



На правах рукописи

Голикова Екатерина Павловна

**Синтез стабильных биокатализаторов на
основе глюкозооксидазы, иммобилизованной
на неорганические носители**

Специальность 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

**Москва
2019**

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Тверской государственной технической университет"

Научный руководитель: Матвеева Валентина Геннадьевна
доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии и химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической университет»

Официальные оппоненты: Понаморева Ольга Николаевна
доктор химических наук, заведующая кафедрой биотехнологии естественнонаучного института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет»

Гамаюрова Валентина Семеновна
доктор химических наук, профессор кафедры пищевой биотехнологии, советник при ректорате Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ивановский государственный химико-технологический университет"

Защита состоится "___" _____ 2019 г. в __:__ на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева по адресу: г. Москва, Миусская пл., д. 9, ауд. 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан "___" _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук, доцент _____ И.В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современной биотехнологии одну из ключевых позиций занимают ферменты. Высокая каталитическая активность в «мягких» условиях, уникальная специфичность и стереоспецифичность ферментов позволяют создавать на их основе эффективные и перспективные технологические процессы. Использование ферментов в нативной форме сопряжено с такими трудностями как инактивация под действием физических и химических факторов, а также с невозможностью повторного использования. Наиболее распространенным способом стабилизации является иммобилизация на гетерогенный носитель, сущность которой состоит в присоединении исходного фермента к подложке, осуществляемое адсорбционно, через химическую связь или путем механического включения фермента в гель, капсулу и т.п. Природа носителя, его структура, наличие функциональных групп, высокая химическая и биологическая стойкость имеют большое значение для иммобилизации ферментов.

За последнее десятилетие отмечен значительный рост внимания со стороны исследователей к магнитным наночастицам (МНЧ) и материалам на их основе. Важной и актуальной областью применения магнитных материалов, которая в последнее время привлекает всё больше внимания исследователей, является разработка магнитоотделяемых биокатализаторов. В этом случае МНЧ подвергаются функционализации и служат подложкой для формирования каталитических комплексов. Подобные МНЧ обладают уникальными свойствами за счёт большой площади поверхности. Активные центры, сформированные на поверхности таких каталитических систем, сочетают достоинства ферментативных (селективность, активность) и гетерогенных/магнитоотделяемых (легкость отделения и возможность модификации) катализаторов. В зависимости от характеристик фермента, носителя, модификатора можно варьировать каталитические свойства таких систем.

Иммобилизованные ферменты в настоящее время широко используются в синтезе различных лекарственных препаратов в мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов. Одним из наиболее широко применяемых ферментов является глюкозооксидаза (GOx, КФ 1.1.3.4, семейство оксигеназ, подкласс оксидоредуктаз), которая способна выступать в роли биокатализатора реакции окисления D-глюкозы (ГЛ) до D-глюконовой кислоты (ГК), применяемой в производстве лекарственных препаратов, пищевых добавок, чистящих средств и т.д.

Цель и задачи работы. Целью работы является обоснование и проведение синтеза стабильных гетерогенных биокатализаторов (в том числе магнитоотделяемых) на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические носители, и экспериментальная оценка их структурной и каталитической активности.

Для достижения данной цели были решены следующие задачи:

- теоретическое исследование методов синтеза биокатализаторов на основе иммобилизованной глюкозооксидазы;
- изучение существующих методов синтеза наночастиц магнетита;
- подбор условий синтеза магнитоотделяемых носителей;
- выбор модифицирующих и сшивающих агентов для синтеза биокатализаторов как на основе МНЧ, так и на частицах Al_2O_3 , SiO_2 ;
- осуществление синтеза иммобилизованных биокатализаторов;

- определение структурных, поверхностных, магнитных и других физико-химических характеристик синтезированных биокатализаторов;
- определение оптимальных условий процесса окисления D-глюкозы на основе экспериментального исследования влияния температуры, pH и количества субстрата на каталитическую активность биокатализаторов;
- проведение экспериментального скрининга активности и стабильности полученных биокатализаторов в окислении D-глюкозы;
- расчет кинетических параметров процесса окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов;
- выявление корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления D-глюкозы.

Научная новизна работы. В данной работе впервые изучена иммобилизация глюкозооксидазы за счет ковалентного связывания на модифицированной поверхности наночастиц магнетита, полученных полиольным методом и методом соосаждения. Подобраны оптимальные условия для иммобилизации глюкозооксидазы на магнитоотделяемые носители. Впервые проведено сравнение структуры биокатализаторов, синтезированных путем иммобилизации глюкозооксидазы на неорганические носители разной природы. Подробно изучены физико-химические характеристики синтезированных биокатализаторов и проведено тестирование их свойств в процессе окисления D-глюкозы. Выявлены корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления D-глюкозы. Подобраны оптимальные условия процесса окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии синтезированных биокатализаторов.

Практическая значимость работы. Биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические (в том числе магнитоотделяемые) носители, показали высокую активность и стабильность в процессе окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты, которая зарегистрирована в качестве пищевой добавки E574 как разрыхлитель и регулятор кислотности пищевых продуктов. Кроме того, глюконовая кислота является подкислителем, комплексообразователем, усиливает действие антиоксидантов. Наряду с пищевой промышленностью глюконовую кислоту применяют в фармацевтической индустрии с целью синтеза важных препаратов: глюконатов натрия, кальция, железа, а также глюконо- δ -лактона.

Сформулированные в работе подходы к синтезу магнитоотделяемых биокатализаторов (важное преимущество которых – магнитное осаждение из реакционного раствора, что позволяет исключить стадии очистки продукта от катализатора в производственных процессах) могут быть использованы при создании других промышленно значимых биокатализаторов.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы представлены на конференциях: «Биоресурсы: сырье химической промышленности.» Фарадей Дискуссии (Лондон, 2017 г), 13-й Европейский конгресс по катализу (Флоренция, 2017 г), «Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической промышленности» VIII международная конференция российского химического общества имени Д.И. Менделеева, посвященная 85-летию со дня рождения П.Д. Саркисова (Москва, 2017 г.), 4-й Международный симпозиум по химии превращения и сохранения энергии (Албена, Болгария, 2018г), Международный форум «Биотехнология: состояние и

перспективы развития. Науки о жизни.» (Москва, 2018 г.), 2-ая Международная конференция по химической инженерии в охране окружающей среды (Мальта, 2018 г.), 18-ая Международная многодисциплинарная научная конференция (Албена, Болгария, 2018 г.), 23-й Международный конгресс по химическому инженерингу (Прага, 2018 г.), IX международная конференция Российского химического общества им. Д.И. Менделеева: Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов (Москва, 2018 г.), XII Конкурс проектов молодых ученых (Москва, 2018), XXIII Международная конференция по химическим реакторам (Гент, Бельгия, 2018).

