

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА МАГНИТООТДЕЛЯЕМЫЕ НОСИТЕЛИ

А.М. Сульман, Д.В. Балакшина, А.Е. Филатова,
О.В. Гребенникова, С.П. Михайлов

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь

Ферменты являются эффективными биокатализаторами, однако из-за ограниченной возможности их применения в нативной форме, необходимо подбирать подходящие методы иммобилизации, а также носители для их стабилизации. В качестве носителей для данного процесса можно использовать материалы различного происхождения, наиболее привлекательными из которых выступают мезопористые магнитные материалы. В данной статье исследуются биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия.

Ключевые слова: глюкозооксидаза (GOx), биокатализатор, иммобилизация, оксид кремния (silica), оксид алюминия

Глюкозооксидаза (GOx) используется как в пищевой и текстильной промышленности, так и в медицине, благодаря своей способности ускорять окисление D-глюкозы до D-глюконовой кислоты [1].

Естественным образом GOx вырабатывается растениями и животными, но из-за неэкономного извлечения фермента из данных биотехнологических объектов в производстве отдают предпочтение микроорганизмам, *Penicillium* и *Aspergillus*, поскольку они способны быстро превращать источники углерода в глюкозооксидазу с высокой производительностью.

В процессе окисления β -D-глюкозы до D-глюконо- δ -лактона и H_2O_2 в присутствии глюкозооксидазы, кислород выступает акцептором электронов, а кофермент ФАД – их переносчиком. Затем D-глюконо- δ -лактон гидролизует до D-глюконовой кислоты, а H_2O_2 расщепляется каталазой до O_2 и H_2O (рис. 1) [2].

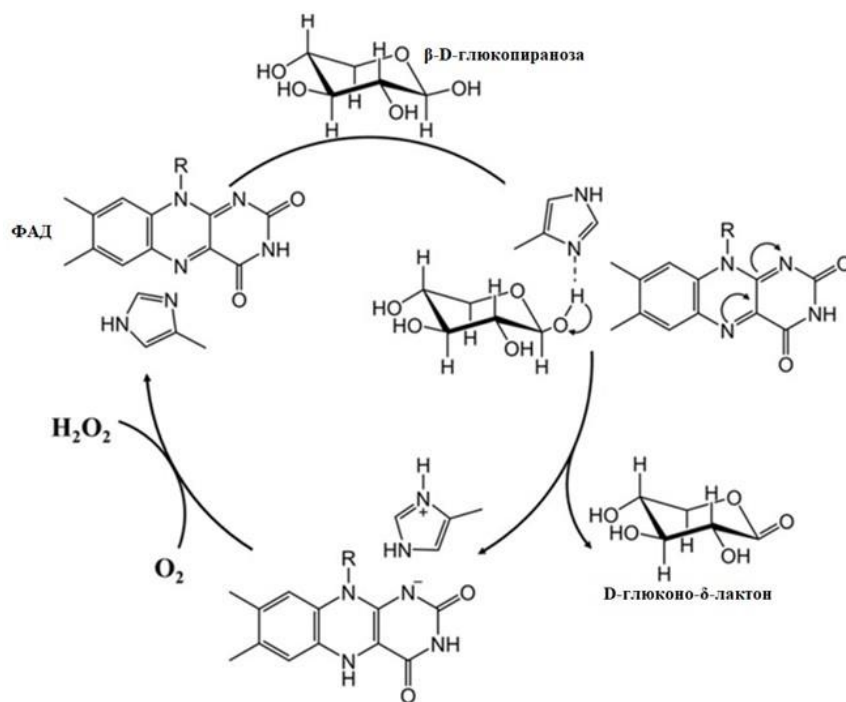


Рис. 1. Механизм каталитического действия глюкозооксидазы

Использование ферментов в их естественной форме ограничено из-за того, что большинство из них являются белками, чьи аминокислотные группы чувствительны к неблагоприятным изменениям окружающей среды. Также многие ферменты необратимо растворяются в воде, что делает невозможным их повторное использование [3].

