

УДК 661.746.44  
DOI 10.26456/vtchem2021.1.4

## БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ D-ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТЫ

О.В. Гребенникова, А.М. Сульман

Тверской государственной технической университет, Тверь

D-глюконовая кислота является широко потребляемым продуктом в пищевой и фармацевтической промышленности. Данная работа посвящена разработке биокатализатора окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Биокаталитические системы были выполнены на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемые мезопористые оксиды  $\text{SiO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , которые были синтезированы путем образования наночастиц магнетита в порах оксидов кремния и алюминия в результате термического разложения нитрата железа, инкорпорированного пропиткой. В работе подобраны оптимальные значения pH и температуры, при которых синтезированные биокатализаторы способны работать. Произведена сравнительная характеристика работы биокаталитических систем по сравнению с нативной формой глюкозооксидазы.

**Ключевые слова:** глюкозооксидаза, мезопористые оксиды, иммобилизация, D-глюкоза, D-глюконовая кислота.

D-глюконовая кислота широко применяется для получения глюконо-1,5-лактона применяемого в качестве коагулирующей добавки (для получения кисломолочных продуктов), стабилизатора окраски (для производства мясопродуктов), регулятора кислотности (в производстве соков), разрыхлителя (в хлебобулочной промышленности) и др.[1]. Препарат глюконата кальция, получаемый из глюконовой кислоты применяется в фармацевтической промышленности для восполнения ионов кальция и формирования костной ткани [2]. Одним из перспективных направлений в синтезе D-глюконовой кислоты является окисление D-глюкозы в присутствии глюкозооксидазы (ГО). Однако, использование фермента в нативной форме является экономически нецелесообразно [3]. Этот недостаток можно устранить путем иммобилизации фермента на неподвижную матрицу. При этом иммобилизованный фермент можно дольше хранить без сильной потери его активности и повторно использовать в нескольких рециклах [4].

Перспективными носителями для ферментов являются пористые носители, такие как, например,  $\text{SiO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Благодаря своей большой площади поверхности оксид алюминия и диоксид кремния является отличными носителями для иммобилизации ферментов. К тому же,

поверхность диоксида кремния покрыта большим количеством ОН-групп, к которым может быть присоединен фермент путем ковалентного связывания [5]. Несмотря на то, что поверхность  $Al_2O_3$  покрыта меньшим количеством ОН-групп, он также может быть эффективным носителем для ферментов [6].

Магнитоотделяемые катализаторы на основе пористых оксидов позволяют легко отделять их от реакционной смеси с помощью магнитного поля, что обеспечивает экономию энергии и времени. К тому же, благодаря таким биокаталитическим системам можно получать более дешевые экологически чистые целевые продукты [7-9].

В данной работе осуществлялось окисление D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с помощью магнитоотделяемых мезопористых биокатализаторов на основе  $SiO_2$  и  $Al_2O_3$ . Магнитоотделяемые носители были синтезированы путем образования наночастиц магнетита в порах оксидов кремния и алюминия в результате термического разложения нитрата железа, инкорпорированного пропиткой. Для модификации поверхности функциональными аминогруппами использовали 3-аминопропилтриэтоксисилан. Для ковалентного связывания фермента с магнитоотделяемыми оксидами их поверхность обрабатывалась глутаровым диальдегидом.

## Методы и методики

Для синтеза биокаталитических систем были использованы: мезопористый  $SiO_2$  (SIGMA-ALDRICH, США),  $\gamma-Al_2O_3$  (SIGMA-ALDRICH, США),  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  (98 %, SIGMA ALDRICH, США),  $NH_4OH$  (Сигма Тег, Россия), этиленгликоль (ч.д.а., Компонент-реактив, Россия), 3-аминопропилтриэтоксисилан (>99 %, SIGMA-ALDRICH, США), глутаровый диальдегид (25 %, BioChemika, США), глюкозооксидаза (174.9 Ед/мг, SIGMA-ALDRICH, США),  $C_2H_5OH$  (98 %, НПФ Химмедсервис, Россия). Для получения буферных растворов использовались  $KH_2PO_4$  (ГРАНХИМ, Россия) и  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (НПФ Химмедсервис, Россия). Для тестирования биокатализаторов была использована D-глюкоза (НПФ Химмедсервис, Россия).

Магнитоотделяемые образцы  $SiO_2$  и  $Al_2O_3$  были получены по известной методике [10]. Поскольку на поверхности оксида алюминия имеется меньше ОН-групп, изначально  $Al_2O_3$  перемешивался в течение 12 часов с 0.03 мл раствора  $NH_4OH$  и 10 мл воды. После чего оксид алюминия центрифугировался при 4000 об/мин и промывался водой.