Публикации по теме диссертации. По теме работы опубликовано 17 печатных работ в изданиях, входящих международные реферативные базы данных Web of Science и Scopus, в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ и прочих изданиях.

Личный вклад автора. Выполнена постановка цели и задач исследования, обобщены литературные данные. Автором были синтезированы магнитные наночастицы методом соосаждения, полиольным методом. Подобраны модифицирующие (тетраэтоксисилан и 3-аминопропилтретоксисилан) и сшивающий (глутаровый альдегид) агенты для магнитных наночастиц. Непосредственно автором были получены биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на Al_2O_3 , SiO_2 , Fe_3O_4 и проведены научные эксперименты по определению активности синтезированных биокатализаторов и подбору оптимальных условий для процесса окисления D-глюкозы. Выполнен анализ полученных результатов экспериментов и обсуждены данные физико-химического анализа биокатализаторов: ИК-спектроскопии, рентгенофотоэлектронной спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, сканирующей микроскопии образцов, измерения намагниченности образцов, определения площади удельной поверхности и пористости образцов.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Текст изложен на 155 страницах, включает 69 рисунков и 21 таблицу. Список литературы содержит 113 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, изложены цель, научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

В первой главе «Обзор литературы» изложены общие представления об окислении D-глюкозы химическим, электрохимическим, каталитическим, а также биокаталитическим способом. Окисление в присутствии фермента имеет ряд преимуществ: реакция протекает в мягких в отношении температуры, давления, pH условиях и не является энергоемкой. Представлена характеристика и строение GOx, а так же методы иммобилизации фермента на различные носители. Рассмотрены способы синтеза носителей на основе магнитных наночастиц, которые являются весьма перспективными, так как характеризуются высокой механической прочностью, относительной дешевизной, стабильностью и легкостью отделения от реакционной среды.

Во второй главе «Методы экспериментов и анализов» приведены методики получения биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на магнитные

наночастицы (МНЧ) и оксиды (Al_2O_3 , SiO_2). Подробно описан синтез магнитных наночастиц полиольным способом и методом соосаждения. Представлены методика и оборудование окисления ГЛ в присутствии синтезированных биокатализаторов. Приведена методика анализа реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Описаны физико-химические методы анализа биокатализаторов (измерение магнитных характеристик с помощью вибрационного магнитометра, инфракрасной спектроскопии, низкотемпературной адсорбции азота, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии). Приведена методика расчета кинетических параметров.

В третьей главе «Результаты экспериментов и их обсуждение» приводятся анализ и трактовка полученных результатов синтеза, физико-химического анализа биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на неорганические носители и экспериментов по окислению ГЛ до ГК.

На первом этапе работы проводился выбор оптимальных параметров и синтез биокатализаторов путем иммобилизации GOx на неорганические, в том числе магнитоотделяемые носители. Для иммобилизации GOx использовались стандартные носители Al_2O_3 , SiO_2 и синтезированные в данной работе магнитные частицы Fe_3O_4 . Синтез МНЧ осуществлялся двумя методами соосаждения ($\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$) и полиольным ($\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$). Синтез МНЧ соосаждением проводили путем смешивания солей железа +2 и +3 и процесс выражается уравнением:



В случае полиольного синтеза наночастиц магнетита используется соль Fe^{+3} . В процессе синтеза происходит частичное восстановление Fe^{+3} до Fe^{+2} и формирование частиц смешанных оксидов Fe_3O_4 . Схема протекающих реакций может быть представлена следующим образом:



В качестве полиола использовался полиэтиленгликоль, который является не только восстановителем, но и стабилизатором контроля роста частиц и предотвращения агрегации между частицами. Образцы носителей $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ отличались от образца $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ временем выдержки (изменяли от 2-х до 48 часов) и количеством этиленгликоля (уменьшали объем от 30 до 20 мл). Для дальнейшего синтеза биокатализаторов, предложена схема модификации МНЧ и создание структуры «ядро-оболочка». На первой стадии после обработки тетраэтоксисиланом (TEOS) формируется $\text{Si}(\text{OH})_4$ -оболочка, а на второй стадии, под воздействием 3-аминопропилтриэтоксисилана APTES поверхность МНЧ модифицируется NH_2 -группами. Далее, для ковалентного связывания фермента с носителем, высушенные образцы модифицированного Fe_3O_4 обрабатываются раствором глутарового альдегида (GA) и далее буферным раствором GOx. Таким образом, были синтезированы магнитоотделяемые биокатализаторы: $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$

(Fe₃O₄(1)/GOx), Fe₃O₄(2)/TEOS/APTES/GA/GOx (Fe₃O₄(2)/GOx),
Fe₃O₄(3)/TEOS/APTES/GA/GOx (Fe₃O₄(3)/GOx), Fe₃O₄(4)/TEOS/APTES/GA/GOx
(Fe₃O₄(4)/GOx).

Биокатализаторы на основе Al₂O₃ и SiO₂ синтезировались путем модификации поверхности носителя 3-аминопропилтретоксисиланом, глутаровым альдегидом и последующим связыванием с GOx (получены образцы: Al₂O₃/APTES/GA/GOx (Al₂O₃/GOx) и SiO₂/APTES/GA/GOx (SiO₂/GOx)).

Следующий раздел посвящен определению структуры, морфологии и свойств синтезированных биокатализаторов с использованием различных методов физико-химического анализа. С помощью вибрационного магнитометра были определены магнитные свойства исходных носителей и биокатализаторов на основе Fe₃O₄. Полученные кривые намагничивания исходных носителей и биокатализаторов представлены, как зависимость удельной намагниченности M магнитных наночастиц Fe₃O₄ от величины магнитного поля H . Измерения проводили при температуре 295,15 К (рисунок 1) и 313,15К.

