

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ D-ГЛЮКОЗЫ В ПРИСУТСТВИИ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

О.В. Гребенникова, А.М. Сульман, Е.И. Шиманская

Тверской государственной технический университет, г. Тверь

В работе были определены кинетические параметры константа Михаэлиса (K_m) и максимальная скорость реакции (V_{max}) для реакции окисления D-глюкозы в присутствии нативной и иммобилизованной глюкозооксидазы. Фермент был ковалентно иммобилизован на магнитоотделяемые пористые оксиды алюминия и кремния, полученные путем образования в их порах наночастиц магнетита в результате термического разложения нитрата железа. Наилучшие результаты для иммобилизованного фермента были получены для образца $Fe_3O_4-SiO_2-GOx$ ($K_m=118$ мМ, $V_{max}=152$ мкМ/мин).

Ключевые слова: магнитоотделяемые оксиды, иммобилизация, глюкозооксидаза, окисление D-глюкозы.

Окисление D-глюкозы приводит к получению важных продуктов в биотехнологии – D-глюконовой кислоты и ее солей. В основном, D-глюконовая кислота и ее соли применяются в пищевой промышленности в качестве пищевых добавок для улучшения органолептических свойств пищевых продуктов, во фруктовых соках для предотвращения помутнения, в качестве ингредиента разрыхлителей для предварительно заквашенных продуктов и т.д. В фармацевтической промышленности соли глюконата (Ca^{2+} , Mg^{2+} и Fe^{2+}) используют в качестве добавок для лечения гипокальциемии, гипомагнемии и анемии соответственно. D-глюконовую кислоту применяют для удаления известковых отложений и слоев ржавчины с медных, алюминиевых и других металлических поверхностей. К ним относятся пивные и молочные хлопья на оцинкованном железе, оксидные покрытия из металлических сплавов или нержавеющей стали, а также безопасное удаление краски и лака без повреждения подлежащих поверхностей. D-глюконовая кислота в сочетании с солями магния используется в текстильной промышленности в качестве стабилизатора для ванн с пероксидным отбеливателем, а глюконат (иногда в смеси с полифосфатами) используется для отделки натуральных целлюлозных волокон и шлифовки полиэфирных или полиамидных тканей. Смеси желатина и глюконата натрия используются в качестве проклеивающих веществ в бумажной промышленности для получения продуктов, демонстрирующих повышенную кислотостойкость. Так же, глюконат

натрия используется как высокоэффективное средство для замедления процесса твердения бетона [1].

Окисление D-глюкозы осуществляется с помощью фермента класса оксидоредуктаз – глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4). Однако, использование нативных форм ферментов затруднительно и экономически невыгодно. Решением данных проблем является иммобилизация ферментов на различных органических и не органических носителях [2]. Изучение кинетических особенностей различных процессов в присутствии иммобилизованных ферментов является неотъемлемой частью изучения механизмов протекания химических реакций [3-4].

В данной работе определялись параметры окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии магнитоотделяемых биокатализаторов на основе глюкозооксидазы. Для получения магнитоотделяемых носителей использовались оксид кремния и оксид алюминия, в порах которых были синтезированы магнитные наночастицы в результате термического разложения нитрата железа. Глюкозооксидаза была ковалентно иммобилизована с помощью глутарового диальдегида на полученные носители. Кинетические параметры константа Михаэлиса (K_m) и максимальная скорость реакции (V_{max}) были определены по уравнению Михаэлиса – Ментен.

Материалы и методы

Для синтеза биокаталитических систем были использованы: мезопористый SiO_2 (SIGMA-ALDRICH, США), $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (SIGMA-ALDRICH, США), $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (98 %, SIGMA ALDRICH, США), NH_4OH (Сигма Тег, Россия), этиленгликоль (ч.д.а., Компонент-реактив, Россия), 3-аминопропилтретоксисилан (>99 %, SIGMA-ALDRICH, США), глутаровый альдегид (25 %, BioChemika, США), глюкозооксидаза (174.9 Ед/мг, SIGMA-ALDRICH, США), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (98 %, НПФ Химмедсервис, Россия). Для получения буферных растворов использовались KH_2PO_4 (ГРАНХИМ, Россия) и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (НПФ Химмедсервис, Россия). Для тестирования биокатализаторов была использована D-глюкоза (НПФ Химмедсервис, Россия).

Синтез магнитоотделяемых биокатализаторов

Магнитоотделяемые образцы SiO_2 и Al_2O_3 были получены по известной методике [5].

Для получения магнитоотделяемых носителей 2.5 г SiO_2 и 2.5 г Al_2O_3 , предварительно обработанного раствором NH_4OH , перемешивали с этанольным раствором нитрата железа. Затем полученные образцы порошков SiO_2 и Al_2O_3 перемешивались с этиленгликолем и нагревались в кварцевой трубе в трубчатой печи под аргоном до 250 °С. Затем магнитоотделяемые носители были обработаны 3-

аминопропилтриоксисиланом для функционализации их поверхности аминогруппами. Для этого образцы в течение 5 часов при 90 °С перемешивали с 8 мл подкисленного раствора 3-аминопропилтриоксисилана. Высушенные магнитоотделяемые оксиды SiO₂ и Al₂O₃ перемешивали в течение 1 часа с раствором глутарового альдегида (20 мл). Затем модифицированные и активированные образцы носителей перемешивались с 20 мл буферного раствора глюкозооксидазы (GOx). В результате были синтезированы биокатализаторы Fe₃O₄-SiO₂-GOx и Fe₃O₄-Al₂O₃-GOx, которые исследовались в реакции окисления D-глюкозы. Анализ реакционной смеси проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Определение кинетических параметров окисления D-глюкозы

Максимальную скорость (V_{max}) и константу Михаэлиса (K_m) рассчитывали путем определения начальных скоростей реакции для различных концентраций D-глюкозы с нативной и иммобилизованной GOx. Зависимость скорости окисления D-глюкозы от концентрации D-глюкозы определялась моделью Михаэлиса-Ментен.

