

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тверской государственный технический университет»**

На правах рукописи

Матвеева Ольга Валентиновна

**Магнитоотделяемый катализатор
окисления 2,3,6-триметилфенола на
основе иммобилизованной пероксидазы**

Специальность 02.00.15 – *Кинетика и катализ*

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

**Научный руководитель - доктор
химических наук, профессор Сульман Э.М.**

Москва – 2015

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

ТМФ – 2,3,6-триметилфенол

ТМГХ – 2,3,5-триметилгидрохинон

ТМБХ – 2,3,5-триметилбензохинон

АПТС – 3-аминопропилтритоксисилан

ППС – полистиролсульфонат натрия

HRP - *Horseradish peroxidase* (КФ 1.11.1.7, пероксидаза корня хрена)

РФЭС - рентгенофотоэлектронная спектроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Методы получения 2,3,5-триметилгидрохинона	11
1.2 Характеристика пероксидазы корня хрена (КФ 1.11.1.7)	19
1.2.1 Строение пероксидазы	19
1.2.2 Механизм действия пероксидазы	22
1.3 Способы иммобилизации пероксидазы	23
1.4 Нанокатализ и магнитный нанокатализ	35
1.4.1 Способы синтеза магнитных наночастиц	36
1.4.1.1 Получение магнитных наночастиц методом соосаждения	37
1.4.1.2 Полиольный метод получения магнитных наночастиц	38
1.4.1.3 Гидротермальный метод получения магнитных наночастиц	39
1.4.1.4 Золь-гель метод получения магнитных наночастиц	40
1.4.2 Методы стабилизации магнитных наночастиц	41
1.4.2.1 Стабилизация магнитных наночастиц с использованием мономерных соединений	41
1.4.2.2 Использование неорганических материалов для стабилизации магнитных наночастиц	43
1.4.2.3 Использование полимерных материалов для стабилизации магнитных наночастиц	44
1.5 Иммобилизация пероксидазы на магнитные наночастицы	45
2 МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ	49
2.1 Используемые реактивы	49
2.2 Методика приготовления биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на SiO_2 , Al_2O_3	51
2.3 Методика приготовления биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на магнитные наночастицы	53

2.3.1	Методика синтеза магнитных наночастиц	53
2.3.1.1	Метод соосаждения	53
2.3.1.2	Полиольный метод	54
2.3.2	Модификация поверхности магнитных наночастиц	55
2.3.3	Иммобилизация пероксидазы на магнитные наночастицы	56
2.4	Методика проведения процесса окисления 2,3,6-триметилфенола	57
2.5	Методика анализа реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	58
2.6	Методика расчета кинетических и термодинамических параметров	59
2.7	Физико-химические методы исследования образцов биокатализаторов	61
2.7.1	Просвечивающая электронная микроскопия образцов биокатализаторов	61
2.7.2	Методика измерения намагниченности	61
2.7.3	Исследование образцов биокатализаторов методом инфракрасная спектроскопия	62
2.7.4	Рентгенофотоэлектронная спектроскопия образцов биокатализаторов	63
2.7.5	Методика определения удельной поверхности и пористости методом низкотемпературной адсорбции азота	64
2.7.6	Исследование образцов биокатализаторов методом хемосорбции водорода	65
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1	Синтез и характеристики биокатализаторов на основе Fe_3O_4 , SiO_2 и Al_2O_3	67
3.1.1	Получение и выбор эффективного носителя на основе Fe_3O_4 . Результаты просвечивающей электронной микроскопии и	

