОМ И ТРИПОЛИФОСФАТОМ НАТРИЯ**Б.Б. Тихонов¹, Д.Р. Лисичкин¹, В.Г. Матвеева¹, М.Г. Сульман¹, А. Sh. Desai², J.C.S. dos Santos³***ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия**Аграрный университет им. доктора Баласахей Савант Конкан Криши Видьяпит (DBSKKV), Дапולי, штат Махараштра, Индия**Университет международной интеграции афро-бразильской лузофонии (UNILAB), Бразилия*

Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4) – фермент класса оксидоредуктаз, димерный флавопротеин, который катализирует окисление β-D-глюкозы до D-глюконо-δ-лактона и пероксида водорода с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [1]. Данный фермент успешно используется в широком диапазоне процессов химической технологии и аналитической химии. Однако применение свободной формы фермента чаще всего нецелесообразно и экономически невыгодно вследствие ингибирующих воздействий на активный центр фермента и невозможности его многократного использования.

Иммобилизация глюкозооксидазы на твердых носителях увеличивает устойчивость фермента к ингибирующим воздействиям, укрепляет его конформацию, а также дает возможность многократно использовать, легко отделяя его от реакционной среды. В настоящее время среди наиболее перспективных носителей для иммобилизации ферментов выделяют носители, обладающие магнитными свойствами, которые отделяются практически без потерь от реакционной среды с помощью постоянного магнита.

В данном исследовании был синтезирован биокатализатор на основе глюкозооксидазы и магнитных наночастиц F_3O_4 , модифицированных хитозаном и триполифосфатом натрия и изучены его каталитические свойства.

Для синтеза наночастиц смешивали 15 мл раствора $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (2,162 г. в 15 мл дистиллированной воды) и 15 мл раствора $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,792 г. в 15 мл дистиллированной воды) в стеклянном реакторе объемом с рубашкой, оборудованном обратным холодильником, входом для подачи аммиака водного и магнитной мешалкой. Смесь перемешивали 15 минут со скоростью 400 мин⁻¹, после чего температуру в реакторе повышали до 65 °С, перемешивали ее еще 15 минут, после чего добавляли по каплям со скоростью 2 мл/мин 10 мл раствора аммиака водного. После окончания дозирования реакцию проводили в течение еще 15 мин. Далее в смесь добавляли 10 мл раствора хитозана (0,01–0,2 г в 10 мл 2Н уксусной кислоты) и перемешивали ее в течение 15 минут. По окончании реакции частицы извлекали с использованием постоянного магнита и несколько раз промывали дистиллированной водой. Для сшивки хитозана на поверхности магнитных частиц их выдерживали в течение 1 часа в растворе триполифосфата натрия (0,05 г. в 50 мл дистиллированной воды), после чего частицы снова несколько раз промывали дистиллированной водой, извлекали с использованием постоянного магнита и высушивали на воздухе.

Для иммобилизации глюкозооксидазы на синтезированных магнитных частицах 0,25 г. высушенных до постоянной массы частиц выдерживали в течение 12 часов в смеси, содержащей 0,1 г карбодиимиды, 0,04 г. N-гидроксисукцинимиды и 10 мг глюкозооксидазы. Синтезированный биокатализатор несколько раз промывали дистиллированной водой, извлекали с использованием постоянного магнита и высушивали на воздухе.

Активность и стабильность синтезированного биокатализатора исследовалась в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконолактона в термостатируемом стеклянном реакторе при постоянном перемешивании (300 мин⁻¹) при температуре 25 °С в течение 60 минут с периодическим отбором пробы из реакционной смеси. Показателем активности глюкозооксидазы является количество образующегося пероксида водорода (эквивалентно прореагировавшей D-глюкозы) в реакционной смеси. Содержание пероксида водорода определялось иодометрически по фотометрированию образующегося синего комплекса йод-крахмал [2].

Были проведены эксперименты по варьированию начальной концентрации D-глюкозы от 2,2 до 22 ммоль/л. Ход реакции в виде зависимости концентрации пероксида водорода от времени для свободной и иммобилизованной форм глюкозооксидазы представлен на Рис. 1 и 2, соответственно.