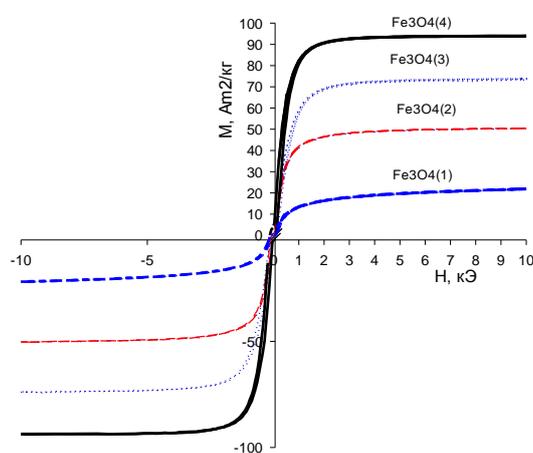


Рисунок 1 – Кривые намагничивания и размагничивания при T=295,15К для исходных МНЧ Fe₃O₄, полученных разными методами

Полученные данные, свидетельствуют о том, что исследованные образцы исходных носителей является магнитомягкими ферромагнетиками, т.к. на кривых полностью отсутствует гистерезис. Кривые намагничивания подтверждают, что полученные наночастицы Fe₃O₄, независимо от способа получения обладают суперпарамагнитными свойствами. Анализ результатов показывает, что наиболее высокой намагниченностью (94.15 Ам²/кг) характеризуются МНЧ, синтезированные полиольным методом (Fe₃O₄(4)). Кривые намагничивания были сняты и для биокатализаторов, результаты оказались аналогичными исходному носителю (Fe₃O₄). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что модификация носителя и пришивка фермента GOx не оказывает влияние на магнитные свойства материала. Таким образом, в данной работе, предложен синтез магнитоотделяемых биокатализаторов на основе Fe₃O₄, которые можно легко отделять от реакционной среды в магнитном поле без применения сложной системы фильтров, что очень важно для проведения процессов в промышленных масштабах.

Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) исследованы магнитные наночастицы Fe₃O₄, полученные различными методами (см. рисунок 2). ПЭМ-изображения показывают, что МНЧ синтезированные методом соосаждения

$\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ (рисунок 2 а) имеют смешанную структуру, частицы имеют неоднородную форму без четких границ. В отличие от них, частицы магнетита, полученные полиольным способом ($\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ – рисунок 2 б, с, d), имеют сферическую форму, в виде «ежиков» (игольчатое очертание поверхности), но различаются между собой по размеру.

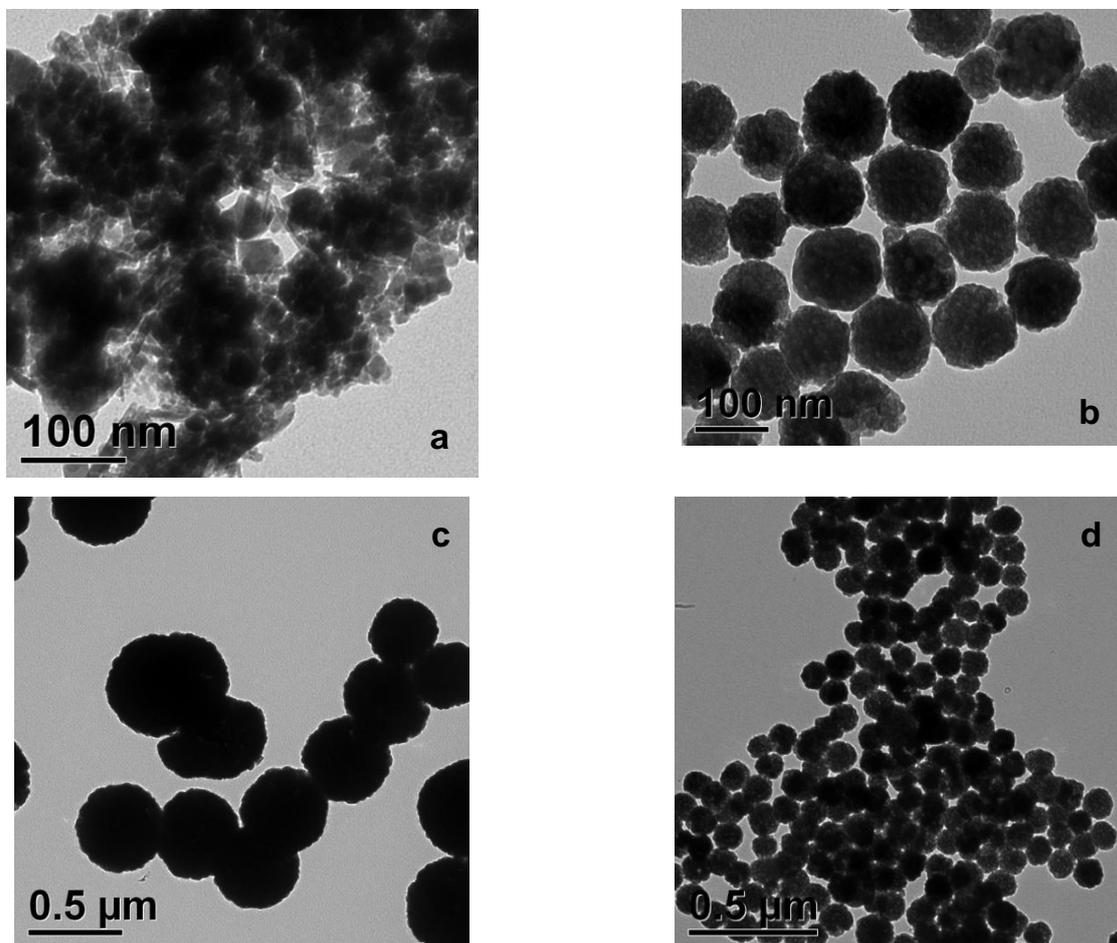


Рисунок 2 – Микрофотографии магнитных наночастиц методом ПЭМ:
а) $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ б) $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ с) $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ d) $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$

Наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ имеют средний диаметр 111 ± 5 нм (рисунок 2 б). При изменении условий синтеза и увеличении времени выдерживания до 48 часов (образцы $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$) размер МНЧ увеличивается и поверхность имеет более сглаженные очертания (рисунок 2 с, d). При варьировании количества этиленгликоля, т.е, изменяя мольное соотношение Fe_3O_4 :этиленгликоль, изменяется размер агрегатов наночастиц оксидов железа. Изображения ПЭМ (рисунок 2 с, d) показывают, что образуются агрегаты МНЧ с диаметром 430 ± 60 нм ($\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$) и диаметром 285 ± 71 нм ($\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$). Из представленных данных видно, что при уменьшении количества этиленгликоля, размер частиц уменьшается. Возможно, что большее содержание полиола способствует агрегации наночастиц Fe_3O_4 . Изображение ПЭМ (рисунок 2 б, с, d) показывает, что для всех образцов МНЧ полиольного синтеза, агрегаты состоят из отдельных наночастиц диаметром $\sim 42-45$ нм.