магнитные характеристики образцов биокатализаторов на основе Fe_3O_4	67
3.1.2 Синтез биокатализаторов на основе Fe_3O_4 , SiO_2 и Al_2O_3 и установление их структуры	72
3.1.2.1 ИК-Фурье спектроскопия и подбор оптимального состава для биокатализаторов на основе SiO_2 , Al_2O_3	72
3.1.2.2 ИК-Фурье спектроскопия и подбор оптимального состава для биокатализатора на основе Fe_3O_4	88
3.1.2.3 Результат анализа образца биокатализатора на основе Fe_3O_4 методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии	92
3.1.2.4 Характеристика поверхности образца биокатализатора на основе Fe_3O_4 методом низкотемпературной адсорбции азота	96
3.1.2.5 Результат анализа образца биокатализатора на основе Fe_3O_4 методом хемосорбции водорода	99
3.1.2.6 Определение области протекания процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии иммобилизованной пероксидазы	100
3.2 Тестирование полученных биокатализаторов и подбор оптимальных условий проведения процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии биокатализаторов на основе пероксидазы	102
3.2.1 Определение оптимальной концентрации 2,3,6-триметилфенола	103
3.2.2 Подбор оптимальной температуры	104
3.2.3 Подбор оптимального значения pH	106
3.2.4 Определение стабильности биокатализаторов	107
3.2.5 Влияние времени реакции окисления 2,3,6-триметилфенола	108
3.2.6 Исследование влияния типа растворителя на каталитическую активность пероксидазы	109

3.2.7 Определение кинетических параметров синтезированных биокатализаторов	111
3.3 Гипотеза о механизме протекания процесса окисления 2,3,6-триметилфенола	114
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	116
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время одной из актуальных задач тонкого органического синтеза является разработка эффективных процессов получения биологически активных веществ. Синтезы многих биологически активных соединений являются многостадийными и малоэффективными процессами, в которых большинство стадий достаточно времязатратны, а для получения целевых продуктов требуется дополнительная очистка. Так, например, существующие схемы синтеза 2,3,5-триметилгидрохинона (полупродукта витамина Е) характеризуются применением агрессивных окислителей (перманганата калия, сульфата марганца, двуокиси марганца, азотной кислоты, гипохлорида натрия и др.), что приводит к формированию большого количества побочных веществ и низкому выходу целевого продукта. В последние годы все чаще в процессах окисления фенольных соединений в качестве катализатора применяется пероксидаза, в присутствии которой окисление протекает в мягких условиях с высоким выходом продукта и хорошей селективностью. Имобилизация ферментов позволяет добиться их стабильности, увеличивая тем самым срок службы, и уменьшив затраты на технологическое применение. Перспективным направлением в катализе является имобилизация ферментов на магнитных наночастицах, имеющих такие преимущества, как большая площадь поверхности и простота отделения от реакционной смеси. В связи с вышеизложенным разработка эффективных, селективных магнитоотделяемых биокаталитических систем, применяемых для окисления 2,3,6-триметилфенола является актуальной.

Цель и задачи исследования. Целью работы является разработка магнитоотделяемого катализатора на основе иммобилизованной пероксидазы для селективного окисления ТМФ. Для достижения этой цели были решены следующие задачи:

- Теоретическое исследование методов синтеза 2,3,5-триметилгидрохинона.
- Рассмотрение существующих методов иммобилизации ферментов.
- Разработка метода синтеза магнитных наночастиц.
- Определение оптимального состава биокаталитической системы на основе пероксидазы для процесса окисления 2,3,6-триметилфенола.
- Определение оптимальных условий проведения этого процесса в присутствии биокатализатора и пероксида водорода в качестве окислителя.
- Исследование кинетики процесса окисления 2,3,6-триметилфенола.
- Изучение физико-химических свойств биокаталитических систем.

Научная новизна и практическая значимость работы. Разработан магнитоотделяемый катализатор на основе пероксидазы, эффективно работающий в процессе селективного окисления ТМФ. Впервые проведено окисление ТМФ пероксидом водорода в присутствии фермента. Показана специфичность действия оксидоредуктаз по отношению к пероксиду водорода, что обуславливает его применение как экологически чистого и дешевого окислителя для фенолзамещенных соединений. Проведен ряд кинетических и физико-химических исследований для определения оптимального состава биокатализатора. Подобраны оптимальные условия проведения процесса окисления ТМФ.

