

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.15

DOI 10.26456/vtchem2026.2.9

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ОКСИДАХ ЦИРКОНИЯ

О.В. Гребенникова, А.М. Сульман, А.В. Соколова,
В.Г. Матвеева

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», Тверь

Благодаря быстрому механизму действия, высокой стабильности и специфичности, глюкозооксидаза нашла широкое применение в различных областях промышленности. Иммунизация ее на оксидах циркония позволяет увеличить ее стабильность в широком диапазоне pH и температур. В работе исследовались магнитоотделяемые ZrO_2 , прокаленные при 300, 400 и 600 °C. Коэффициент иммобилизации глюкозооксидазы зависил от температуры кальцинирования ZrO_2 , поскольку лучшие значения были получены при более высоких температурах прокаливания. Значения максимальной относительной активности (98 %) продемонстрировал биокатализатор $Fe_3O_4-ZrO_2-600-GOx$.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, иммобилизация, магнитоотделяемые оксиды циркония

Введение

Глюкозооксидаза играет множество важных ролей в биологических процессах и находит практическое применение в различных отраслях промышленности. Ее применяют в медицине и фармацевтике при создании биосенсоров, как основной компонент тест-полосок для глюкометров [1]. В пищевой промышленности благодаря глюкозооксидазе можно улучшить качество теста при хлебопечении и удалить избыточный кислород при консервации продуктов. В животноводстве глюкозооксидаза применяется в качестве кормовой добавки как альтернатива антибиотикам. Также этот фермент нашел свое применение в биоэнергетике в миниатюрных биотопливных элементах и текстильной промышленности в качестве отбеливающего агента [2].

Глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы до глюконо-β-лактона, который впоследствии гидролизуется до глюконовой кислоты в присутствии молекулярного кислорода. Обладает быстрым механизмом действия, высокой стабильностью и специфичностью [3]. Однако, широкое применение свободной формы фермента в промышленности

ограничено рядом факторов. Из-за низкой стабильности к высоким температурам и чувствительности к pH фермент способен денатурировать при использовании его при неоптимальных условиях. К тому же, нативные формы ферментов невозможно повторно использовать, а очистка целевого продукта от реакционной смеси имеет затруднения. Для преодоления этих ограничений в современной практике чаще используют **иммобилизованную** глюкозооксидазу, которая является более стабильной и пригодна для многократного применения [4].

Важным этапом при иммобилизации ферментов является выбор подходящего материала для носителя. Поскольку носитель должен обеспечивать структурную стабильность, эффективную загрузку фермента и быть биосовместимым [5], к распространенным носителям для иммобилизации ферментов можно отнести наночастицы, микрокапсулы, гидрогели и мембраны [6].

Экспериментальная часть

В данной работе глюкозооксидаза была ковалентно иммобилизована на магнитоотделяемые оксиды циркония, прокаленные при 300, 400 и 600 °C. Определены оптимальные значения pH и температуры.

Синтез биокатализатора. При получении биокатализатора в первую очередь был синтезирован мезопористый оксид циркония [7]. Для этого мезопопистый SiO_2 добавляли к водному раствору оксихлорида циркония. После чего смесь высушивали при температуре 100 °C. Высушенный образец полученной смеси прокаливали при 300° C (образец 1), 400° C (образец 2) и 600 ° C (образец 3). Для удаления SiO_2 из образцов их перемешивали с 2 М раствором NaOH. Затем образцы промывали этанолом высушивали. В результате были получены ZrO_2 -300, ZrO_2 -400 и ZrO_2 -600.

Для получения магнитоотделяемого оксида циркония образцы перемешивали с 0,48 г нонагидрата нитрата железа (III) в 2,4 мл этанола. После к полученной смеси по каплям добавляли этиленгликоль и нагревали в атмосфере аргона до 250 ° C. Затем образцы промывали ацетоном и сушили в вакуумной печи. Таким образом были получены три образца Fe_3O_4 - ZrO_2 -300, Fe_3O_4 - ZrO_2 -400 и Fe_3O_4 - ZrO_2 -600.