Для определения V_{max} и K_m были построены кинетические кривые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Для процесса, катализируемого ферментом, зависимость скорости реакции (v) от концентрации субстрата ($[S]$) получается из уравнения Михаэлиса-Ментен, основные параметры которого можно получить спрямлением по методу Лайнуивера-Берка:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

Результаты и обсуждения

Кинетические параметры константа Михаэлиса (K_m) и максимальная скорость реакции (V_{max}) позволяют оценить эффективность фермента. Чем ниже значение K_m , тем выше сродство фермента с субстратом, а более высокое значение V_{max} отражает более высокую скорость реакции. Значения кинетических параметров реакции окисления D-глюкозы с использованием нативного фермента, SiO₂-GOx, Al₂O₃-GOx, Fe₃O₄-SiO₂-GOx и Fe₃O₄-Al₂O₃-GOx представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Кинетические параметры реакции окисления D-глюкозы в присутствии нативной и иммобилизованной GOx

Биокатализатор	K_m , мМ	V_{max} , мкМ/мин
GOx	78	173
Al ₂ O ₃ -GOx	140	43
SiO ₂ -GOx	132	77
Fe ₃ O ₄ -Al ₂ O ₃ -GOx	125	104
Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -GOx	118	152

В присутствии нативной GOx значение K_m является самым низким, в то время как значение V_{max} является самым высоким по сравнению с иммобилизованной GOx. Что указывает на самое высокое сродство фермента с субстратом. Из всех синтезированных биокаталитических систем самое низкое значение K_m и высокое значение V_{max} наблюдаются при использовании Fe₃O₄-SiO₂-GOx. Это можно объяснить тем, что на поверхности SiO₂ содержится большее количество ОН-групп, по сравнению с поверхностью Al₂O₃ [6, 7], соответственно большее количество фермента может присоединиться к поверхности носителя. Для биокатализаторов Al₂O₃-GOx и SiO₂-GOx были получены самые высокие значения K_m и низкие значения V_{max} . Более высокую активность биокатализаторов на основе магнитоотделяемых носителей можно объяснить наличием у магнитных наночастиц Fe₃O₄ ферментоподобных свойств.

Заключение

Синтезированные в работе биокаталитические системы на основе иммобилизованной глюкозооксидазы показали хорошую каталитическую активность в реакции окисления D-глюкозы. К тому же, глюкозооксидаза, иммобилизованная на магнитоотделяемые носители проявила более высокую активность, по сравнению с образцами SiO₂-GOx и Al₂O₃-GOx. Самые близкие значения кинетических параметров по сравнению с нативным ферментом были получены для образца Fe₃O₄-SiO₂-GOx ($K_m=118$ мМ, $V_{max}=152$ мкМ/мин). Стоит отметить, что магнитоотделяемые биокатализаторы отличаются простотой отделения их от реакционной смеси с помощью внешнего магнитного поля. Полученные результаты могут использоваться в пищевой и фармацевтической промышленности для получения D-глюконовой кислоты и ее солей.

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

Список литературы

1. Kornecki J. F., Carballares D., Tardioli P. W., Rodrigues R. C., Berenguer-Murcia Á., Alcantara A.R. // [Catal. Sci. Technol.](#) 2020. V. **10**. P. 5740–5771.
2. Tikhonov B.B., Sulman E.M., Stadol'nikova P.Y. et al. // *Catal. Ind.* 2019. V. 11. P. 251–263.
3. Jeoh T., Cardona M.J., Karuna N., Mudinoor A.R. // [Biotechnology and Bioengineering](#). 2017. V. 114(7). P.1369-1385.
4. Гребенникова О.В. // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. 2020. № 3 (41). С. 23–28.
5. 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.
6. Чукин Г.Д., Химия поверхности и строение дисперсного кремнезёма, Паладин, Москва, 2008, 172 с.
7. Чукин Г.Д. Строение оксида алюминия и катализаторов гидрообессеривания. Механизмы реакций, Паладин, Москва, 2010, 288 с.

Об авторах:

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, Тверской государственной технической университет, e-mail: omatveevatstu@mail.ru

СУЛЬМАН Александрина Михайловна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, Тверской государственной технической университет, e-mail: alexsulman@mail.ru

ШИМАНСКАЯ Елена Игоревна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, Тверской государственной технической университет, e-mail: shimanskaya-tstu@yandex.ru

KINETIC PARAMETERS OF THE OXIDATION OF D-GLUCOSE IN THE PRESENCE OF BIOCATALYSTS

O.V. Grebennikova, A.M. Sulman, E.I. Shimanskaya

Tver State Technical University, Tver

In this work, the kinetic parameters of the Michaelis constant (K_m) and the maximum reaction rate (V_{max}) for the oxidation of D-glucose in the presence of native and immobilized glucose oxidase were determined. The enzyme was covalently immobilized on magnetically detachable porous aluminum and silicon oxides obtained by the formation of magnetite nanoparticles in their

pores as a result of thermal decomposition of iron nitrate. The best results for the immobilized enzyme were obtained for the Fe₃O₄-SiO₂-GOx sample ($K_m = 118 \text{ mM}$, $V_{max} = 152 \text{ } \mu\text{M} / \text{min}$).

Key words: *magnetically detachable oxides, immobilization, glucose oxidase, D-glucose oxidation.*