Личный вклад автора. Автором непосредственно синтезированы катализаторы на основе пероксидазы, иммобилизованной на неорганические носители SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_3O_4 . Получены магнитные наночастицы методом соосаждения и полиольным методом. Проведены эксперименты по определению оптимального состава биокатализаторов и по подбору оптимальных условий процесса селективного окисления ТМФ. Кроме того, автор принимал участие в проведение физико-химических исследований каталитических систем: ПЭМ, изучение намагниченности магнитных

наночастиц, ИК-Фурье спектроскопия, изучение площади поверхности и пористости биокатализаторов, РФЭС, хемосорбция водорода.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на следующих конференциях и конгрессах: XVII Региональные Каргинские чтения. Областная научно-техническая конференция молодых ученых "Физика, химия и новые технологии" (Тверь, 2010); XV Международная молодежная научная конференция «Ломоносов» (Москва, 2010); Российский конгресс по катализу «РОСКАТАЛИЗ» (Москва, 2011); Международная научно-техническая конференция «Наукоемкие химические технологии-2012» (Тула-Ясная Поляна-Куликово Поле, 2012); 15-ый Международный конгресс по катализу (Германия, Мюнхен, 2012); Межрегиональная научно-техническая конференция «Интеграция науки и образования – производству, экономике» (Тверь, 2012); 9-ый Европейский конгресс по химической инженерии и 2-й Европейский конгресс по прикладной биотехнологии (Гаага, Нидерланды, 2013); 9-ая Международная конференция "Биокатализ. Фундаментальные основы и применения" (Москва, 2013); 21-ая Международная конференция по композитам/наноинженерии (Тенерифе, Испания, 2013); 16-й Международный симпозиум по связи между гомогенным и гетерогенным катализом (Саппоро, Япония, 2013); 11-ый Европейский конгресс по катализу (Лион, Франция, 2013); 22-ая Международная конференция по композитам/наноинженерии (Мальта, 2014); 15-ая Международная научно-техническая конференция "Наукоемкие химические технологии - 2014" (Звенигород, 2014); 21-й Международный конгресс по химии и химической технологии и 17-й конференция по процессам интеграции, моделирования и оптимизации энергосбережения и уменьшения загрязнения (Чехия, Прага, 2014); 6-ая Международная конференция Российского химического общества имени Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов» (Москва, 2014).

Работа выполнена в рамках проекта госзадания Тверского государственного технического университета № 129 (базовая часть) «Разработка высокоэффективных многокомпонентных нано- и биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов и наночастиц металлов»; проекта госзадания Тверского государственного технического университета № 1789 «Создание новых микрореакторных каталитических технологий органического синтеза».

Публикации. По результатам исследований опубликовано 24 печатные работы, в том числе 7 статей в изданиях центральной печати, рекомендованных ВАК и международных журналах.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Методы получения 2,3,5-триметилгидрохинона

Известно, что хиноны обладают выраженной биологической активностью и играют важную роль в медицине [1]. Так, например важным промежуточным продуктом в синтезе витамина Е является ТМГХ.

В промышленности существует несколько схем синтеза ТМГХ. Одним из традиционных методов получения полупродукта витамина Е является его синтез из псевдокумола, который в свою очередь является продуктом перегонки каменного угля. В процессе получения ТМГХ псевдокумол сульфатируют, нитруют, десульфатируют, восстанавливают, окисляют до псевдокумохинона, восстанавливают до гидрохинона (рисунок 1.1).