Чтобы функционализировать магнитоотделяемые мезопористые оксиды циркония их обрабатывали водным раствором аминопропилтриэтоксисилана (APTES) при 90 °C в течение 5 часов. После промывания и высушивания образцов проводилась иммобилизация глюкозооксидазы (GOx) с помощью ковалентного связывания. В качестве сшивающего агента был выбран глутаровый альдегид (GA). Для этого к модифицированным магнитоотделяемым

носителям добавляли раствор GA и перемешивали в течение 1 часа. Затем полученные образцы перемешивались с буферным раствором глюкозооксидазы. В результате были получены три образца биокаталитических систем: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-300-GOx}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-400-GOx}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$. Аналогичная процедура модификации, активации и иммобилизации GOx проводилась для исходных прокаленных образцов ZrO_2 ($\text{ZrO}_2\text{-300-GOx}$, $\text{ZrO}_2\text{-400-GOx}$ и $\text{ZrO}_2\text{-600-GOx}$).

Для определения количества иммобилизованного фермента учитывали начальную концентрацию GOx в фосфатном буфере и концентрацию GOx, оставшейся в буферном растворе после иммобилизации. Для оценки того количества GOx, которое иммобилизовалось на магнитные носители, был определен коэффициент иммобилизации (IC) [8]:

$$IC = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

где C_0 и C_1 - количества GOx (мкг/мл) в фильтрате до и после иммобилизации (после удаления биокатализатора) соответственно.

Полученные магнитоотделяемые биокатализаторы тестировались в реакции окисления глюкозы в термостатированной трехгорлой круглодонной колбе. Реакция проводилась при варьировании значений pH и температуры. При достижении необходимой температуры в колбу вносились: биокатализатор, субстрат и фосфатный буфер. Реакционная смесь перемешивалась в течение 1 часа, после чего вводился кислород. По окончании реакции биокатализатор отделяли с помощью неодимового магнита, а полученные продукты оценивали с помощью ВЭЖХ.

Результаты и обсуждения

Первоначально определялось количество иммобилизованного фермента на всех типах носителей. На рисунке 1 представлены значения коэффициента иммобилизации.

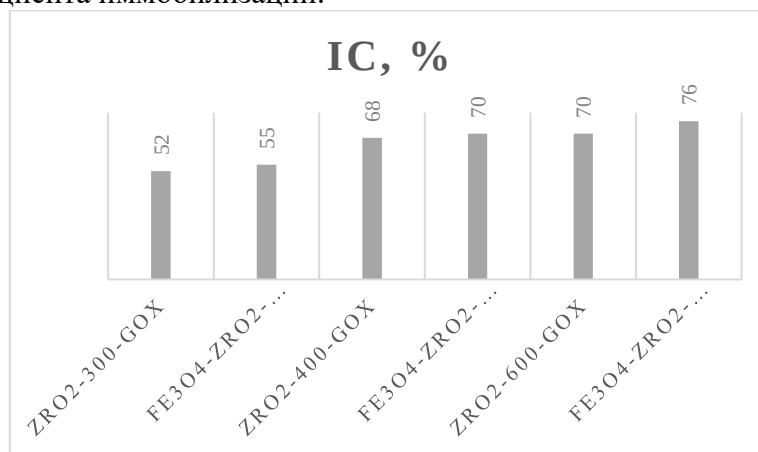


Рис. 1. Значения коэффициента иммобилизации для биокаталитических систем

Из рисунка 1 видно, что самые высокие значения ИС характерны для биокатализаторов, которые были приготовлены с использованием исходного ZrO_2 , прокаленного при высоких температурах. Наивысшие значения достигнуты для ZrO_2 -600 (70%) и Fe_3O_4 - ZrO_2 -600 (76%), а самые низкие для ZrO_2 -300 (52%) и Fe_3O_4 - ZrO_2 -300 (55%). К тому же, можно отметить, что ИС был выше для магнитоотделяемых образцов.

Для определения оптимальных значений pH реакция проводилась при варьировании pH от 4 до 8. Активность всех биокатализаторов была выражена в виде относительной активности, в виде сравнения с нативным ферментом в одинаковых условиях (рисунок 2).

