

УДК 544.47  
DOI 10.26456/vtchem2021.3.8

## МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В БИОКАТАЛИЗЕ

А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, А.Е. Филатова

Тверской государственной технической университет, г. Тверь

В работе изучены свойства ферментативных систем на основе иммобилизованной на магнитные частицы пероксидазы корня хрена (HRP). Магнитные наночастицы  $Fe_3O_4$  были синтезированы методом соосаждения. Затем на их поверхность двумя способами была иммобилизована пероксидаза корня хрена путем ковалентной сшивки. Для этого, в первом случае,  $Fe_3O_4$  последовательно обрабатывали тетраэтоксисиланом, 3-аминопропилтриэтоксисиланом, глутаровым диальдегидом и HRP. Во втором, перед иммобилизацией HRP на поверхность носителя были последовательно нанесены 3-аминопропилтриэтоксисилан, глутаровым диальдегидом и HRP. Активность синтезированных биокатализаторов оценивалась спектрофотометрически в реакции окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония пероксидом водорода. В работе также были рассчитаны кинетические параметры  $K_m$  и  $V_m$  для всех типов катализаторов, в том числе для нативной HRP. Среди всех биокаталитических систем лучшие значения, по сравнению с нативным ферментом ( $K_m = 4$  ммоль/л и  $V_{max} = 12.6 \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с), были получены для первого типа биокатализатора ( $K_m = 5$  ммоль/л и  $V_{max} = 2.5 \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с). Было также определено, что оптимальным значением pH является 7.2.

**Ключевые слова:** пероксидаза корня хрена, магнитные наночастицы, биокаталитическая система, иммобилизация, катализатор.

В последние несколько десятилетий иммобилизация ферментов широко используется в различных каталитических процессах [1,2]. Однако, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает иммобилизация ферментов на различных носителях. Неорганические носители в качестве адсорбентов для ферментов имеют свои преимущества, такие как, например, невысокая стоимость, устойчивость в водных средах, широкий диапазон морфологических особенностей. При этом иммобилизация, зачастую, осуществляется с помощью образования ковалентных связей между белковой молекулой фермента и носителем и в настоящее время такой способ иммобилизации является одним из доминирующих [3-7]. А исследование кинетических особенностей различных процессов в

присутствии иммобилизованных ферментов является неотъемлемой частью изучения механизмов протекания реакций [8]. Также, иммобилизованные ферменты помимо хорошей стабильности способны проявлять высокую активность [9].

Иммобилизация ферментов на нерастворимые носители выгодна для практического применения благодаря удобству в обращении, легкости выделения ферментов из реакционной смеси и возможности повторного использования [10].

В настоящее время интерес исследователей к наноразмерным технологиям привел к созданию огромного разнообразия наночастиц с биосовместимыми поверхностями для иммобилизации ферментов. Множество ферментов, используемых в настоящее время в биотехнологии, были ковалентно иммобилизованы на магнитных наночастицах с использованием различных сшивающих агентов [11].

В данной статье были синтезированы биокаталитические системы на основе пероксидазы корня хрена (HRP), ковалентно иммобилизованной на магнитные наночастицы  $Fe_3O_4$ . Последние были синтезированы методом соосаждения. Использование магнитных наночастиц  $Fe_3O_4$  в качестве носителей для ферментных систем обусловлено простотой отделения синтезированного гетерогенного биокатализатора от реакционной смеси с помощью неодимового магнита [12,13]. К дополнительным преимуществам использования наночастиц также можно отнести их наноразмер, благодаря которому гетерогенная система может приближаться к гомогенной [14]. В качестве сшивающего агента использовался глутаровый альдегид. Сшивка фермента с носителем при помощи данного линкера протекает с образованием оснований Шиффа. Альдегидные группы находящиеся на концах симметричного сшивающего агента, реагируя с  $NH_2$ -группами, образуют азометиновые связи. Преимущество ковалентной иммобилизации ферментов с использованием данного метода заключается в его простоте [15,16]. Также было подобрано оптимальное значение pH для процесса окисления 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоуксислоты) диаммониевой соли (АБТС) в присутствии синтезированных биокатализаторов.

