

УДК 542.943

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

О.В. Гребенникова<sup>1</sup>, Э.М. Сульман<sup>1</sup>, Л.М. Бронштейн<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тверской государственной технической университет, г. Тверь

<sup>2</sup>Indiana University, Bloomington, USA

Предложен способ синтеза биокатализатора на основе магнитных наночастиц и ферментов для процесса окисления 2,3,6-триметилфенола до 2,3,5-триметилгидрохинона (полупродукта витамина Е). Магнитные наночастицы были получены полиольным способом и покрывались 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТС). На АПТС-покрытые наночастицы производилась иммобилизация пероксидазы (HRP). Описаны физико-химические характеристики полученного биокатализатора с помощью просвечивающей электронной микроскопии и ИК-Фурье-спектроскопии. Подобраны оптимальные условия процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии полученного биокатализатора (температура, pH).

**Ключевые слова:** пероксидаза, иммобилизация, магнитные наночастицы, 3-аминопропилтриэтоксисилан, 2,3,6-триметилфенол, окисление.

В настоящее время все чаще в процессах окисления фенольных соединений применяются ферменты, в присутствии которых окисление протекает в мягких условиях с высоким выходом и хорошей селективностью [1]. Иммобилизация ферментов позволяет добиться их стабильности, тем самым увеличив срок их службы и уменьшив затраты на технологическое применение [2; 3]. В качестве альтернативных носителей для ферментных молекул могут с успехом применяться магнитные наночастицы [4; 5], использование которых имеет свои преимущества. Во-первых, из-за наноразмера частиц достигается большая площадь поверхности активного компонента нанокатализатора, что значительно увеличивает контакт между реагентами и катализатором. В свою очередь эта особенность позволяет гетерогенной каталитической системе достигнуть показателей, близких к гомогенной. Вторым преимуществом магнитных наночастиц является их простота отделения с помощью внешнего магнитного поля, что позволяет эффективно и быстро отделить магнитный нанокатализатор от реакционной смеси [6].

В данной работе исследуется эффективный способ иммобилизации пероксидазы (HRP) на магнитные наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

для применения в качестве катализатора в реакции окисления 2,3,6-триметилфенола (ТМФ) до 2,3,5-триметилгидрохинона (ТМГХ).

Наночастицы  $Fe_3O_4$  синтезировались полиольным методом, так как этот метод является простым в исполнении. Для прочного связывания HRP с поверхностью наночастиц последние обрабатывались 3-амино-пропилтриэтоксисиланом (АПТС). Синтезируемый таким образом гетерогенный катализатор тестировался в реакции окисления ТМФ в присутствии пероксида водорода. Для данной реакции были подобраны оптимальные условия проведения процесса (температура, pH).

## Экспериментальная часть

### *Материалы*

Для синтеза биокатализатора использовали этиленгликоль («Компонент-реактив», ч.д.а.), 1,2-пропиленгликоль («НПФ Химмедсервис», ч.), хлорид железа (III) 6-водный («НПФ Химмедсервис», ч.), янтарную кислоту («Марбиофарм», ч.д.а.), мочевины («Индикатор», ч.д.а.), этанол («Медхимпром», 95 %), 3-аминопропилтриэтоксисилан («SIGMA-ALDRICH», > 98 %), пероксидазу (Великобритания, RZ > 2.0, акт. > 150 ед/мг, обессоленный лиофилизированный порошок). Для тестирования полученного биокатализатора использовали 2,3,6-триметилфенол («SIGMA-ALDRICH», 95 %), пероксид водорода («Купавнареактив», 50 %). Для хроматографического анализа применяли 2,3,5-триметилгидрохинон («SIGMA-ALDRICH», 97 %), ацетонитрил («Panreac», E.U.).

### *Методика синтеза катализатора*

Синтез наночастиц осуществлялся полиольным методом путем растворения  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (3 ммоль), янтарной кислоты (1 ммоль) и мочевины (30 ммоль) в 30 мл этиленгликоля (1,2-пропиленгликоля) [7]. После чего смесь выдерживалась при 200 °С в автоклаве из нержавеющей стали (Pan Instr.) в течение 4 ч. Полученный черный осадок промывался этанолом и обрабатывался АПТС (2 мкл/мл). Затем на модифицированные наночастицы  $Fe_3O_4$  наносилась HRP.

