

## ГЕТЕРОГЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ И ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

О.В. Гребенникова

Тверской государственной технической университет, г. Тверь

В работе описывается способ получения биферментных систем на основе глюкозооксидазы и пероксидазы корня хрена. Выбранные ферменты были ковалентно иммобилизованы на магнитные наночастицы, синтезированные методом со-осаждения, и неорганический носитель SiO<sub>2</sub>. Образцы носителей были предварительно модифицированы и активированы. Полученные биокатализаторы тестировались в каскадной реакции окисления D-глюкозы и 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) диаммониевой соли. Подобраны оптимальные условия работы биферментных систем (температура 45 °С, рН 6.0).

**Ключевые слова:** иммобилизация, глюкозооксидаза, пероксидаза, каскадные реакции.

В последние годы все большее значение приобретает иммобилизация ферментов на различных носителях. Основной целью иммобилизации ферментов всегда было повышение их производительности за счет повышения их активности, стереоселективности или стабильности. Это приводит к снижению стоимости конечного продукта из-за снижения стоимости биокатализатора. При иммобилизации ферментов биокатализатор становится гетерогенным, что позволяет легко отделять его от продукта реакции [1].

Среди исследователей все большее внимание завоевывают каскадные реакции, осуществляемые в присутствии нескольких ферментов. В мультиферментных каскадах несколько ферментов могут работать вместе с высокой эффективностью. Из-за близкого расположения друг к другу активных центров ферментов преодолеваются диффузионные ограничения в реакционной фазе за счет переноса промежуточных соединений из одного активного центра в другой, поддерживая при этом высокие локальные концентрации и, следовательно, высокую ферментативную активность [2].

Одним из примеров биферментных систем является совместная иммобилизация пероксидазы (ПХ) и глюкозооксидазы (ГО). В данной системе кислород в реакции окисления глюкозы за счет ГО преобразовывается в пероксид водорода, который является субстратом для ПХ в реакции окисления фенольного соединения [3]. Так, например,

ученые из Китая [4] предложили использование сопряженных бифункциональных систем на основе ГО и ПХ для создания биосенсоров обнаружения глюкозы. Ферменты были совместно иммобилизованы на твердой матрице, состоящей из меди и гуанозин-5'-монофосфата. Термическая стабильность иммобилизованной биферментной системы увеличилась более, чем на 70 % (при 90 °С), стабильность при хранении была увеличена в 8 раз (через 13 дней) по сравнению со свободными ферментами. Так же такая система показала, что при повторном использовании биокатализатора (восемь рециклов) относительная активность сохраняется до 90 %.

В данной работе ГО и ПХ были совместно иммобилизованы на магнитные наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и SiO<sub>2</sub>. Синтезированные биокатализаторы тестировались в каскадной реакции окисления D-глюкозы и 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) диаммониевой соли (АБТС).

## **Материалы и методы**

### ***Материалы***

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (Химмедсервис, Россия), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Невареактив, Россия), NaOH (Невареактив, Россия), SiO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, США), полистиролсульфонат натрия (Sigma-Aldrich, США), хитозан (Sigma-Aldrich, США), глутаровый альдегид (Panreac, Испания), пероксидаза корня хрена (Sigma-Aldrich, США), глюкозооксидаза (Sigma-Aldrich, США), этанол (Медхимпром, Россия), 3-аминопропилтриэтоксисилан (Sigma-Aldrich, США) использовались для синтеза биокатализаторов. Для тестирования биокатализаторов применялись 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) диаммониевой соли (AlfaAesar, Германия) и D-глюкоза (Химмедсервис, Россия).