### ***Методы и методики***

#### *Материалы*

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (99 %),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (99 %), NaOH (98 wt.%), тетраэтилортосиликат (ТЕОС 99%), глутаровый альдегид (ГА, 25%), пероксидаза (150 ед/мг), этанол (95 %), 3-аминопропиоэтоксисилан (>98 %).

#### *Синтез магнитных наночастиц*

Кислый раствор смеси солей железа, с помощью бюретки, добавлялся по каплям к раствору NaOH (1.5 М), при постоянном

перемешивании на магнитной мешалке. Полученный чёрный осадок  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  отделяли от реакционной среды, с помощью неодимового магнита. Впоследствии осадок промывался водой до нейтрального значения pH. Затем смесь деспергировалась под ультразвуком (5 мин).

#### *Синтез биокаталитических систем*

В работе были синтезированы два биокатазатора на основе иммобилизованной HRP. Первый был синтезирован, используя 3-аминопропилтриэтоксисилан (АПТС). К полученным наночастицам (0,5 г) добавляли 100 мл этанола, 1 мл воды и 0,2 мл АПТС. Смесь перемешивалась в течение 5 часов на магнитной мешалке. Затем раствор промывался несколько раз дистиллированной водой. Модифицированный  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  активировался с помощью глутарового альдегида (ГА). Для этого к полученной суспензии добавляли 20 мл воды и 1 мл ГА. Модифицированный и активированный носитель несколько раз промывался фосфатным буфером (pH 6.0) и затем обрабатывался 20 мл раствора HRP (0,001 г HRP в 20 мл фосфатного буфера (pH 6.0)). Полученный биокатализатор обозначался как  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{ГА}/\text{HRP}$ .

Второй биокатализатор синтезировался, используя тетраэтоксисилан (ТЭОС). К полученной смеси наночастиц (0,5 г) при механическом перемешивании добавлялся по каплям 1 мл ТЭОС. Полученная суспензия оставлялась на перемешивание в течение 3 ч. После, полученный раствор промывался 5 раз дистиллированной водой и этанолом. Затем носитель модифицировали и активировали с помощью АПТС, ГА и HRP согласно методике, описанной выше. Полученный биокатализатор обозначался как  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{АПТС}/\text{ГА}/\text{HRP}$ .

#### *Методика проведения кинетических экспериментов*

Кинетические эксперименты проводили спектрофотометрически. Полученные биокаталитические системы и нативная HRP тестировались в реакции окисления АБТС с помощью пероксида водорода. За реакцией наблюдали по увеличению оптической плотности продукта окисления АБТС ( $\lambda = 415$  нм). При различных начальных концентрациях субстрата (от 0.02 до 0.00125 М) определялась начальная скорость окисления ( $V_0$ ).

Максимальная скорость  $V_{\text{max}}$  и константа Михаэлиса  $K_m$  определялись, используя различные начальные концентрации субстрата и фиксированные концентрации фермента и пероксида водорода, поскольку ферментативная реакция наиболее полно характеризуется в начальный момент времени, пока не происходит ингибирование

продуктом реакции [17]. Для нахождения кинетических параметров был использован метод Лайнуивера –Берка, согласно которому строится график зависимости  $1/V$  от  $1/[S]$ . Полученная прямая пересекает ось ординат в точке  $1/V_{\max}$  и ось абсцисс в точке  $-1/K_M$ . По углу наклона полученной прямой определяется  $K_M/V_{\max}$ .

Количество катализатора, которое идет на получение 1 мг целевого продукта за 20 с было взято за единицу активности.

Для оценки влияния pH проводили серию экспериментов с различными значениями pH фосфатного буфера (6.0-7.5).

### Результаты и обсуждение

Для определения кинетических параметров уравнения Михаэлиса-Ментен проводились эксперименты при различных начальных концентрациях субстрата. Параметры  $K_M$  и  $V_m$  для всех типов биокатализаторов, включая нативную пероксидазу определялись по графику Лайнуивера-Берка представлены в таблице 1.