GOx не стал исключением. Поэтому, чтобы стабилизировать состояние фермента, а также улучшить его свойства (термостойкость, устойчивость к рН и т.д.), необходимо подобрать подходящие метод иммобилизации и носители, из которых наиболее эффективными выступают мезопористые магнитные материалы.

Они являются предметом глубоких исследований в различных областях промышленности и науки и нашли применение в каталитических, фотонных и электронных устройствах, батареях, а также в биологических и биомедицинских приложениях, а также в сфере доставки лекарств.

Главное преимущество мезопористых материалов заключается в их уникальных свойствах, связанных с их небольшими размерами, большой площадью поверхности, обширным объемом пор и их регулируемой структурой. Оно значительно усиливается, когда размеры материалов уменьшаются до наномасштаба, а морфология контролируется для достижения максимальной площади поверхности [4].

В последнее время наблюдается растущий интерес к магнитоотделяемым биокатализаторам.

Они являются перспективным направлением в биотехнологии и имеют большой потенциал для дальнейшего развития и применения в различных отраслях промышленности [5]. Это обусловлено возможностью легкого магнитного отделения таких биокатализаторов для повторного использования, что приводит к экономии энергии и снижению стоимости производимых продуктов [6].

Магнитные свойства достигаются благодаря наличию магнитных наночастиц (МНЧ), в основном оксида железа (Fe_3O_4), в структуре биокатализатора, что позволяет эффективно отделять его от реакционной смеси с помощью магнита, без необходимости использования сложных процедур или добавления дополнительных реагентов [7].

Модификацию поверхностей магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$), рассматриваемых в статье, проводили с помощью АРТЕС (3-аминопропилтриэтоксисилан) (рис. 2).

Добавление АРТЕС к немодифицированному коллоидному оксиду кремния

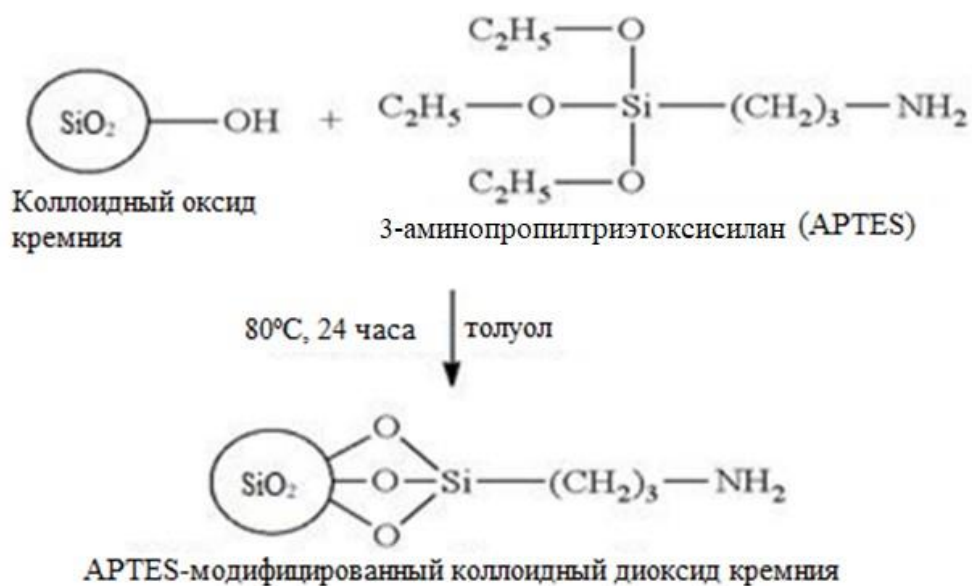


Рис. 2. Схема модификации носителя 3-аминопропилтриэтоксисиланом

Иммобилизация глюкозооксидазы проводилась методом ковалентного связывания (рис. 3). В качестве сшивающего агента для образования «мостика» между носителем и ферментом использовали глутаровый альдегид.