Синтезированный катализатор тестировался в процессе окисления ТМФ. Эксперимент проводился в термостатированном стеклянном реакторе. Анализ реакционной смеси осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Морфология и размер наночастиц исследовались методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для изучения межфрагментных связей использовалась ИК-Фурье-спектроскопия с использованием ИК-Фурье-спектрофотометра IR Prestige 21.

## Результаты и обсуждение

### *Просвечивающая электронная микроскопия образцов биокатализаторов*

В результате использования просвечивающей электронной микроскопии были получены микрофотографии синтезированных наночастиц. На рис. 1 представлены микрофотографии магнитных наночастиц, полученных полиольным способом с использованием этиленгликоля (рис. 1, а) и 1,2-пропиленгликоля (рис. 1, б).

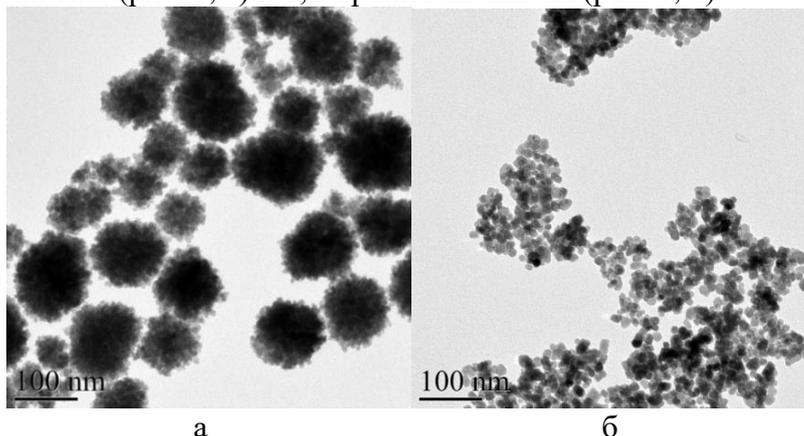
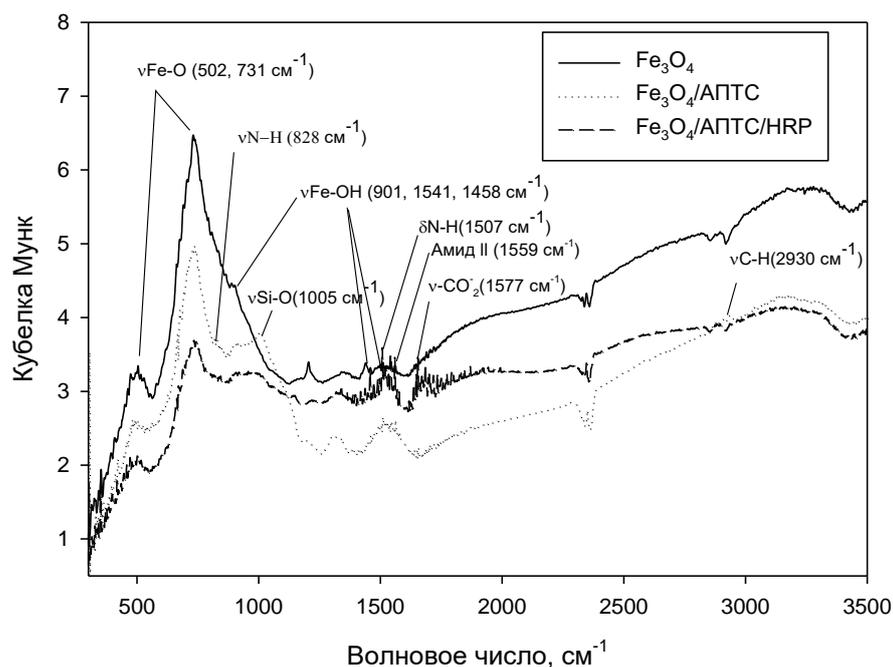


Рис. 1. Микрофотографии синтезированных наночастиц, полученных полиольным методом: а) с использованием этиленгликоля, б) с использованием 1,2-пропиленгликоля

Наночастицы, синтезированные полиольным методом с использованием этиленгликоля (рис. 1, а), образовывали крупные кластеры со средним диаметром  $111 \pm 5$  нм в форме, близкой к сферической, состоящей из множества небольших наночастиц. При использовании 1,2-пропиленгликоля (рис. 1, б) в качестве растворителя наночастицы имели зернистую неоднородность. Для экспериментов в качестве носителя для фермента были выбраны наночастицы, синтезированные полиольным методом с использованием этиленгликоля в качестве растворителя, так как морфология таких наночастиц является более регулярной.