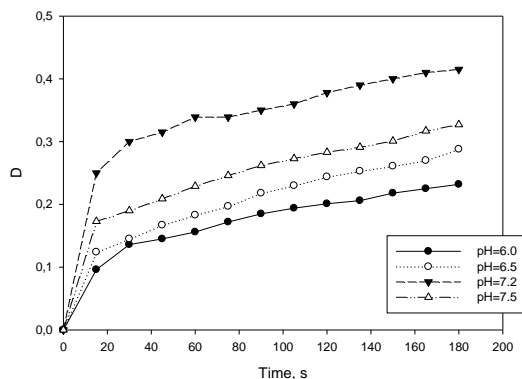
Таблица

Кинетические параметры

Kat	$V_{\max} \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с	$K_M$ , ммоль/л
HRP	12.6	4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /АПТС/GA/HRP	2.5	5
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / АПТС/GA/HRP	2.0	6

Из таблицы видно, что наибольшее сродство с субстратом имеет нативная HRP, поскольку с ней достигается наименьшее значение  $K_M$  (4 ммоль/л). Также, с использованием свободного фермента максимальная скорость реакции  $12.6 \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с. При использовании Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/АПТС/GA/HRP, как катализатора  $K_M$  увеличилось до 5 ммоль/л, а  $V_{\max} = 2.5 \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с. Самое низкое сродство с субстратом показал биокатализатор Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/АПТС/GA/HRP, для него значение  $K_M$  составило 6 ммоль/л, при этом  $V_{\max} = 2.0 \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с. Невысокие значения кинетических параметров и активности биокатализаторов на основе иммобилизованного фермента (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/АПТС/GA/HRP и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/АПТС/GA/HRP) по сравнению с нативным (HRP) связано с конформационными изменениями белковой молекулы HRP, вследствие ее иммобилизации и меньшим количеством иммобилизованной пероксидазы на носителях.

С биокатализатором Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/АПТС/GA/HRP, показавшим большую активность по сравнению с Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/АПТС/GA/HRP проводились эксперименты по определению оптимального значения pH (Рисунок).



Зависимость оптической плотности от времени с разными рН

Из рисунка видно, что оптимальным значением рН является 7.2. При данном значении биокатализатор  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GA}/\text{HRP}$  показал лучшие результаты по окислению АБТС.

Были проведены эксперименты по многократному использованию ковалентно иммобилизованной системы  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GA}/\text{HRP}$  в последовательных реакциях, которые показали, что активность системы снижается с каждым последующим циклом не более чем на 2-3 %, что дает возможность эффективно и многократно ее использовать.

### Заключение

Оба образца синтезированных биокатализаторов проявили высокую активность при окислении АБТС. Однако более высокое катализирующее действие показал образец  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GA}/\text{HRP}$ . Для него были определены следующие значения кинетических параметров  $V_{\max} = 2.5 \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с, а  $K_M = 5$  ммоль/л. Эти значения являлись немного худшими по сравнению с нативной HRP ( $V_{\max} = 12.6 \cdot 10^{-4}$ , ммоль/л·с, а  $K_M = 4$  ммоль/л). Однако, фермент после иммобилизации становится гетерогенным, что позволяет отделять его от реакционной смеси и повторно использовать в последующих экспериментах практически без потери активности. Оптимальное значение рН процесса окисления АБТС в присутствии  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GA}/\text{HRP}$  с помощью пероксида водорода было 7.2. Синтезированные биокатализаторы могут с успехом применяться в процессах окисления фенольных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям (программа У.М.Н.И.К., договор 16434ГУ/2021 от 28.05.2021).