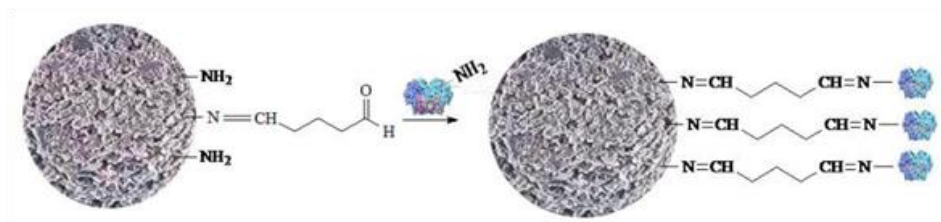


Рис. 3. Схема ковалентного связывания глюкозооксидазы с носителем

В результате у фермента не только повышается стабильность, но и предоставляется возможность его извлечения и повторного использования, однако сложность заключается в продолжительной инкубации, требующей дополнительных химических модификаций, и в ограниченном количестве фермента, которое можно иммобилизовать.

Результаты исследования магнитных свойств показали, что магнитоотделяемые образцы $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ являлись магнитомягкими ферромагнетиками (рис. 4).

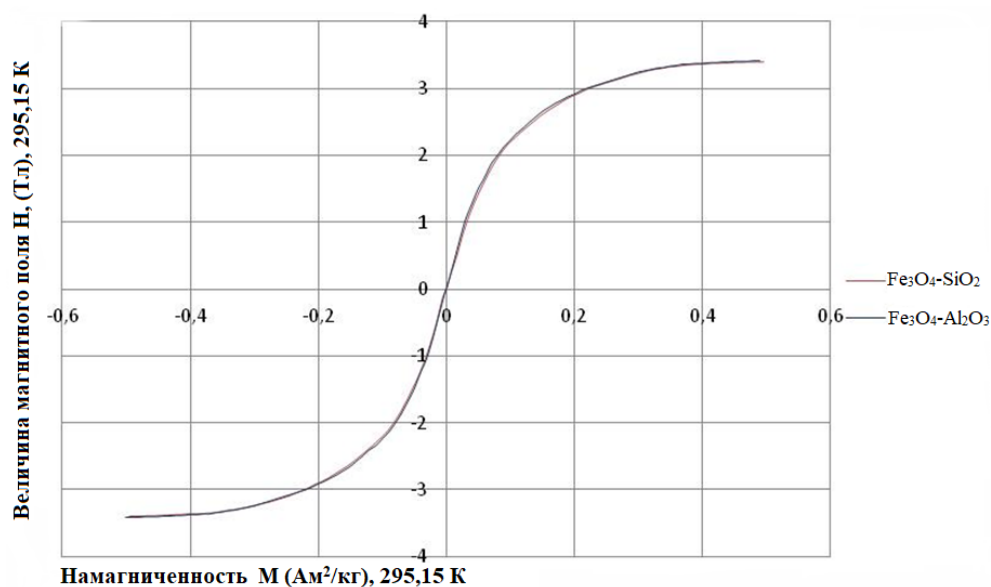


Рис. 4. Кривые гистерезиса магнитоотделяемых носителей

Влияние pH на активность биокатализаторов $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-GOx}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-GOx}$ проводилось в диапазоне pH 4-8 (рис. 5а).