### ***Методика иммобилизации GOx и HRP на магнитные наночастицы***

Магнитные наночастицы были синтезированы с помощью метода соосаждения [5]. Для этого, кислый раствор (25 мл) смеси солей железа (2.8 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и 5.2 г FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) добавляли по каплям к раствору NaOH (250 мл, 1.5 М) при постоянном перемешивании. Полученный черный осадок Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> отделяли от реакционной среды, промывали водой до нейтрального значения рН. Все операции по отделению магнитных частиц от раствора проводили с помощью неодимового магнита. Наночастицы оксида железа получают согласно реакции:



Затем синтезированные наночастицы обрабатывались раствором 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТС) для функционализации поверхности носителя. 50 мл этанола перемешивали в течение 5 часов с

0.1 мл АПТС. Затем носитель несколько раз промывали дистиллированной водой. После чего, магнитные наночастицы обрабатывали глутаровым альдегидом (ГА): 0.1 мл ГА в 30 мл фосфатного буфера (рН 7.0) в течение 1 ч перемешивали с носителем. Затем носитель промывали и обрабатывали раствором ГО и ПХ (10 мл фосфатного буфера (рН 7.0), 2 мг ГО и 2 мг ПХ). Синтезированный биокатализатор  $Fe_3O_4$ /АПТС/ГА/ГО/ПХ несколько раз промывали и хранили в холодильнике.

#### ***Методика иммобилизации ГО и ПХ на $SiO_2$***

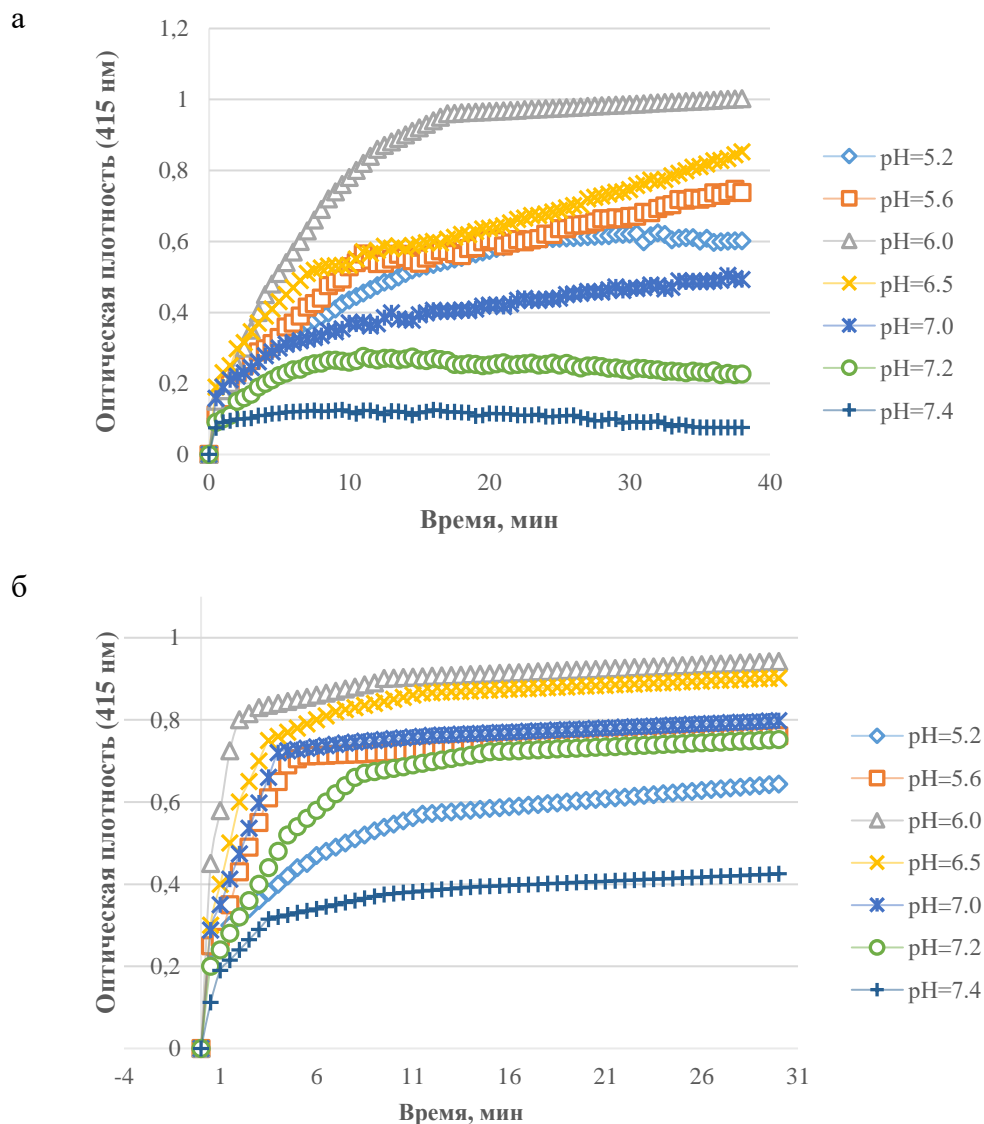
Образец носителя  $SiO_2$  массой 1 г перемешивали в течение 1 ч с 10 мл раствора полистиролсульфоната натрия (ПСС, 0.5 г/л). Затем промывали несколько раз водой и обрабатывали хитозаном (Хит). Для этого образец  $SiO_2$  перемешивали с 50 мл раствора в 0.01 М уксусной кислоте хитозана (0.15 г/л) при перемешивании в течение 60 мин с последующим фильтрованием, отмывкой дистиллированной водой и высушиванием под вакуумом при 60 °С. После чего, модифицированный носитель перемешивали 1 ч с раствором ГА (50 мл, 0.2 г/л). Образец фильтровали и промывали. Подготовленный таким образом носитель помещали в раствор ГО и ПХ (10 мл фосфатного буфера (рН 7.0), 2 мг ГО и 2 мг ПХ) и перемешивали 1 ч. Синтезированный биокатализатор  $SiO_2$ /ПСС/Хит/ГА/ГО/ПХ фильтровали, несколько раз промывали водой и хранили в холодильнике.

