

УДК 579.222.3

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ГЛЮКООКСИДАЗЫ

Е.П. Голикова, Н.В. Лакина, В.Г. Матвеева, А.И. Сидоров

Тверской государственный технический университет, г. Тверь

Приведен обзор современных способов получения иммобилизованной глюкооксидазы и ее применения в органическом синтезе и медицине. К современным способам иммобилизации ферментов можно отнести их нанесение на такие неорганические носители, как золото, осмий и магнитные наночастицы. Иммобилизованная глюкооксидаза применяется на современном этапе в качестве мембран для изготовления биосенсоров, а также в качестве биокатализатора для синтеза D-глюконовой кислоты.

Ключевые слова: глюкооксидаза, D-глюконовая кислота, биокаталитическое окисление, биосенсоры.

В настоящее время глюкооксидаза в качестве биологического катализатора широко применяется в различных отраслях пищевой, фармацевтической промышленности, в медицине, в тонком органическом синтезе и т.д. В статье рассматриваются современные подходы к иммобилизации глюкооксидазы с целью увеличения ее активности и стабильности, а также способы ее применения. Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) – фермент, класса оксидоредуктаз, ускоряющий окисление D-глюкозы до D-глюконовой кислоты, при этом образуется пероксид водорода. Фермент обычно проявляет активность при рН (4–6) и температуре 30–50 °С. Но максимальную активность глюкооксидаза проявляет при температуре 40 °С и рН 5.0 [1]. На рис. 1 представлена молекулярная модель глюкооксидазы.

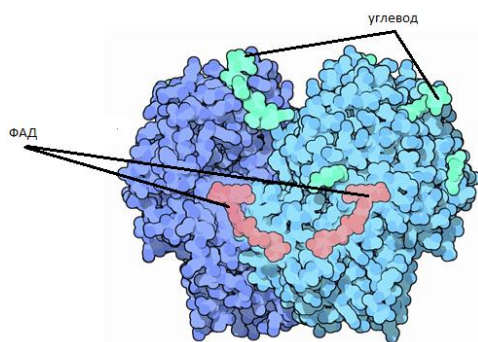


Рис. 1. Молекулярная модель глюкооксидазы

Из рис. 1 видно, что глюкозооксидаза – это димерный белок, который содержит в качестве кофактора две тесно связанные молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД), распространённого компонента окислительно-восстановительных реакций. Молекулярная масса субъединиц глюкооксидазы примерно по 80 кДа. Каждая субъединица содержит 580 аминокислотных остатков, кофактор ФАД, шесть N-ацетилглюкозааминовых остатков, три остакаманнозы и 152 молекулы растворителя. ФАД располагается недалеко от поверхности димера. Димер содержит два дисульфидных мостика, которые соединяют две субъединицы вместе. Глюкозооксидаза представляет собой глюкопротеин. Ферментативная глобула содержит 10–17% углеводов [2]. В работах [3–5] изучается окисление D-глюкозы в присутствии иммобилизованной глюкооксидазы в нейтральном водном растворе при комнатной температуре. Для иммобилизации глюкооксидазы в качестве носителей использовались: Au/ZrO₂, Au/ND, Au/La₂O₃, Au/Al₂O₃, Au/CeO₂, Au/SnO₂, Au/MnO₂, Au/Co₃O₄, Au/Fe₂O₃, Au/SiO₂, Au/TiO₂, Au/ZnO, Au/V₂O₅, Au/NiO, Au/CuO. Окисление глюкозы осуществляли с использованием 2 % глюкозы в водном растворе (31 мл), 0.13 г – глюкооксидазы и 8.0 мг катализатора. Перемешивание проводили при 30 °С, pH = 7.0 в течение часа. Полученные результаты процесса окисления в присутствии синтезированных биокатализаторов представлены в таблице.

Активность глюкозооксидазы в сочетании с золотыми катализаторами, в процессе окисления D-глюкозы

№ опыта	Носитель/ Катализатор	Выход глюконовой кислоты %, через 1ч
1	Au/ZrO ₂	98±2
2	Au/ND (NanoDiamond)	98±2
3	Au/La ₂ O ₃	98
4	Au/Al ₂ O ₃	96
5	Au/CeO ₂	95
6	Au/SnO ₂	94
7	Au/MnO ₂	91
8	Au/Co ₃ O ₄	91
9	Au/Fe ₂ O ₃ ,	88
10	Au/SiO ₂ ,	87
11	Au/TiO ₂	86
12	Au/ZnO	84
13	Au/V ₂ O ₅	83
14	Au/NiO	73
15	Au/CuO	42

Из таблицы видно, что фермент, иммобилизованный на Au/ZrO₂ и Au/Al₂O₃, проявляет наибольшую каталитическую активность для