Полученные образцы МНЧ после модификации исследованы методами ПЭМ, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и энергодисперсионной

рентгеновской спектроскопии (EDS). Результаты представлены на рисунке 3 на примере модифицированных образцов $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$. СЭМ - изображения образцов магнетита, покрытых $\text{Si}(\text{OH})_4$, а затем модифицированные NH_2 – группами (рисунок 3 а, б) показывают, что в результате нанесения TEOS поверхность становится гладкой. Слой модификаторов на поверхности МНЧ хорошо виден в изображении ПЭМ (рисунок 3 с, d) и имеет толщину ≈ 27 нм. Результаты EDS представлены в виде STEM-изображения и карты EDS модифицированного образца ($\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{TEOS}/\text{APTES}/$) на рисунке 4. Карта EDS Fe показывает, что наночастицы магнетита объединены в агрегаты (аналогично изображению темного поля). Карта EDS Si отображает оболочку из гидроксида кремния в той же форме, что и агрегаты МНЧ. Наложение карт Fe и Si четко показывает, что строение модифицированных МНЧ соответствует структуре «ядро-оболочка», т.е. частицы содержат ядро «Fe» и оболочку «Si».

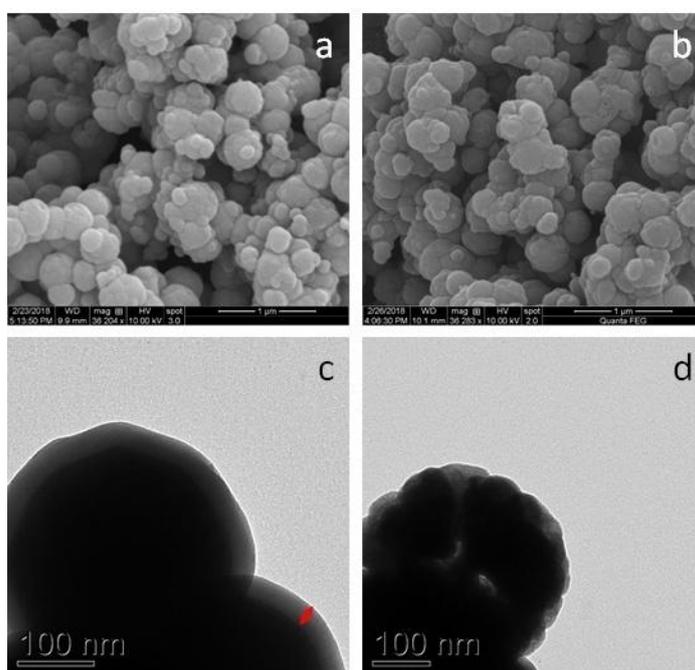


Рисунок 3 – Микрофотографии магнитных наночастиц, модифицированных TEOS и APTES, СЭМ (a,b) и ПЭМ (c,d): а, с $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ b,d $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$

Каталитические свойства иммобилизованной GOx исследовались в реакции окисления ГЛ до ГК, которая проходит в две стадии (рисунок 5). На первой стадии образуется D-глюконо-1,5-лактон, который на второй стадии гидролизует в D – глюконовую кислоту. Для определения оптимальных условий окисления ГЛ в присутствии нативного фермента и биокатализаторов на основе иммобилизованной GOx, варьировали концентрацию субстрата, pH и температуру. Активность биокатализаторов, содержащих одинаковое количество фермента, оценивалась по содержанию ГК в реакционной смеси по окончании процесса и рассчитывалась как выход ГК (%). На рисунке 6 представлена зависимость выхода D – глюконовой кислоты от начальной концентрации субстрата ($c_{\text{глюкозы}}$ варьировали от 0.05 моль/л до 0.75 моль/л).

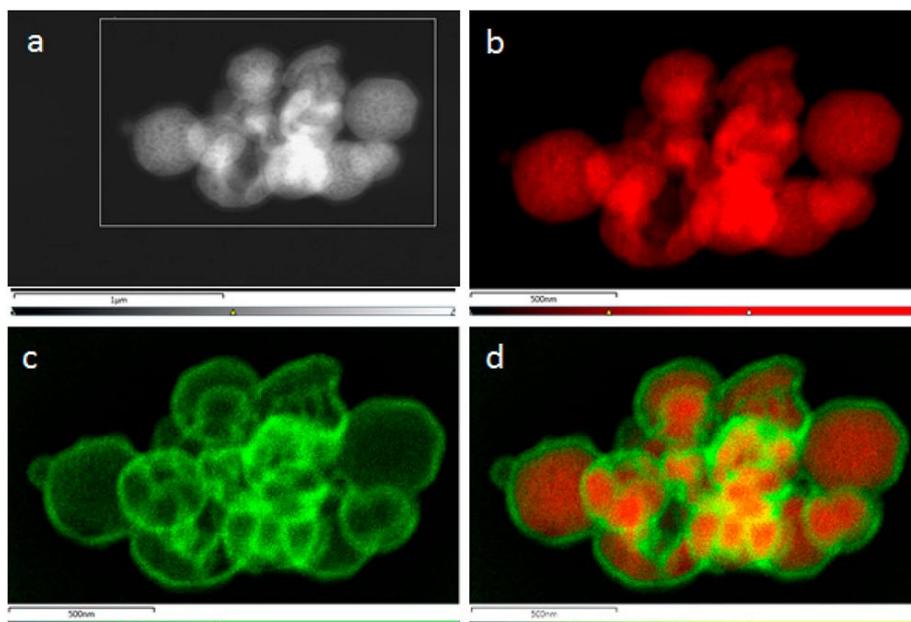


Рисунок 4 – STEM -изображение «темного поля» (a) и карты EDS агрегатов наночастиц оксидов железа для Fe (b), Si (c) и их смесь (d)

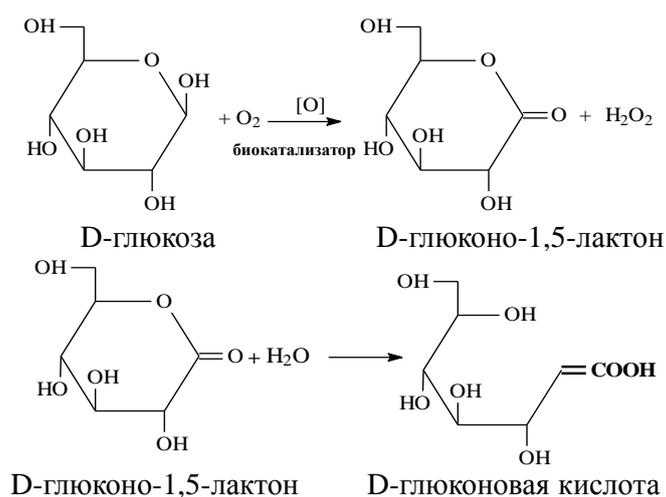


Рисунок 5 – Схема окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии биокатализатора

Анализ полученных данных показал, что наибольший выход ГК наблюдается при начальной концентрации ГЛ равной 0.37 моль/л. После увеличения концентрации субстрата до 0.74 моль/л выход ГК при использовании нативного фермента составил 29,5%, а с использованием биокатализаторов: 67,5% ($\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$); 75,3 % ($\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx}$); 78,0% ($\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx}$); 84,3% ($\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$); 60,1 % (SiO_2/GOx); 50,2% ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$). Анализ полученных данных показывает, что при использовании биокатализаторов нет резкого снижения выхода ГК, в отличие от нативного фермента. При этом максимальный выход ГК наблюдается при использовании биокатализаторов на основе Fe_3O_4 синтезированных полиольным методом.