#### ***Анализ биферментных систем***

Для нахождения кинетических параметров использовали спектрофотометрический метод анализа. Полученные биокатализаторы исследовались в последовательной реакции окисления D-глюкозы и АБТС. За реакцией наблюдали по увеличению оптической плотности АБТС, при длине волны 415 нм. В две кюветы помещали по 2 мл растворов D-глюкозы (0.5 М) и АБТС (0.02 М). В первую кювету добавляли 0.2 мл фосфатного буфера. Во вторую – 2 мг биокатализатора. Для изучения влияния рН на скорость последовательных реакций окисления D-глюкозы и АБТС использовались фосфатные буферы с различными значениями рН (5.2; 5.6; 6.0; 6.5; 7.0; 7.2; 7.4).

#### ***Результаты и обсуждения***

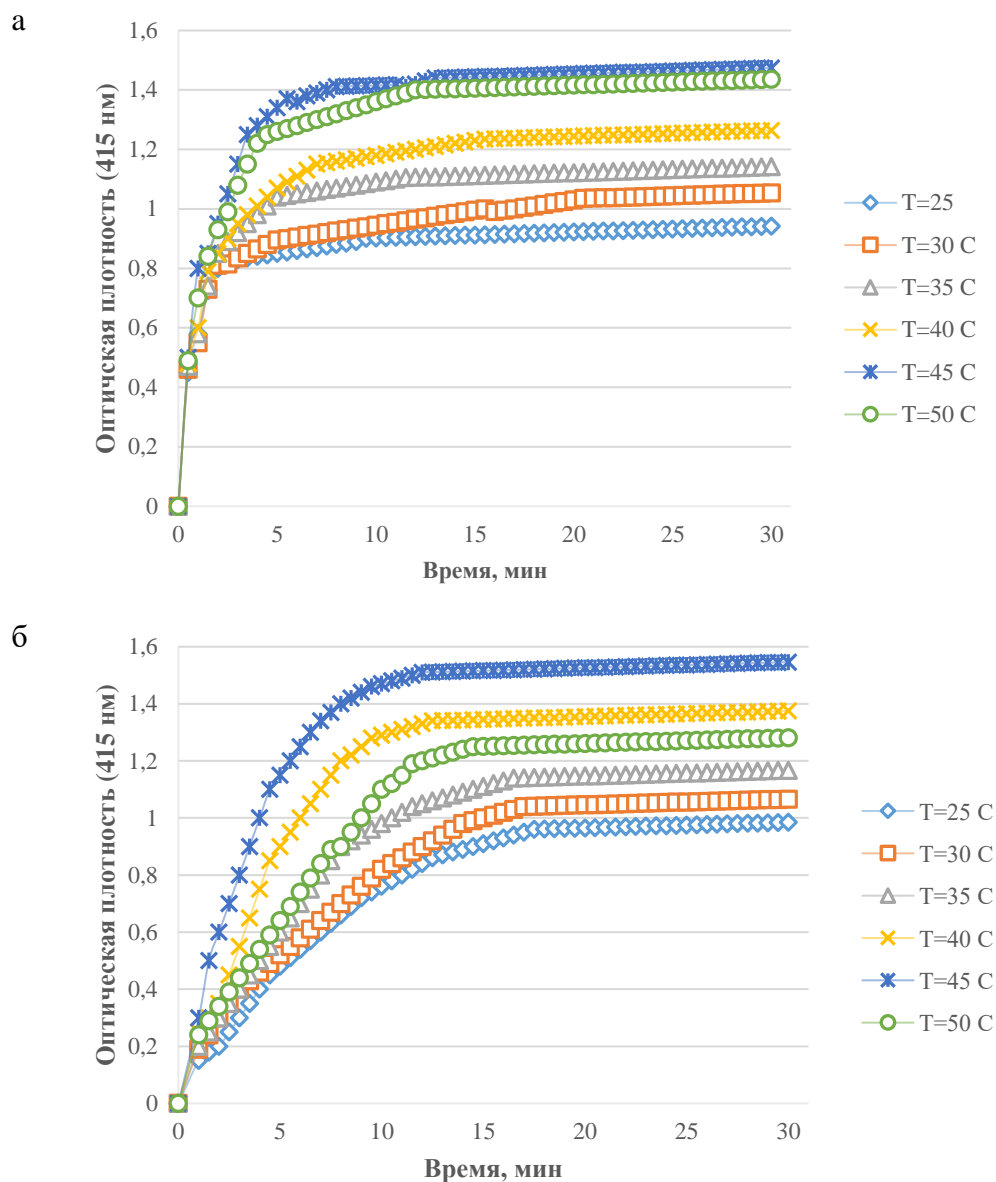
С синтезированными образцами биокатализаторов проводили эксперименты по определению оптимального значения рН в диапазоне значения от 5.2 до 7.4 (Р и с. 1).



Р и с . 1 – Кинетические кривые каскадной реакции окисления D-глюкозы и АБТС при различных значениях pH: а)  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTS}/\text{GA}/\text{GOx}/\text{HRP}$ ; б)  $\text{SiO}_2/\text{PSS}/\text{Chit}/\text{GA}/\text{GOx}/\text{HRP}$   
 ( $c_0^{\text{D-глюкоза}} = 0.5 \text{ M}$ ,  $c_0^{\text{АБТС}} = 0.02 \text{ M}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\lambda = 415 \text{ нм}$ )

Из Р и с . 1 видно оптимальным значением pH для биферментных систем является 6.0. Необходимо отметить, что оба биокатализатора сохраняют свою активность в широком диапазоне pH.

На Р и с . 2 представлены кинетические кривые каскадной реакции окисления D-глюкозы и АБТС при различных температурах.