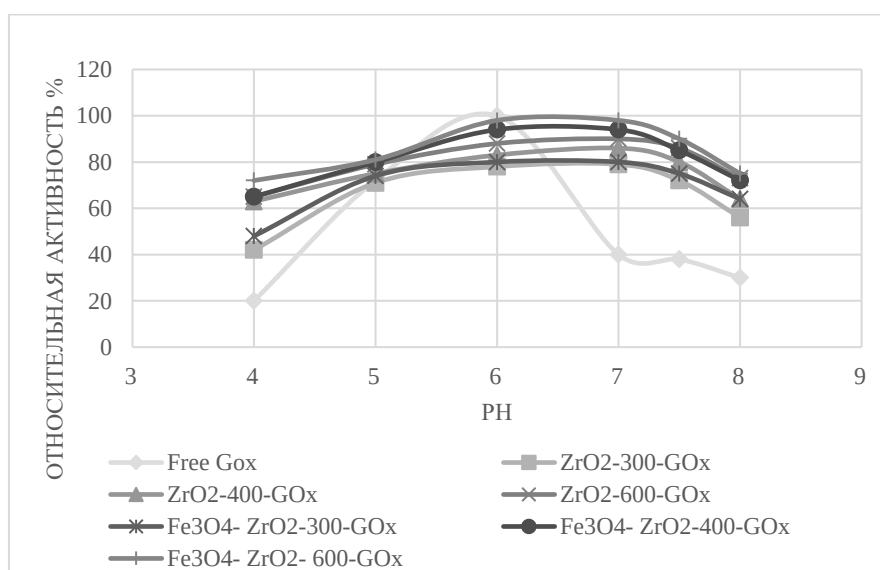


Рис. 2 Относительная активность биокатализаторов при разных значениях pH

Поскольку при иммобилизации ферментов их активность способна сохраняться в широком диапазоне pH. Это видно из данных, представленных на рисунке 2, поскольку для биокатализаторов на основе ZrO_2 активность одинакова при pH 6 и 7 и медленно уменьшается с увеличением или снижением pH. Максимальная активность нативной GOx (100 %) наблюдается при значении pH 6.0. Таким образом, иммобилизация GOx привела к устойчивости к изменениям кислотности реакционной среды. Наибольшая относительная активность 98% при pH 6 и 7 наблюдалась для Fe_3O_4 - ZrO_2 -600-GOx.

Для определения влияния температуры на активность биокатализаторов была проведена серия экспериментов при варьировании температуры от 30 до 70 °C при pH 6 (рисунок 3).

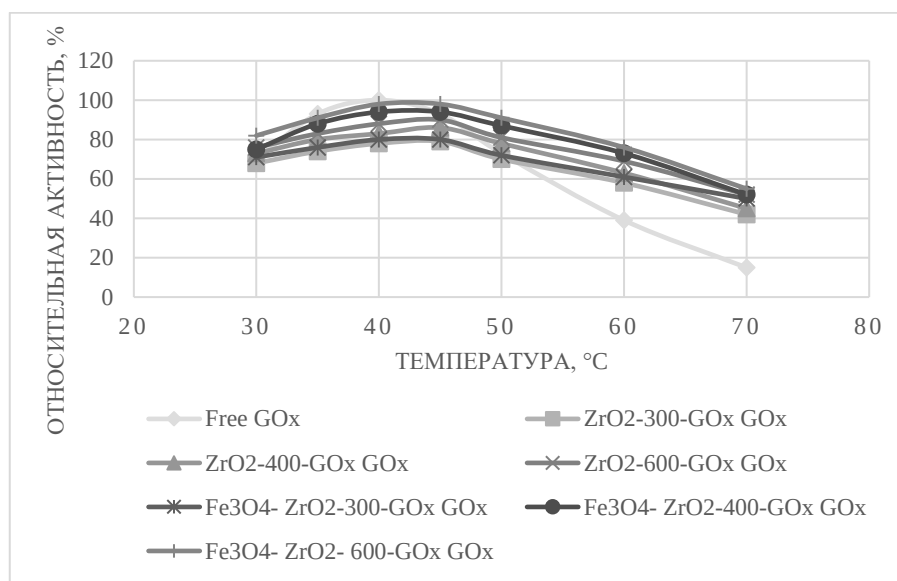


Рис. 3 Влияние температуры на активность биокатализаторов

Из данных, представленных на рисунке 3 видно, что биокатализаторы на основе иммобилизованной GOx показывают сохранение активности в широком диапазоне температур. Максимальная относительная активность нативной формы GOx наблюдается при 40 °C, при этом активность иммобилизованного фермента при этом значении немного ниже. При увеличении температуры происходит денатурация нативного фермента. Также, наблюдается устойчивость к высоким температурам иммобилизованного фермента, по сравнению с его нативной формой. Среди синтезированных биокаталитических систем лучшие результаты были получены для Fe₃O₄-ZrO₂-600-GOx с относительной активностью 98% при 40-45 °C.