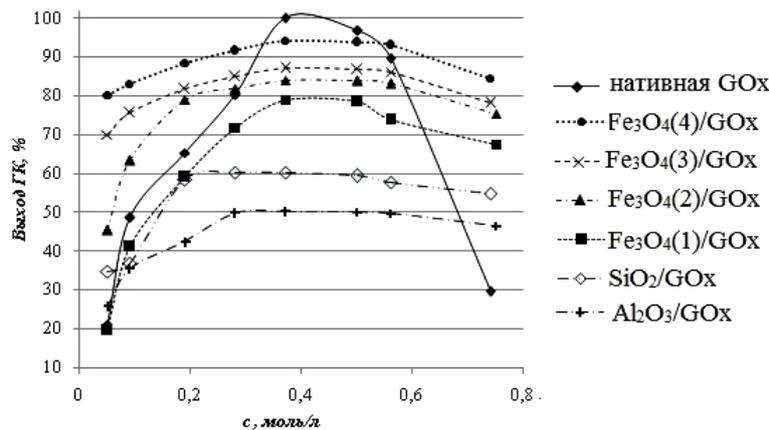


Рисунок 6 – Зависимость выхода D – глюконовой кислоты от начальной концентрации субстрата ($m_{\text{биокатализатора}} = 0.11 \text{ гр}$, $T = 40^{\circ}\text{C}$, $pH = 6.0$, $t = 1 \text{ ч}$)

Для изучения влияния температуры на выход ГК (рисунок 7), эксперименты проводили в диапазоне 30-60 °С при pH 6.0 (значение pH является оптимальным для процесса окисления ГЛ в присутствии нативной GOx).

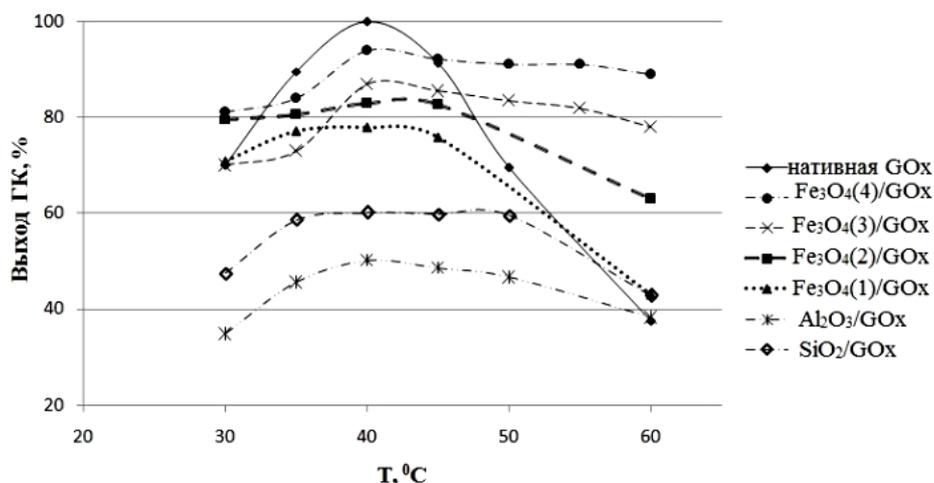


Рисунок 7 – Зависимость выхода D – глюконовой кислоты от температуры ($m_{\text{биокатализатора}} = 0.11 \text{ гр}$, $c_{\text{глюкозы}} = 0.37 \text{ моль/л}$, $pH = 6.0$, $t = 1 \text{ ч}$)

Анализ полученных данных показывает, что нативный фермент проявляет максимальную активность при температуре 40 °С, с последующим резким снижением выхода продукта. В случае иммобилизованной GOx на МНЧ, повышение температуры до 50 °С приводит к значительному увеличению выхода продукта (на 15-30%) по сравнению с нативным ферментом. При 60 °С нативный фермент теряет около 60% активности, а активность иммобилизованных биокатализаторов на основе МНЧ снижается всего на 5-10%, у биокатализаторов на основе SiO₂ и Al₂O₃ снижается на 15-20%.

Для изучения влияния pH на окисление D-глюкозы эксперименты проводились в диапазоне 4.0-8.0, т.к. фермент активен в данных пределах.

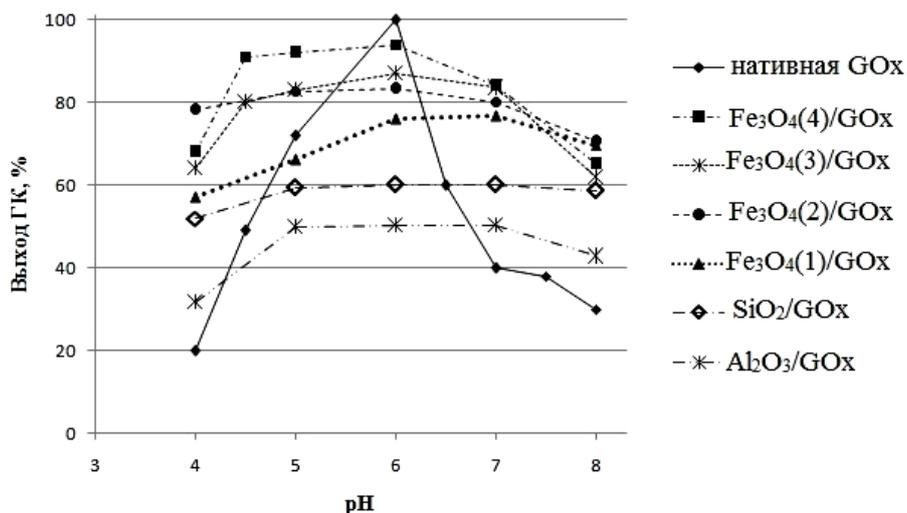


Рисунок 8 – Зависимость выхода D-глюконовой кислоты от pH
 ($m_{\text{биокатализатора}} = 0.11 \text{ г}$, $c_{\text{глюкозы}} = 0.37 \text{ моль/л}$, $T = 40^\circ \text{C}$, $t = 1 \text{ ч}$)

Из полученных данных (рисунок 8) видно, что выход ГК для нативной GOx показывает максимум (100%) при pH 6.0, тогда как при более высоких и низких значениях pH активность уменьшается («колоколообразная» зависимость). Для всех полученных биокатализаторов на основе иммобилизованной GOx, такой резкой зависимости не наблюдается и имеет место значительный выход ГК во всем диапазоне pH 4.0-8.0.