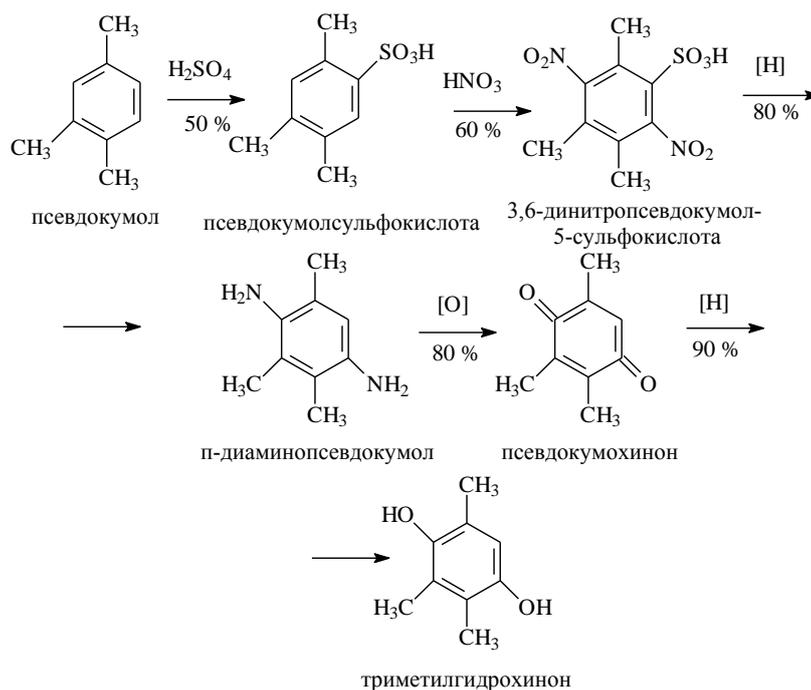


Рисунок 1.1 – Схема синтеза ТМГХ из псевдокумола

Недостатками такой технологии получения ТМГХ является многостадийность, взрывоопасность и трудоемкость процесса. На производство затрачивается большое количество времени. Выход готового продукта составляет 40 %.

За рубежом в промышленность внедрен метод получения ТМГХ, основанный на применении диэтилкетона и кротонового альдегида или же метилвинилкетона через триметилциклогексанон (рисунок 1.2). Выход готового продукта составляет 90 %. Недостатком этого способа является высокая стоимость исходного продукта – диэтилкетона. На рынке данное вещество присутствует в ограниченном количестве.

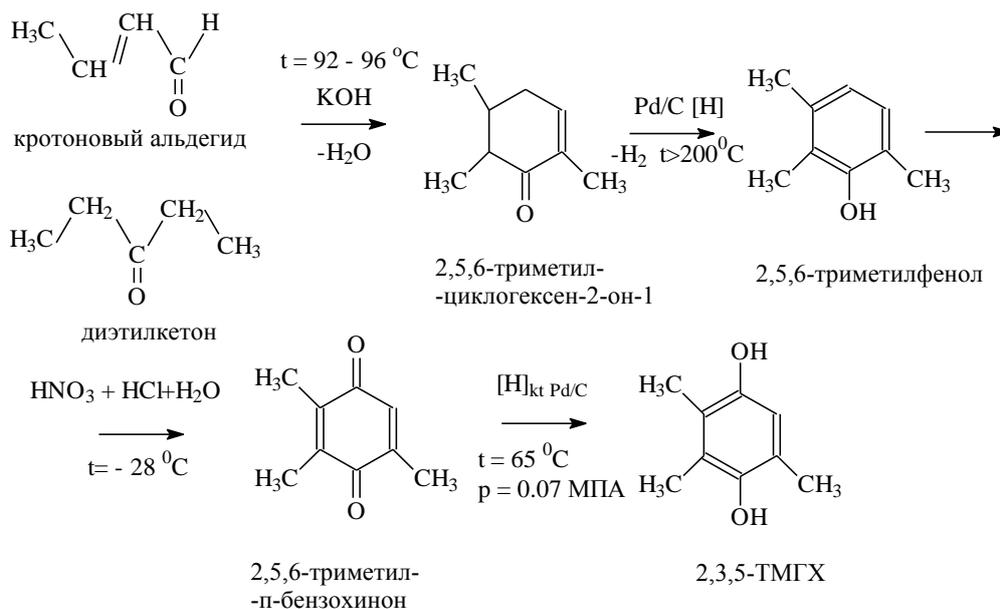


Рисунок 1.2 – Схема синтеза ТМГХ из диэтилкетона и кротонового альдегида

В настоящее время ведутся разработки каталитических схем синтеза ТМГХ путем окисления 2,3,5-триметилфенола или 2,3,6-триметилфенола до промежуточного продукта ТМБХ, который затем восстанавливают до ТМГХ. Одним из таких каталитических способов получения ТМБХ является окисление ТМФ в присутствии шпинели CuCo_2O_4 , как катализатора (рисунок 1.3), который получали золь-гель методом, используя неорганические соли.