### *ИК-Фурье-спектроскопия*

Для изучения образования химических связей фермента с наночастицами проводили исследование полученных образцов с помощью метода ИК-Фурье-спектрометрии диффузного отражения. ИК-спектры биокатализатора на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы, представлены на рис. 2.



Р и с . 2. Инфракрасные спектры образцов на основе HRP, иммобилизованной на  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Сравнивая ИК-спектры магнитных наночастиц, покрытых АПТС и непокрытых АПТС (рис. 2), можно увидеть, что  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , обработанный модифицирующим реагентом, имеет, помимо связей  $\nu \text{Fe-OH}$  (1541, 1458  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu \text{Fe-O}$  (731, 502  $\text{cm}^{-1}$ ), связи, указывающие на наличие АПТС, а именно:  $\nu \text{C-H}$  (2930  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\delta \text{N-H}$  (828  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu \text{Si-O}$  (1005  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu \text{C-N}$  (1055  $\text{cm}^{-1}$ ). После иммобилизации HRP на предварительно модифицированную поверхность образуются связи, свидетельствующие о присутствии HRP на поверхности носителя:  $\delta \text{N-H}$  (1507  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu \text{-CO}_2^-$  (1577  $\text{cm}^{-1}$ ) и полоса Амид II, идентифицирующая пептидную связь за счет  $\delta_{\text{NH}} + \nu_{\text{CN}}$  (1559  $\text{cm}^{-1}$ ) [8].

#### *Тестирование полученного биокатализатора и подбор оптимальных условий проведения процесса окисления ТМФ*

##### *Подбор оптимальной температуры*

При определении температурного оптимума (рис. 3) проводились эксперименты в присутствии синтезированного катализатора с варьированием температуры (30, 35, 40, 45, 50 °С). Дополнительно были проведены опыты при тех же условиях по окислению ТМФ в присутствии нативной HRP и необработанных магнитных наночастиц (так как они также обладают пероксидазо-подобным действием [9]). Как видно из рис. 3, активность HRP, иммобилизованной на магнитные

наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , с увеличением температуры возрастает. Фермент становится термостабильным в результате прочного закрепления белковой молекулы на носителе. Оптимальной температурой была выбрана  $40^\circ\text{C}$ , т.к. выше этой температуры происходит небольшая дезактивация фермента.

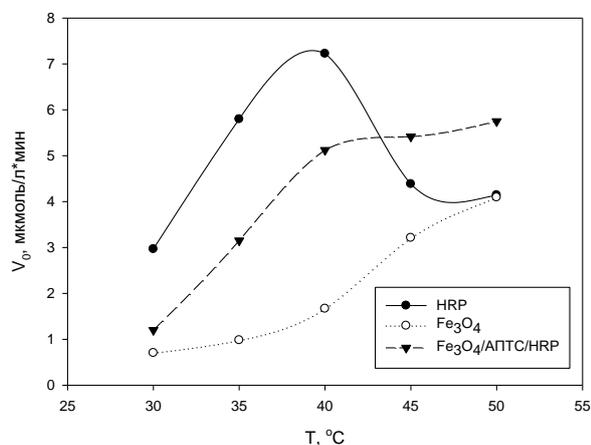


Рис. 3. Начальная скорость реакции окисления TMP при различных температурах ( $c_0^{\text{TMP}} = 1.5$  ммоль/л,  $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$  моль/л, pH 6.5,  $c_{\text{kat}} = 0.2$  г/л)

#### Подбор оптимального значения pH

При оценке влияния значения pH проводились эксперименты с варьированием этого параметра (рис. 4).