Р и с . 2 – Кинетические кривые каскадной реакции окисления D-глюкозы и АБТС при различных температурах: а)  $Fe_3O_4/APTS/GA/GOx/HRP$ ; б)  $SiO_2/PSS/Chit/GA/GOx/HRP$  ( $c_0^{D-глюкоза} = 0.5 \text{ M}$ ,  $c_0^{АБТС} = 0.02 \text{ M}$ ,  $pH=6.0$ ,  $\lambda = 415 \text{ нм}$ )

Анализ полученных кинетических кривых показал, что повышение температуры до оптимального значения способствует увеличению активности на 36 %. При этом температурный оптимум достигается при 45 °С. К тому же, биокатализатор с использованием магнитных наночастиц проявил наибольшую активность в каскадной реакции окисления D-глюкозы и АБТС. Вероятно, это связано с большим

количеством ОН-групп на поверхности носителя, следовательно, с большим количеством пришитых ферментов [6].

Все типы синтезированных биокатализаторов были протестированы в пяти последовательных экспериментах при pH 6.0 и температуре 45 °С. После повторных рециклов все ферментные системы незначительно потеряли свою активность.

### Заключение

Использование биферментной системы (пероксидаза хрена – глюкозооксидаза) позволяет достичь высокой эффективности окисления АБТС. В этом случае использование перекиси водорода можно исключить из-за активности глюкозооксидазы. Оптимальными условиями для работы биокатализаторов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/APTS/GA/GOx/HRP и SiO<sub>2</sub>/PSS/Chit/GA/GOx/HRP являются температура 45 °С и pH = 6.0. В случае использования в качестве носителя магнитных наночастиц ферменты могут легко отделяться от продуктов реакции с помощью неодимового магнита, что является несомненным преимуществом данного типа биокатализатора. Все образцы синтезированных биокатализаторов могут успешно применяться для окисления различных фенольных соединений, обеспечивая тем самым эффективность процесса и простоту отделения биокаталитической системы от реакционной смеси.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ 22-24-20027.

### Список литературы:

1. Mohamed S.A., Al-Harbi M.H., Yaaser Q., Almulaiky Y.Q., [and etc] Immobilization of horseradish peroxidase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017. V. 27. P. 84–90.
2. Federsel H.-J., Moody T.S., Taylor S.J.C. Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 2822.
3. Razzaghi M., Karimi A., Aghdasinia H. Oxidase-Peroxidase sequential polymerization for removal of a dye from contaminated water by horseradish peroxidase (HRP)/ glucose oxidase (GOx)/polyurethane hybrid catalyst // *Korean J. Chem. Eng.* 2017. № 34(7), P. 2870-2878. <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0183-1>
4. Memon A.H., Ding R., Qipeng Yuan, [and etc] Coordination of GMP ligand with Cu to enhance the multiple enzymes stability and substrate specificity by co-immobilization process / A.H. // *Biochemical Engineering Journal*. 2018. V. 136. P. 102-108.
5. Матвеева О.В., Лакина Н.В., Долуда В.Ю., Шкилева И.П., Матвеева В.Г., Сульман Э.М. Влияние способа иммобилизации пероксидазы на активность биокатализатора в процессе окисления триметилфенола // *Катализ в промышленности*. 2015. № 1. С. 70-78.

6. Samiur Rashid S. [and etc] Cellulase immobilization on TEOS encapsulated and APTES functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) //IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2021. № 1092. DOI:[10.1088/1757-899X/1092/1/012071](https://doi.org/10.1088/1757-899X/1092/1/012071)

*Об авторах:*

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

## **HETEROGENEOUS BIOCATALYSTS BASED ON PEROXIDASE AND GLUCOSE OXIDASE**

**O.V. Grebennikova**

*Tver State Technical University*

The paper describes a method for obtaining bienzymatic systems based on glucose oxidase and horseradish root peroxidase. The selected enzymes were covalently immobilized on magnetic nanoparticles synthesized by the coprecipitation method and an inorganic SiO<sub>2</sub> support. The carrier samples were pre-modified and activated. The resulting biocatalysts were tested in a cascade oxidation reaction of D-glucose and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiozolin-6-sulfonic acid) diammonium salt. Optimum conditions for the operation of bienzymatic systems (temperature 45 °C, pH 6.0) were selected.

**Keywords:** *immobilization, glucose oxidase, peroxidase, cascade reactions.*