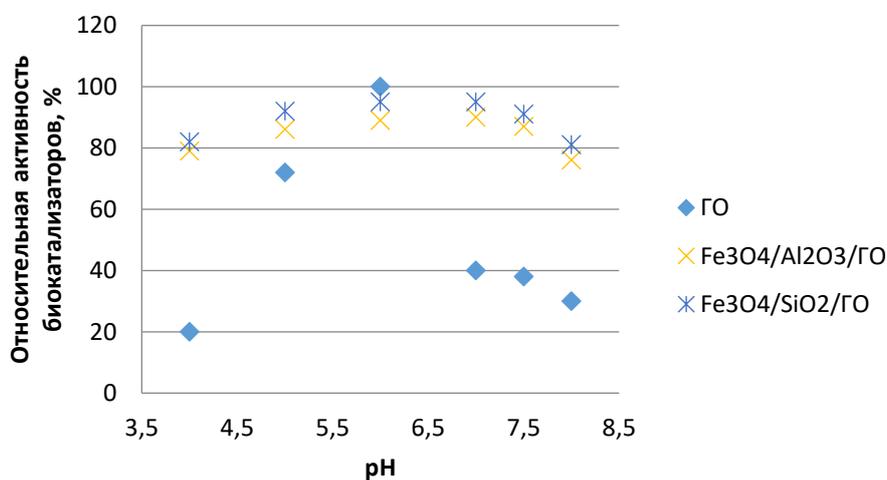
Для синтеза магнитоотделяемых носителей на основе диоксида кремния и оксида алюминия по 2.5 г носителей  $SiO_2$  и  $Al_2O_3$  перемешивали с этанольным 0.5М раствором нитрата железа. Высушенные под вакуумом при комнатной температуре образцы

перемешивали лопаточкой с этиленгликолем до золотисто-желтого цвета. Полученные порошки носителей загружали в фарфоровые чашки и нагревали в кварцевой трубе в трубчатой печи под аргоном до 250 °С со скоростью нагрева 2 °С в мин, после чего отжигали в течение 6 ч. Затем поверхность носителей обрабатывалась 3-аминопропилтриоксисиланом (АПТЭС). Для этого, к 10 мл воды добавляли ледяную уксусную кислоту (до значения рН 4). После чего, 0,8 мл АПТЭС добавляли к 8 мл подкисленной воды. Затем, в суспензию добавляли 4 мл глицерина. После этого, в полученный водный раствор помещали образцы носителей и проводили перемешивание при 90 °С. Далее, подготовленные образцы промывали и высушивали.

Для эффективной иммобилизации ГО на поверхности магнитоотделяемых носителей подготовленные образцы оксида кремния и оксида алюминия обрабатывали 0,1 % раствором глутарового диальдегида (ГА). Затем к промытым носителям добавляли раствор ГО (10 мг ГО и 20 мл фосфатного буфера). Полученная суспензия перемешивалась в течение 1 ч. В результате были синтезированы биокатализаторы ГО/ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  и ГО/ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Al}_2\text{O}_3$ , которые были сразу протестированы в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

### Результаты и обсуждения

Окисление D-глюкозы в присутствии синтезированных биокатализаторов производилось при различных значениях рН (4 – 8). Все эксперименты проводились при одинаковых условиях (Р и с . 1).



Р и с . 1. Зависимость относительной активности биокатализаторов от значений рН

Из Рис. 1 видно, что относительная активность для нативной ГО достигает 100 % при pH 6.0, при снижении или повышении pH относительная активность снижается. При значении pH 7.0 биокатализатор  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ГО}$  показывает более высокую активность (95 %), по сравнению с биокатализатором  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ГО}$  (90 %). При этом в случае использования нативного фермента при pH 7.0 относительная активность достигала только 40 %, что согласуется с литературными данными [11].

На Рис. 2 представлена зависимость активности биокатализаторов от температуры.

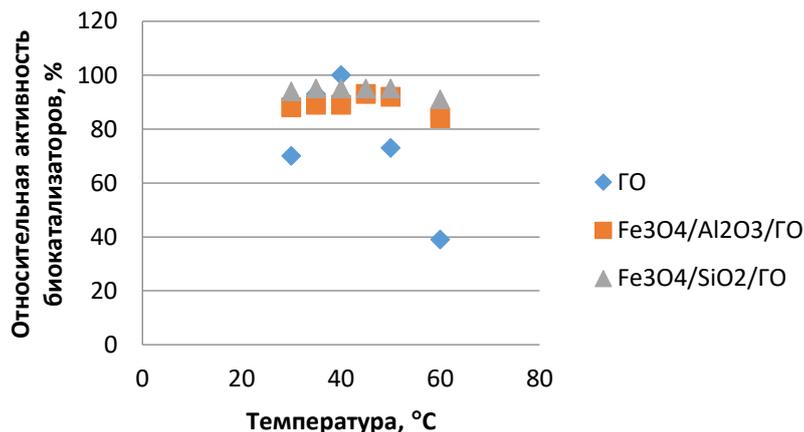


Рис. 2. Зависимость относительной активности биокатализаторов от температуры

Максимальная активность нативной ГО проявляется при температуре 40 °C, в то время как при использовании иммобилизованного фермента при той же температуре относительная активность немного ниже. При повышении температуры до 60 °C, активность иммобилизованной ГО снижается лишь на 16-18 %, а нативная ГО теряет около 60% каталитической активности, что, вероятно, связано с денатурацией белковой молекулы фермента при высоких температурах [12]. При этом иммобилизованный фермент приобретает температурную стабильность, что согласуется с литературными данными [13]. Так, для биокатализатора  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ГО}$  наблюдалась самая высокая относительная активность (95%) в диапазоне температур 35 до 50°C.