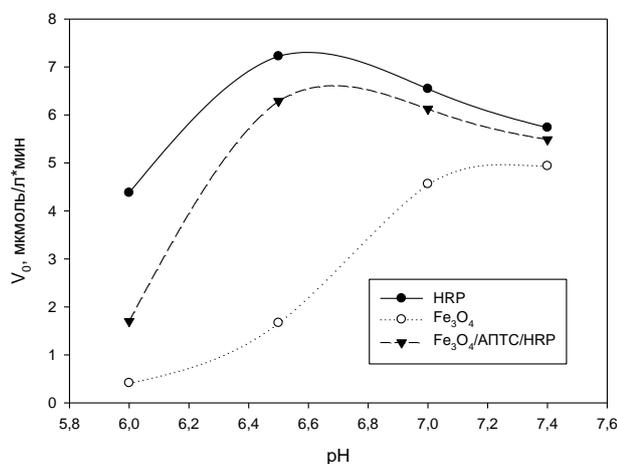


Рис. 4. Начальная скорость реакции окисления TMP при различных значениях pH ( $c_0^{\text{TMP}} = 1.5$  ммоль/л,  $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$  моль/л,  $T = 40^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{kat}} = 0.2$  г/л)

На рис. 4 показано, что иммобилизация HRP на магнитные наночастицы не вызвала сильно сдвига оптимума по сравнению

оптимальным значением pH для нативной HRP. Оптимальным значением pH для обоих катализаторов является 6.5.

Синтезированные магнитные наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> могут успешно применяться для иммобилизации ферментных молекул. Иммобилизация HRP на магнитных наночастицах Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> обеспечивает стабильную и эффективную работу фермента, а также его устойчивость к воздействию условий проведения процесса окисления. Таким образом, используя недорогие исходные материалы, можно легко получать биокатализатор для окисления ТМФ. К преимуществам использования такого биокатализатора можно отнести простоту его отделения от реакционной среды и эффективность.

#### Список литературы

1. Mohsina H. // Food Chemistry. 2009. V. 115, № 4. P. 1177–1186.
2. Monier M., Ayad D.M., Wei Y., Sarhan A.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2010. V. 46. P. 324–330.
3. Sahare P., Ayala M., Vazquez-Duhalt R., Agrawal V. // Nanoscale Research Letters. 2014. V. 9. P. 409.
4. Corgie S.C., Kahawong P., Duan X., Bowser D., Edward J.B., Walker L.P., Giannelis E.P. // Adv. Funct. Mater. 2012. V. 22. P. 1940–1951.
5. Deepthi S.S., Prasad E. B., Reddy V. S., Sreedhar B., Rao A.B. // Green and Sustainable Chemistry. 2014. V. 4. P. 15–19.
6. Polshettiwar V., Luque R., Fihri A., Zhu H., Bouhrara M., Basset J. // Am. Chem. Soc. Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 3036–3075.
7. Cheng C., Xu F., Gu H. // New J. Chem. 2011. V. 35. P. 1072–1079.
8. Сильверстейн Р., Вебстер Ф., Кимл Д. Спектрофотометрическая идентификация органических соединений. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 557 с.
9. Yu. F., Huang Y., Cole A. J., Yang C. // Biomaterials. 2009. № 30. P. 4716 – 4722.

## THE USE OF MAGNETIC NANOPARTICLES AS A CARRIER FOR ENZYME IMMOBILIZATION

O.V. Grebennikova<sup>1</sup>, E.M. Sulman<sup>1</sup>, L.M. Bronstein<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tver state technical university, Tver

<sup>2</sup>Indiana University, Bloomington, USA

The method of synthesis of the biocatalyst on the basis of magnetic nanoparticles and enzymes for the oxidation of 2,3,6-trimethylphenol to 2,3,5-trimethylhydroquinone (intermediate of vitamin E) was proposed. Magnetic nanoparticles were obtained polyol method and covered with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS). The APTS-coated nanoparticles for the immobilization of horseradish peroxidase (HRP) was used. The article describes the physico-chemical characteristics of the obtained biocatalyst using transmission electron microscopy and ft-IR spectroscopy. The optimum conditions of the oxidation process of 2,3,6-trimethylphenol in the presence of the obtained biocatalyst (temperature, pH) were selected.

**Keywords:** *peroxidase, 2,3,6-trimethylphenol, magnetic nanoparticles, 3-aminopropyltriethoxysilane, immobilization, oxidation*

*Об авторах:*

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры биотехнологии и химии, Тверской государственный технический университет, e-mail: a.a.stepacheva@mail.ru

СУЛЬМАН Эсфирь Михайловна – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и химии, Тверской государственный технический университет, e-mail: sulman@online.tver.ru

БРОНШТЕЙН Людмила Михайловна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, Университет штата Индиана, США, e-mail: lybronst@idiana.edu