Для определения кинетических параметров проводились эксперименты с нативным и иммобилизованным ферментами, при разной концентрации ГЛ (3.8мМ, 19мМ, 38мМ, 190мМ, 380мМ). Полученные данные (таблица 1) показывают, что при окислении D- глюкозы нативным ферментом GOx константа Михаэлиса имеет самое низкое значение ($K_m = 95 \text{ мМ}$), а максимальная скорость реакции самое высокое значение ($V_{\text{max}} = 220 \text{ мМ/мин}$), по сравнению с иммобилизованным ферментом. Максимально близкими по значению кинетических параметров K_m (103 мМ) и V_{max} (194 мМ/мин), обладает биокатализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$. Менее эффективными оказались биокатализаторы на основе GOx, иммобилизованной на SiO_2 и Al_2O_3 .

Таблица 1 – Кинетические параметры реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты

Биокатализатор	K_m мМ	V_{max} мМ/мин	$V_{\text{max}}/K_m \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1}$
GOx	95	220	2,32
$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$	137	32	0,23
SiO_2/GOx	124	71	0,57
$\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$	117	146	1,25
$\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$	103	194	1,88

Для окисления ГЛ до ГК в водном растворе в присутствии биокатализаторов подобраны оптимальные условия, а именно: концентрация глюкозы – 0.37 моль/л, масса нативного фермента – 0.01г, масса биокатализатора- 0.11 г (с содержанием GOx 0.01 г), время реакции 60 мин, температура 40 °C, pH реакционного раствора 6.0.

Результаты сравнения эффективности полученных биокатализаторов по выходу ГК представлены в виде диаграммы (рисунок 9). Анализ данных для биокатализаторов на основе МНЧ, синтезированных различными методами показал, что наиболее эффективным носителем являются МНЧ, синтезированные полиольным способом, так в присутствии $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$, выход ГК которого составил 94%, $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx}$, – 87%, $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx}$, – 84% (в случае нативного фермента выход ГК составил 100%), тогда как для образца $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$ (МНЧ синтезированы методом соосаждения) выход ГК составил 79%. При использовании биокатализаторов на основе SiO_2 и Al_2O_3 выход ГК составил 60 и 50% соответственно, что значительно меньше по сравнению с GOx иммобилизованной МНЧ. Из полученных результатов следует, что активность биокатализаторов зависит не только от природы носителя, но и способа его получения.



Рисунок 9 – Сравнение активности биокатализаторов по содержанию ГК:
 1 – нативная GOx , 2 – $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$, 3 – $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx}$, 4 – $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx}$,
 5 – $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$, 6 – SiO_2/GOx , 7 – $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$,

Одной из наиболее важных характеристик является стабильность биокатализатора (реакционная стабильность), которая позволяет сохранить первоначальную активность в течение нескольких циклов работы. Для оценки стабильности синтезированных биокатализаторов были выполнены 10 последовательных экспериментов окисления ГЛ до ГК. Полученные данные показывают, что наиболее стабильным биокатализатором является GOx , иммобилизованная на $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$. После десяти каталитических циклов, в присутствии $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$ выход ГК уменьшается только на 7%, а в случае SiO_2/GOx и $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$, выход ГК снижается на 16% и 20% соответственно. Вероятнее, всего более высокая стабильность катализаторов на основе МНЧ обусловлена структурой поверхности носителя, которая предотвращает инактивацию фермента.

Корреляция структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления D-глюкозы показали, что в зависимости от условий синтеза образуются МНЧ разной структуры, разного размера и биокатализаторы на их основе обладают разной активностью. В таблице 2 представлены данные ПЭМ магнитных носителей и результаты тестирования биокатализаторов на их основе в окислении ГЛ до ГК.

Таблица 2 – Данные ПЭМ для магнитных носителей и результаты тестирования биокатализаторов на их основе в окислении ГЛ до ГК

Носитель /биокатализатор	Метод получения Fe ₃ O ₄	Размер частиц Fe ₃ O ₄ , нм	Выход ГК, %	Выход ГК, после 10-ти циклов, %
Fe ₃ O ₄ (1) /Fe ₃ O ₄ (1)/GOx	Соосаждения	50-200	79	71
Fe ₃ O ₄ (2) /Fe ₃ O ₄ (2)/GOx	Полиоольный*	111±5	84	75
Fe ₃ O ₄ (3) /Fe ₃ O ₄ (3)/GOx	Полиоольный**	430±60	87	80
Fe ₃ O ₄ (4) /Fe ₃ O ₄ (4)/GOx	Полиоольный***	285±71	94	84

* Объем этиленгликоля 30 мл и выдержка при 200 °С 2 часа

** Объем этиленгликоля 30 мл и выдержка при 200 °С 48 часов

*** Объем этиленгликоля 20 мл и выдержка при 200 °С 48 часов

Необходимо отметить, что по результатам низкотемпературной адсорбции азота, все магнитные носители имеют близкую удельную поверхность, порядка 50 м²/г, но катализаторы на основе МНЧ имеют разную активность, в зависимости от способа получения. Из представленных данных (таблица 2) видно, что наиболее активным является биокатализатор Fe₃O₄(4)/GOx, размер частиц носителя для которого составляет 285±71нм. При большем размере МНЧ (430±60 нм для Fe₃O₄(3)) и при меньшем их размере (111±5 нм для Fe₃O₄(2)), биокатализаторы обладают чуть меньшей активностью, что возможно связано с «неполным» распределением (конформационным расположением) молекулы GOx на их поверхности.