### Список литературы

1. Grosu EF, Carja G & Froidevaux R, Development of horseradish peroxidase/layered double hydroxide hybrid catalysis for phenol degradation. // Chem Intermed, 2018; 44: 7731, DOI: 10.1007/s11164-018-3583-x.
2. Matthew P. Thompson, Itziar Peñafiel, Sebastian C. Cosgrove, and Nicholas J. Turner Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals // *Organic Process Research & Development*. 2019. V. 23 (1), P. 9-18 DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00305
3. Grebennikova O., Sulman A., Matveeva V., Sulman M. Biocatalyst for environmentally friendly synthesis of vitamin E intermediate // *Clean Techn Environ Policy*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02093-0>
4. Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M., Design of biocatalysts for efficient catalytic processes // *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2019. V. 26. P. 1–8.
5. Nguyen H.H., Lee S.H., Lee UJ, Fermin C.D., Kim M., Immobilized Enzymes in Biosensor Applications // *Materials (Basel)*. 2019. 12(1):121, doi: [10.3390/ma12010121](https://doi.org/10.3390/ma12010121)
6. Al-Qodah Z., Al-Shannag M., Al-Busoul M., Penchev I., Orfali W., Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: A review, // *Biochemical Engineering Journal*. 2017. V. 121. P. 94–106.
7. Sirisha V.L., Jain A., Jain A., Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes // *Adv Food Nutr Res*. 2016. V. 79. P 179–211.
8. T.Jeoh, M.J. Cardona, N. Karuna, A.R. Mudinoor Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis - A review // *Biotechnology and Bioengineering*. 2017. V. 114(7). P. 1369-1385.
9. Hoffmann, C, Pinelo M & Daugaard AE Experimental and computational evaluation of areaselectively immobilized horseradish peroxidase in a microfluidic device, 2018; 33: 7853
10. Asgher M, Shahid M & Kamal S, Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology // *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2014;101: 5666
11. Bilal M, Iqbal HM, & Zhang X, State- of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: a review from immobilization to implementation view point. *International journal of biological macromolecules*, 2018; 108: 893
12. Grebennikova O., Sulman A., Matveeva V. et al., Physical – chemical analysis and kinetics of the magnetic biocatalyst for 2,3,6, -trimethylphenol oxidation // *Reac Kinet Mech Cat*. 2020.
13. Cheng C., Xu F., Gu H., Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes // *NewJ. Chem*. 2011. V. 35. P. 1072–1079.
14. Polshettiwar V., Luque R., Fihri A., Zhu H., Bouhrara M., Basset J., Magnetically Recoverable Nanocatalysts. // *Am. Chem. Soc. Chem. Rev*. 2011. V. 111. P. 3036–3075.

15. Šekuljica N.Ž., Prlainović N.Ž., Jovanović J.R., Stefanović A.B., Grbavčić S.Ž., Mijin D.Ž., Knežević-Jugović Z.D. Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye. // Hem. ind. 2015. V. 70. P. 217–224. DOI: 10.2298/HEMIND150220028S
16. Gür S.D., İdil N., Aksöz N. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. // Appl Biochem Biotechnol 2018. N 184. P. 538–552 (in Russian). DOI10.1007/s12010-017-2566-
17. Ферментативная кинетика: учебное пособие. В 2 ч. Ч. 1 / М.Э. Ламберова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. 76 с.

*Об авторах:*

СУЛЬМАН Александрна Михайловна – кандидат химических наук, преподаватель кафедры биотехнологии химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, д. 22, e-mail: [alexsulman@mail.ru](mailto:alexsulman@mail.ru)

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, д. 22, e-mail: [omatveevatstu@mail.ru](mailto:omatveevatstu@mail.ru)

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии химии и стандартизации Тверской государственный технический университет, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, д. 22, e-mail: [afilatowa@mail.ru](mailto:afilatowa@mail.ru)

## MAGNETIC NANOPARTICLES IN BIOCATALYSIS

**A.M. Sulman, O.V. Grebennikova, A.E. Filatova**

Tver State Technical University, Tver

The synthesis of biocatalytic systems based on horseradish peroxidase immobilized on magnetic particles was investigated. The method of coprecipitation was used to obtain magnetic nanoparticles. Two types of magnetic particles were studied: untreated and pretreated with tetraethoxysilane. The basic kinetic parameters  $K_M$  and  $V_m$  were calculated for all types of biocatalysts. The optimal pH value was determined for the biocatalyst that showed the greatest activity during oxidation.

**Keywords:** horseradish peroxidase, magnetic nanoparticles, biocatalytic system, immobilization, catalyst.