Таким образом, по сравнению с биокатализатором  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ГО}$ , биокатализатор  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{ГО}$  показал высокую относительную активность в достаточно широком для ферментов диапазоне pH и температуры.

## Заключение

Синтезированные биокатализаторы на основе ГО иммобилизованной на магнитоотделяемые мезопористые носители  $Al_2O_3$  и  $SiO_2$  показали высокие значения активности при окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в широком диапазоне pH и температуры. Самая высокая относительная активность (95 %) достигалась при использовании биокатализатора  $Fe_3O_4/SiO_2/ГО$ . Полученные результаты могут с успехом использоваться в окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с целью получения биологически активных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ 19-79-00134.

## Список литературы

1. Мазеева И.А., Гралевская И.В. Техника и технологии продуктов питания: наука, образование, достижения и инновации: Материалы III Всероссийской научно-практической конференции. Улан-Удэ, 28–29 июня 2018 года. Улан-Удэ: Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления. С. 69 – 75.
2. Шаков. А. А., Михайлова С. С., Коньгин Г. Н. // Журнал аналитической химии. 2011. Т. 66. № 8. С. 848–853.
3. Голикова, Е.П., Лакина Н.В., Шкилева И.П., Матвеева В.Г. Исследование биокаталитического способа получения глюконовой кислоты // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017. № 3. С. 40-46.
4. Tikhonov B.V., Sulman E.M., Stadol'nikova P.Yu., Sulman A.M., Golikova E.P., Sidorov A.I., Matveeva V.G. Immobilized Enzymes from the Class of Oxidoreductases in Technological Processes: A Review // Catal. Ind. 2019. №. 11. P. 251–263.
5. Чукин Г.Д. Химия поверхности и строение дисперсного кремнезёма. М.:Типография Паладин, ООО «Принта». 2008. 172 с.
6. Чукин Г.Д. Строение оксида алюминия и катализаторов гидрообессеривания. Механизмы реакций. М.: Типография Паладин, ООО «Принта». 2010. 288 с.
7. Polshettiwar V., Luque R., Fihri A., Zhu H., Bouhrara M. Magnetically Recoverable Nanocatalysts // Basset, J.-M. Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 3036–3075,
8. Saha A., Leazer J., Varma R.S. O-Allylation of Phenols with Allylic Acetates in Aqueous Media Using a Magnetically Separable Catalytic System // GreenChem. 2012. V. 14. P. 67-71. Wang D., Astruc D. Fast-Growing Field of Magnetically Recyclable Nanocatalysts // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 6949–6985.
9. Lu A.H., Salabas E.L., Schueth F., Angew N. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application // Chem. Int. Ed. 2007. V. 46. P. 1222–1244

10. Jaquish R., Reilly A.K., Lawson B.P., Bronstein L.M., Golikova E., Sulman A. M., Lakina N.V., Sulman E.M., Matveeva V.G., Stein B.D., Tkachenko O.P. // International Journal of Biological Macromolecules. 2018. V. 120. P. 896–905.
11. Zhao B., Zhou L., Ma L., He Y, Gao J., Li D., Jiang Y. Co-immobilization of glucose oxidase and catalase in silica inverseopals for glucose removal from commercial isomaltooligosaccharide // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V.107. P. 2034–2043.
12. Wong C.M., Wong K. H., Chen X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications // Applied Microbiology and Biotechnology. 2008. V. 78. P. 927–938.
13. Yang Y., Zhu G., Wang G., Li Y., Tang R. Robust glucose oxidase with a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C-silica nanohybrid structure // Mater. Chem. 2016. V. 4. P. 4726–4731

*Об авторах:*

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственной технический университет, e-mail: [omatveevatstu@mail.ru](mailto:omatveevatstu@mail.ru)

СУЛЬМАН Александрина Михайловна – аспирант, преподаватель кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственной технический университет, e-mail: [alexsulman@mail.ru](mailto:alexsulman@mail.ru)

## BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF D-GLUCONIC ACID

O.V. Grebennikova, A.M. Sulman

Tver State Technical University, Tver

D-gluconic acid is a widely consumed product in the food and pharmaceutical industries. This work is devoted to the development of a biocatalyst for the oxidation of D-glucose to D-gluconic acid. Biocatalytic systems were based on hycose oxidase immobilized on magnetically detachable mesoporous oxides SiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, which were synthesized by the formation of magnetite nanoparticles in the pores of silicon and aluminum oxides as a result of thermal decomposition of iron nitrate incorporated by impregnation. In this work, the optimal pH and temperature values were selected, at which the synthesized biocatalysts are able to work. A comparative characteristic of the work of biocatalytic systems in comparison with the native form of glucose oxidase has been made.

**Keywords:** *glucose oxidase, mesoporous oxides, immobilization, D-glucose, D-gluconic acid.*