Выводы

Глюкозооксидаза является важнейшим промышленным ферментом, катализирующим окисление глюкозы. Иммобилизация ее на различных носителях позволяет значительно повысить ее стабильность в широких диапазонах pH и температуры. В работе глюкозооксидаза была иммобилизована на оксиды циркония, прокаленные при 300, 400 и 600 °C. Коэффициент активности был выше для образцов, прокаленных при 600 °C. В то же время, различия между образцами, обработанными при 400 °C и 600 °C, являются незначительными. При этом эффективность иммобилизации была выше для магнитоотделяемых образцов, что можно отнести к вкладу наночастиц Fe₃O₄. Экспериментальные данные показали, что наивысшей относительной активностью (98 %) обладают

биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на прокаленные при 600 °С магнитоотделяемые оксиды циркония. Таким образом, иммобилизация ферментов на ZrO₂ делает их полезными для промышленного производства и повышения устойчивости процессов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда 24-79-10042.

Список литературы

1. Allameh S., Rabbani M. A. Distance-Based Microfluidic Paper-Based Biosensor for Glucose Measurements in Tear Range // Appl Biochem Biotechnol. 2022. Vol. 194. P. 2077–2092.
2. Dubey M. K., Zehra A., Aamir M., Meena M., Ahirwal L., Singh S., Shukla S., Upadhyay R. S., Bueno-Mari R., Bajpai, V. K. Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates // Frontiers in microbiology. 2017. Vol. 8. P. 1032.
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 // Biomolecules/ 2022. Vol. 12 (3). 472.
4. Sreenivasulu G., Rao R.R. Advanced Techniques for Glucose Oxidase Immobilization: Evolution, Computational Integration, and Biomedical Applications // Advances in Engineering and Intelligence Systems. 2024. Vol. 3. P. 82-93.
5. Yang D., Tang Y., Zhu B., Pang H., Rong X., Gao Y., Du F., Cheng C., Qiu L., Ma L.. Engineering Cell Membrane-Cloaked Catalysts as Multifaceted Artificial Peroxisomes for Biomedical Applications. Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany). 2023. Vol. 10 (13).
6. Mohidem N.A., Mohamad M., Rashid M.U., Norizan M.N., Hamzah F., Mat Hb. Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers // Journal of Composites Science. 2023. Vol. 7(12):488.
7. Liu B., Baker R. Factors affecting the preparation of ordered mesoporous ZrO₂ using the replica method // Journal of Materials Chemistry. 2008. Vol. 18. P. 5200-5207.
8. Nguyen L. T., Yang K.L. Combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase for catalyzing cascade chemical reactions // Enzyme Microb. Technol. 2017. Vol. 100. P. 52-59.

Об авторах:

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверская область, г. Тверь, наб. Аф. Никитина, д. 22). E-mail:

olechkamatveeva@mail.ru, ORCID: 0000-0002-8888-1783, SPIN-код: 2995-9094, РИНЦ AuthorID: 725889.

СУЛЬМАН Александрна Михайловна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверская область, г. Тверь, наб. Аф. Никитина, д. 22). E-mail: alexsulman@mail.ru, ORCID: 0000-0002-6845-3431, SPIN-код: 6520-1380, РИНЦ AuthorID: 943458.

СОКОЛОВА Алена Владимировна – аспирант, преподаватель кафедры биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверская область, г. Тверь, наб. Аф. Никитина, д. 22). E-mail: alena.svet.00@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-7520-5444, SPIN-код: 9744-4948, РИНЦ AuthorID: 1258952.

МАТВЕЕВА Валентина Геннадьевна – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверская область, г. Тверь, наб. Аф. Никитина, д. 22). E-mail: valenmatveeva@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-3291-4865, SPIN-код: 8005-3995, РИНЦ AuthorID: 35822.

CATALYTIC PROPERTIES OF GLUCOSE OXIDASE IMMOBILIZED ON ZIRCONIUM OXIDES

O.V. Grebennikova, A.M. Sulman, A.V. Sokolova,
V.G. Matveeva

Tver State Technical University, Tver

Due to its rapid mechanism of action, high stability, and specificity, glucose oxidase has found wide application in various industrial fields. Immobilization on zirconium oxides increases its stability over a wide range of pH and temperatures. Magnetically separable ZrO_2 calcined at 300, 400, and 600°C were studied in this study. The immobilization coefficient of glucose oxidase depended on the calcination temperature of ZrO_2 , with better values obtained at higher calcination temperatures. The Fe_3O_4 - ZrO_2 -600-GOx biocatalyst demonstrated the highest relative activity (98%).

Keywords: glucose oxidase, immobilization, magnetically separated zirconium oxides

Дата поступления в редакцию: 18.02.2026.

Дата принятия в печать: 25.02.2026.