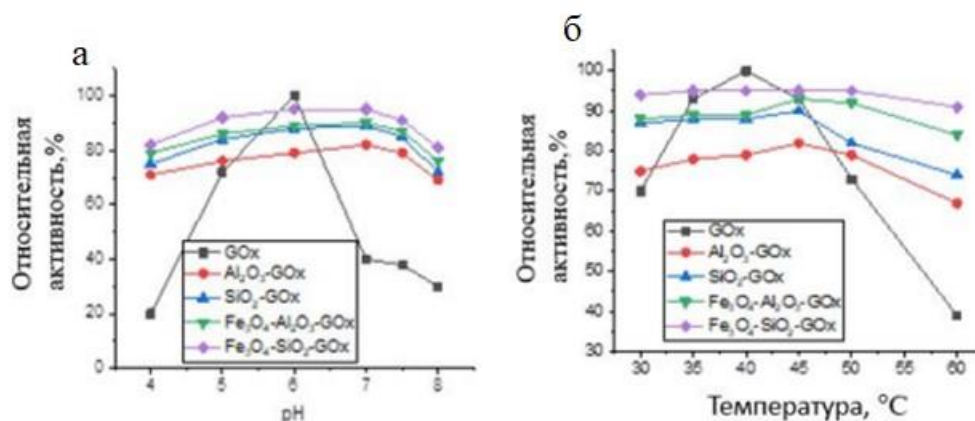


Рис. 5. Влияние pH (а) и температуры (б) на активность нативного и иммобилизованного GOx

Из рис. 5 (а) видно, что высокая активность биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия сохраняется в широком диапазоне pH по сравнению с нативным ферментом. Это говорит о том, что иммобилизация глюкозооксидазы на магнитоотделяемые носители повысила её относительную активность.

Также, повышение активности отмечается при исследовании влияния температуры. Рис. 5 (б) показывает, что относительно высокая активность ферментов сохраняется в широком диапазоне температур (30–60 °C). Наиболее высокую активность в 95% при 35–50 °C показал биокатализатор Fe₃O₄-SiO₂-GOx.

Таким образом, можно сделать вывод, что магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия могут быть эффективными носителями для ферментов. Также, установлено, что биокатализатор на основе GOx, иммобилизованной на магнитоотделяемый оксид кремния проявил самую большую каталитическую активность (95 %), по сравнению с остальными биокатализаторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ (грант МК-4300.2022.1.3).

Список литературы

1. Wilson R., Turner A.P. // *Glucose oxidase: An ideal enzyme*. 1992. P. 165–185.
2. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan. L. // *Glucose oxidase*. 2009. P. 489–501.
3. Bauer J.A., Zámocká M., Majtán J., Bauerová-Hlinková V. // *Glucose Oxidase, an Enzyme “Ferrari”: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications*. 2022. P. 472.

4. Faraji M. // Recent analytical applications of magnetic nanoparticles. 2016. P. 264-290.
5. Daoush W. M. // Co-Precipitation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles for Potential Biomedical Applications. 2017. P 1-6.
6. Mylkie K., Nowak P., Rybczynski P., Ziegler M. // Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles for Protein Immobilization. 2021. P. 248.
7. Chen D.H., Huang S.H., Liao M.H. Direct binding and characterization of Glucose oxidase onto magnetic nanoparticles. 2003. P. 1095-1100.

Об авторах:

СУЛЬМАН Александрина Михайловна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: alexsulman@mail.ru

БАЛАКШИНА Дарья Вадимовна – магистрант 1 курса кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: dasha.balakshina.01@bk.ru

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: afilatova@mail.ru

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: olechkamatveeva@mail.ru

МИХАЙЛОВ Степан Петрович – кандидат химических наук, специалист по учебно-методической работе кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», e-mail: stefan.oblivion@mail.ru

IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE ON MAGNETICALLY SEPARABLE CARRIERS

**A.M. Sulman, D.V. Balakshina, A.E. Filatova, O.V. Grebennikova,
S.P. Mikhailov**

Tver State Technical University, Tver

Enzymes are effective biocatalysts, however, due to the limited possibility of their use in native form, it is necessary to select suitable methods of

immobilization, as well as carriers for their stabilization. Materials of various origins can be used as carriers for this process, the most attractive of which are mesoporous magnetic materials. In this article, biocatalysts based on glucose oxidase immobilized on magnetically separated silicon and aluminum oxides are investigated.

Keywords: *glucose oxidase (GOx), biocatalyst, immobilization, silicon oxide (silica), aluminum oxide*

Дата поступления в редакцию: 10.10.2023.

Дата принятия в печать: 31.10.2023.