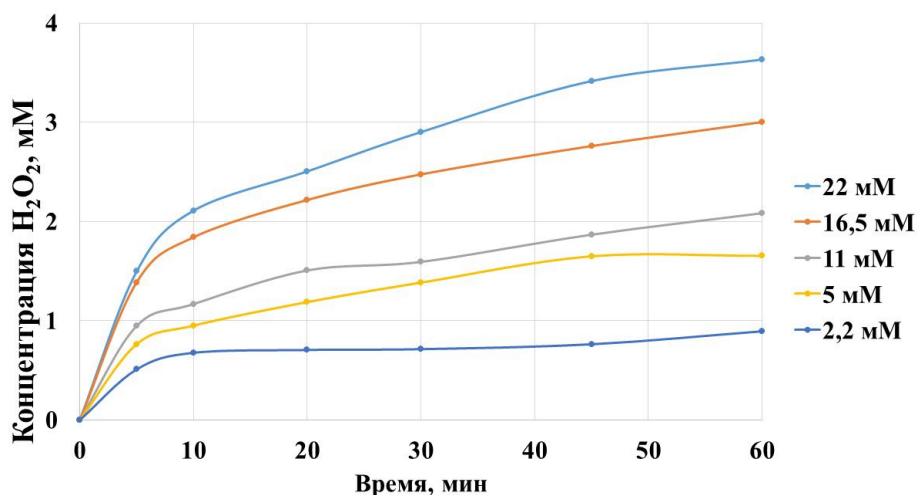


Рисунок 1 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для свободной формы глюкозооксидазы

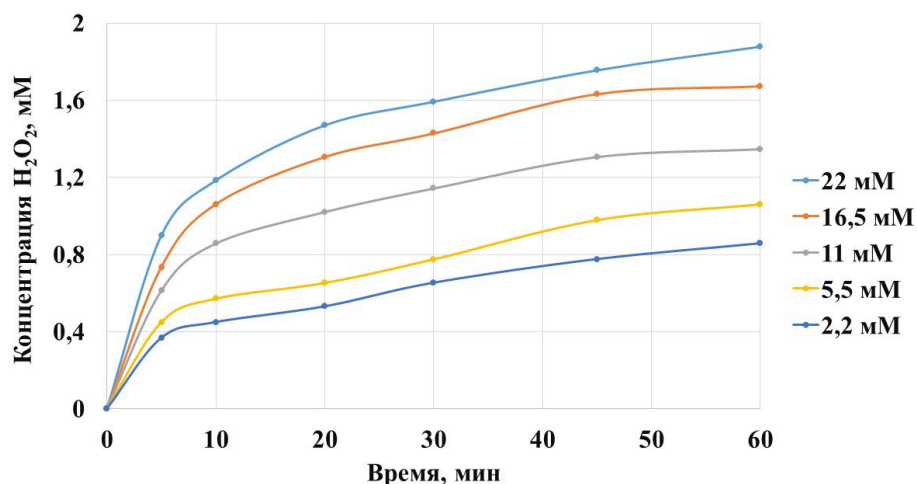


Рисунок 2 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для иммобилизованной формы глюкозооксидазы

Из рисунков 1 и 2 видно, что глюкозооксидаза, иммобилизованная на магнитных частицах, обладает немного 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 многократно, что компенсирует потерю активности при однократном использовании.

По результатам исследований были рассчитаны кинетические параметры биокатализатора: активность $A - 0,25$ ед. ак./мг (48,3 % от активности свободной формы), предельная скорость реакции $V_m - 0,77$ ммоль/л·с (51,9 %); константа Михаэлиса $K_M - 2,34$ ммоль/л (123 %).

Синтезированный биокатализатор может быть использован для промышленного получения D-глюконовой кислоты и аналитического определения концентрации D-глюкозы в биологических жидкостях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № 075–15–2022–1232).

Литература

1. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. // *Biotech. Adv.* 2009. Vol. 27. P. 489–501.
2. Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман М.Г. // *Вестник Тверского государственного университета. Серия «Химия»*. 2021. № 2(44). С. 18–25.