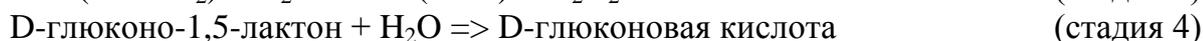
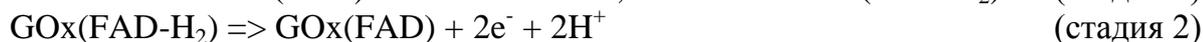
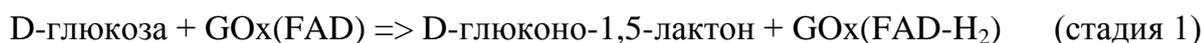
Для всех неорганических носителей (Fe₃O₄, Al₂O₃, SiO₂), методами ИК-Фурье спектроскопии и рентгенофотоэлектронной спектроскопии показано, что на их поверхности, модифицированной TEOS, APTES и сшивающим агентом GA, происходит ковалентное связывание GOx за счет образования пептидной связи. По анализу фильтрата после «пришивки» фермента было установлено, что максимальное количество GOx иммобилизуется на поверхности Fe₃O₄, более 85%, тогда как на поверхность диоксида кремния иммобилизуется 66% фермента, а в случае оксида алюминия – всего 60%. Возможно, это объясняется, тем, что поверхность частиц Fe₃O₄, модифицируется TEOS, в отличии от Al₂O₃ и SiO₂. В таблице 3 представлены данные анализа неорганических носителей методом низкотемпературной адсорбции азота и результаты тестирования биокатализаторов на их основе. По представленным данным видно, что удельная поверхность образцов Fe₃O₄ и Al₂O₃ невелика и практически одинаковая, в тоже время, поверхность SiO₂ больше практически на порядок. При этом размер пор для диоксида кремния составляет 3-5 нм, что меньше размера молекулы фермента (6,0нм x 5,2нм x 7,7нм) и вероятно, иммобилизация GOx происходит на поверхности, а не в порах носителя. Для остальных неорганических носителей размер пор больше молекулы GOx и можно предположить, что ковалентное связывание проходит как на поверхности, так и в порах носителя. Необходимо отметить, что активность биокатализаторов на основе GOx иммобилизованной Fe₃O₄ значительно выше, по сравнению с Al₂O₃ и SiO₂. Можно предположить, что это объясняется синергетическим эффектом GOx с оксидом

железа. В тоже время стабильность биокатализаторов, также выше у систем на основе Fe_3O_4 , вероятно, что в этом случае имеет место более сильное ковалентное связывание молекулы фермента на поверхности МНЧ.

Таблица 3 – Данные низкотемпературной адсорбции азота неорганических носителей и результаты тестирования биокатализаторов на их основе

Носитель /биокатализатор	Удельная поверхность, $\text{м}^2/\text{г}$	Средний размер пор, нм	Выход ГК, %	Выход ГК, после 10-ти циклов, %
$\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ / $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$	57	6-15	79	71
$\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ / $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$	46	15-26	94	84
$\text{Al}_2\text{O}_3/$ $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$	54	5-14	50	30
$\text{SiO}_2/$ SiO_2/ GOx	500	3-5	60	44

Схематическое представление процесса окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты можно представить в виде следующих стадий:



Окисление ГЛ до ГК проходит в присутствии фермента глюкозооксидаза, который содержит в качестве кофактора флавинадениндинуклеотид (ФАД), компонент окислительно-восстановительной реакции. В процессе реакции происходит изменение кофактора $\text{FAD} \Rightarrow \text{FAD-H}_2 \Rightarrow \text{FAD}$, которое сопровождается передачей электронов и ионов водорода. Можно предположить, что присутствие магнито-отделяемого носителя Fe_3O_4 (в составе которого есть ион-окислитель Fe^{+3}) способствует протеканию стадии 2, в отличие от носителей Al_2O_3 и SiO_2 . Это предположение также может объяснить более высокую активность магнитоотделяемых биокатализаторов по сравнению с биокатализаторами на других неорганических носителях.

Таким образом, представленные данные показывают, что в зависимости от природы неорганического носителя, синтезированные биокатализаторы проявляют различную каталитическую активность в реакции окисления ГЛ до ГК.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Синтезированы биокатализаторы (в том числе магнитоотделяемые) на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические носители.
2. Подобраны условия синтеза магнитных наночастиц Fe_3O_4 . Оптимальный метод синтеза МНЧ – полиольный. Основные условия синтеза: 20 мл этиленгликоля, 3 ммоль $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 ммоль янтарной кислоты, 30 ммоль мочевины. Выдержка при 200°C в течении 48-х часов. Полученные полиольным способом наночастицы

обладают достаточно высокой намагниченностью и образуют монодисперсные частицы со средним диаметром 285 ± 71 нм.

3. Предложена схема создания модифицированных МНЧ «ядро-оболочка». На первой стадии с помощью TEOS формируют $\text{Si}(\text{OH})_4$ оболочку, а на второй стадии с помощью APTES образованная $\text{Si}(\text{OH})_4$ оболочка модифицируется с NH_2 -группами. Для неорганических носителей Al_2O_3 , SiO_2 для модификации поверхности использовался APTES. Для ковалентного связывания фермента с неорганическими носителями использовался глутаровый альдегид.
4. По результатам просвечивающей электронной микроскопии биокатализаторов, иммобилизованных на Fe_3O_4 , показано, что агрегированные частицы состоят из отдельных наночастиц диаметром $\sim 42\text{-}45$ нм. Из анализа кривых намагничивания биокатализаторов, иммобилизованных на основе Fe_3O_4 , доказано, что исследованные образцы обладают высокой намагниченностью.
5. Методами ИК-Фурье спектроскопии, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и РФЭС показано, что в процессе иммобилизации GOx на неорганические носители происходит закрепление фермента с образованием прочных ковалентных связей между молекулой фермента и модифицированной поверхностью носителя.
6. По данным, полученным методом низкотемпературной адсорбции азота, можно сделать вывод о том, что все синтезированные биокатализаторы имеют мезопористую структуру. Биокатализаторы на Fe_3O_4 , синтезированные полиольным способом, обладают мезопорами, размер которых близок к размеру молекулы GOx, что способствует закреплению фермента именно в мезопорах носителя.
7. Определены оптимальные условия процесса окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии биокатализаторов: $C_{\text{ГЛ}} - 0.37$ моль/л, $m_{\text{биокатализатора}} - 0.11$ г, $t_{\text{реакции}} - 60$ мин, $T - 40$ °C, pH 6.0.
8. Получены данные по активности биокатализаторов в процессе окисления ГЛ до ГК. Выход ГК с использованием биокатализаторов составил: $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx} - 79\%$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx} - 84\%$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx} - 87\%$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx} - 94\%$, $\text{SiO}_2/\text{GOx} - 60\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx} - 50\%$.
9. Изучена стабильность биокатализаторов в процессе окисления ГЛ до ГК. В десяти последовательных циклах магнитоотделяемый биокатализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$ теряет только 7% своей активности, тогда как биокатализатор на основе GOx, иммобилизованной на SiO_2 , теряет 16%, а на $\text{Al}_2\text{O}_3 - 20\%$ активности.
10. Получены кинетические параметры реакции окисления D-глюкозы. Для GOx $K_m = 95$ мМ, $V_{\text{max}} = 220$ мМ/мин, что объясняется высокой активностью фермента. Показано, что наиболее близким к нативному ферменту является биокатализатор на Fe_3O_4 , полученный полиольным способом, для которого кинетические параметры составили: $K_m = 103$ мМ, $V_{\text{max}} = 194$ мМ/мин.
11. Выявлены корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Показано, что в зависимости от природы, структуры, поверхности, размера частиц неорганического носителя синтезированные биокатализаторы проявляют различную каталитическую активность в реакции окисления ГЛ до ГК.