аэробного окисления глюкозы в нейтральных условиях в отличие от других металлических катализаторов. В работе [6] изучалась совместная иммобилизация осмия и фермента. Иммобилизация проводилась путем последовательного нанесения на полимерные пленки, затем на электроды. Оптимальное количество осмия и глюкозооксидазы в пленках, совместно иммобилизованных на угольные электроды в присутствии многостенных углеродных нанотрубок и сшивающих агентов (25 %-й раствор глутарового альдегида), обеспечивают высокоэффективное и стабильное окисление глюкозы. Выход глюконовой кислоты при данном методе составил более чем 70 % при окислении глюкозы в течение 24 ч. Результаты исследования указывают на перспективное применение ферментативных топливных элементов. Интерес представляют исследования [7–9], посвященные изучению биокатализаторов на основе магниторазделяемых систем. Для получения таких биокатализаторов использовали фермент глюкооксидазу в сочетании с магнитными наночастицами. В предлагаемой методике не используются токсичные реагенты или растворители. Магнитные наночастицы получали с помощью известного метода соосаждения. Фермент глюкооксидаза успешно иммобилизован на микрочастицы Fe_3O_4 в водной среде без сшивающих агентов. Полученные магниторазделяемые системы могут быть легко отделены с помощью магнита и повторно использоваться в течение 10 последовательных циклов без явного снижения каталитической активности. В исследовании [10] предложен перспективный метод изготовления биосенсоров на основе глюкооксидазы. Для этого фермент глюкооксидаза иммобилизовывали на графитовые электроды путем сшивки глутаровым альдегидом. В основе работы биосенсора используется биокаталитическая реакция окисления D-глюкозы молекулярным кислородом до пероксида водорода и D-глюконо-1,5-лактона, который затем спонтанно превращается в D-глюконовую кислоту. Схема окисления D-глюкозы до пероксида водорода и D-глюконо-1,5-лактона представлена на рис. 2.

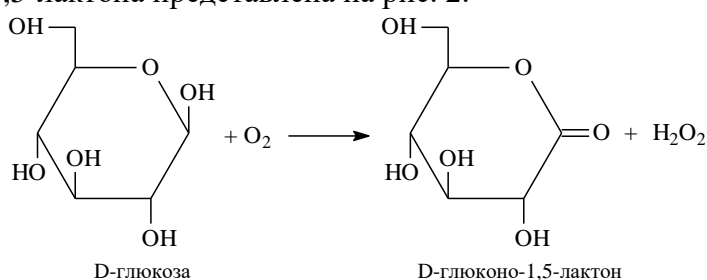


Рис. 2. Схема окисления D-глюкозы до пероксида водорода и D-глюконо-1,5-лактона

Наиболее важным моментом в исследовании является то, что полученный биосенсор позволяет работать в широком линейном диапазоне рН. Таким образом, можно сделать вывод о том, что иммобилизация глюкооксидазы улучшает ее свойства, тем самым расширяется спектр ее успешного применения в медицине и фармацевтической промышленности.

Список литературы

1. Jagdish S., Neelam V. // Adv. Appl. Sci. Res. 2013. V. 4, № 3. P.250–257.
2. Семашко Т.В., Михайлова Р.В. // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. М., 2016. С. 110–121.
3. Taketoshi A., Takenouchi S., Takei T., Haruta M. // Applied Catalysis. A: General. 2014. V. 474. P. 257–262.
4. Lang N.J., Liu B., Liu J. // J. Colloid and Interface Sci. 2014. V. 428. P. 78–83.
5. Megnas-Sayago C., Ivanova S., Lypez-Cartes C., Centeno M.A., Odriozola J.A. // Catalysis Today. 2016. V. 279. P. 148–154.
6. MacAodha D., Conghaile P., Egan B., Kavanagh P., Sygmund C. // Electroanalysis. 2013. V. 25. P. 94 – 100.
7. Garcia J., Zhang Y., Taylor H., Cespedes O., Michael E. // Nanoscale. 2011. V. 3. P. 3721–3730.
8. Yang M., Guan Y., Yang Y., Xia T. // Materials Letters. 2014. V. 137. P. 113–116.
9. Podolean I, Kuncser V. // Green Chem. 2013. V. 15. P. 3077–3082.
10. Kausaite-Minkstimiene A., Mazeiko V., Ramanaviciene A., Ramanavicius A. // Biosensors and Bioelectronics. 2012. V. 26. P.790–797.

THE STUDY OF METHODS OF PRODUCTION AND APPLICATION OF IMMOBILIZED GLUCOSE OXIDASE

E.P. Golikova, N.V.Lakina, V.G.Matveeva, A.I. Sidorov

Tver State Technical University, Tver

The article provides an overview of current methods of obtaining immobilized glucose oxidase, applications in organic synthesis and medicine. Modern methods of immobilization include the application of inorganic carriers such as gold, osmium and magnetic nanoparticles. Immobilized glucose oxidase applied at the present stage as membranes for the fabrication of biosensors, and also as biocatalyst for the synthesis of D-gluconic acid.

Keywords: *glucose oxidase, gluconic acid, biocatalytic oxidation, biosensor.*

Об авторах:

ГОЛИКОВА Екатерина Павловна – аспирант 2 курса кафедры биотехнологии и химии, Тверской государственной технической университет (ТвГТУ), e-mail: golikova87@rambler.ru

ЛАКИНА Наталия Валерьевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и химии ТвГТУ, e-mail: lakina@yandex.ru

МАТВЕЕВА Валентина Геннадьевна – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии и химии, ТвГТУ, e-mail: valen-matveeva@yandex.ru

СИДОРОВ Александр Иванович – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии и химии, ТвГТУ, e-mail: sidorov@yandex.ru