Публикации автора по теме диссертации

А. работы, включенные в международные реферативные базу данных Scopus и Web of Science

1. **Golikova E.P.**, Lakina N.V., Grebennikova O.V., Matveeva V.G., Sulman E.M. A study of biocatalysts based on Glucose Oxidase // Faraday Discussions (2017). Vol. 202, pp. 303-314.
2. Jaquish R., Reilly A.K., Lawson B.P., **Golikova E.P.**, Sulman A.M., Stein B.D., Lakina N.V., Tkachenko O.P., Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M. Immobilized glucose oxidase on magnetic silica and alumina: Beyond magnetic separation // International Journal of Biological Macromolecules (2018). Vol. 120, pp. 896-905.
3. Lawson B.P., **Golikova E.P.**, Sulman A.M., Stein B.D., Morgan D.G., Lakina N.V., Karpenkov A.Yu., Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M. Insights into Sustainable Glucose Oxidation Using Magnetically Recoverable Biocatalysts // ACS Sustainable Chem. Eng. (2018). Vol. 6, pp. 9845-9853.
4. Matveeva V., **Golikova E.**, Lakina N., Bykov A., Sulman M. Effective glucose oxidation with magnetically recoverable biocatalysts // 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConferences SGEM 2018 (Albena, Bulgaria, 2-8 July 2018). pp. 163-170.
5. Matveeva V., **Golikova E.**, Lakina N., Sulman A., Sidorov A., Doluda V., Karpenkov A., Sulman E. Magnetically separable biocatalyst of D-glucose oxidation // AIP Conference Proceedings (2018). Vol. 2022, pp. 020008-1-020008-7.

Б. Работы, опубликованные в научных журналах из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ

6. **Голикова Е.П.**, Лакина Н.В., Шкилева И.П., Матвеева В.Г. Исследование биокаталитического способа получения глюконовой кислоты // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация (2017). № 3, С. 40-46.

В. Прочие публикации

7. **Голикова Е.П.**, Лакина Н.В., Матвеева В.Г., Сидоров А.И. Изучение методов получения и применения иммобилизованной глюкооксидазы // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия (2017). № 3, С. 107-111.
8. Тихонов Б.Б., Сульман Э.М., Стадольникова П.Ю., Сульман А.М., **Голикова Е.П.**, Сидоров А.И., Матвеева В.Г. Иммобилизованные ферменты класса оксидоредуктаз в технологических процессах: обзор // Катализ в промышленности (2019). Том 19, № 1, С. 59-72.
9. Sulman E.M., **Golikova E.P.**, Lakina N.V., Sidorov A.I., Sulman A.M., Matveeva V.G. Magnetically separable biocatalyst on the basis of glucose oxidase // [Электронный ресурс]: www.europacat2017.eu (Florence, Italy, 27-31 August 2017). Poster Session 1, 2 pp.
10. Матвеева В.Г., Лакина Н.В., **Голикова Е.П.**, Гребенникова О.В., Сульман А.М., Сульман Э.М. Иммобилизованные ферменты в процессах тонкого органического синтеза // Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической и нефтехимической промышленности (VIII Международная

- конференция Российского химического общества имени Д.И. Менделеева: тезисы докладов). 2017, С. 51-52.
11. Sulman A.M., Matveeva V.G., **Golikova E.P.**, Grebennikova O.V., Lakina N.V., Doluda V.Yu., Sulman E.M. Oxidoreductase immobilization on magnetic nanoparticles // 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2018 and 21st Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction PRES 2018 // [Электронный ресурс]: secure.confis.cz/chisa2018/UserPages/cd/Abstracts/Abstract132.html (Prague, Czech Republic, 25-29 August 2018). F 2.3, 2 pp.
 12. Matveeva V., **Golikova E.**, Lakina N., Sulman A., Sidorov A., Doluda V., Karpenkov A., Sulman E. Magnetically separable biocatalyst of D-glucose oxidation // Environment, Chemical Engineering & Materials: program and book of abstracts of the 2nd International Conference ECEM'18 (Sliema, Malta, 22-24 June 2018). P. 16.
 13. **Голикова Е.П.**, Лакина Н.В., Матвеева В.Г. Магниторазделяемый биокатализатор на основе глюкооксидазы для эффективного окисления D-глюкозы // Материалы в сборнике международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 23-25 мая 2018 г.). С. 269-270.
 14. Matveeva V., Grebennikova O., Lakina N., **Golikova E.**, Sulman A., Tikhonov B., Sulman E. Magnetically separable biocatalysts for oxidation reactions // The 4th International Symposium on Chemistry for Energy Conversion and Storage ChemEner²⁰¹⁸: scientific program and book of abstracts (Berlin, Germany, 28-31 January 2018). P. 73.
 15. Сульман А.М., Матвеева В.Г., **Голикова Е.П.**, Гребенникова О.В., Лакина Н.В., Сульман М.Г. Магнитоотделяемые биокатализаторы для процессов окисления // Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: тезисы докладов IX международной конференции Российского химического общества им. Д.И. Менделеева (Москва, 31 октября 2018 г.). С. 156-157.
 16. Сульман А.М., Матвеева В.Г., **Голикова Е.П.**, Гребенникова О.В., Лакина Н.В., Сульман М.Г. Магнитоотделяемые биокатализаторы для процессов окисления // XII Конкурс проектов молодых ученых: тезисы докладов (Москва, 31 октября 2018 г.). С. 58-59.
 17. Sulman A., Matveeva V., Lakina N., **Golikova E.**, Sulman M., Tikhonov B., Sidorov A., Sulman E. Magnetically separable biocatalysts based on immobilized enzymes // CHEMREACTOR-23: proceedings of XXIII International Conference on Chemical Reactors (Ghent, Belgium, 5-9 November 2018). OP-III-13, pp. 173-174.