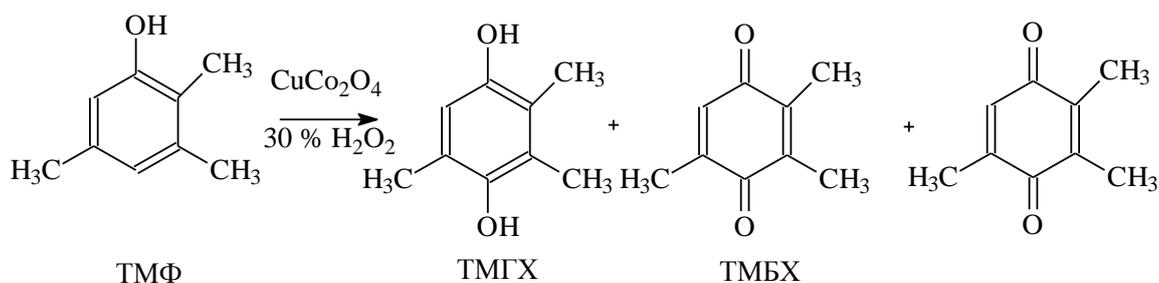


Рисунок 1.3 – Схема окисления ТМФ в присутствии CuCo_2O_4

Для приготовления катализатора использовали водные растворы $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ и лимонной кислоты, смешивая в молярном отношении лимонная кислота: $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 = 3: 2: 1$. Каталитическую реакцию окисления ТМФ проводили в 100 мл трехгорлой колбе, снабженной обратным холодильником, магнитной мешалкой, масляной баней и термометром. Для проведения процесса окисления ТМФ (1 ммоль) и CuCo_2O_4 помещали в реактор, а затем 30% H_2O_2 (10 ммоль), добавляли к смеси и быстро перемешивали при комнатной температуре (25°C). В качестве оптимального растворителя применялся этанол. Реакция проводилась в течении 6 часов при 25°C . Конверсия ТМФ составляла 100 %, селективность процесса 80 %. Стабильность катализатора составляет 5 рабочих циклов. После окончания каждого цикла, катализатор отфильтровывали, промывали этанолом и сушили при 120°C на воздухе в течение 2 часов. Затем реакцию проводили на активированном катализаторе при комнатной температуре (25°C) при оптимальных условиях [2].

Большое внимание окислению ТМФ в присутствии мезопористых титан-силикатов различной природы с целью получения ТМГХ (рисунок 1.4) было уделено авторами [3-5].

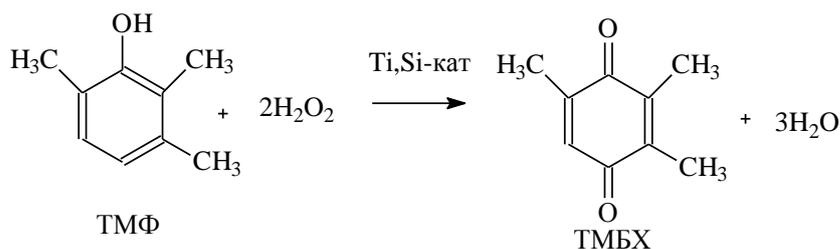


Рисунок 1.4 – Окисление ТМФ в присутствии Ti,Si-катализаторов

В 2000 году они запатентовали способ окисления ТМФ до ТМБХ, основанный на использовании водного раствора H_2O_2 в качестве окислителя и мезоструктурированного титансиликатного катализатора Ti-МММ [6,7]. Выход ТМБХ составил 80 %. Подобные результаты были достигнуты в жидкофазном окислении ТМФ с применением катализатора, полученного путем закрепления металлофталоцианинов железа, марганца и кобальта на поверхности мезопористого и аморфного кремнеземов в присутствии пероксида водорода и трет-бутилгидропероксида [8,9]. Селективность в таком процессе окисления ТМФ достигала 77 %, максимальная конверсия 96 %, выход 80 %. Реакция окисления проводилась 2 ч при температуре 30 °С. Для определения стабильности катализатор повторно использовали 3 раза. При использовании катализатора на третий раз выход ТМБХ упал до 51 %.

Позже было показано [10,11], что при использовании аморфных смешанных оксидов $TiO_2 - SiO_2$ (аэрогели) выход ТМГХ может достигать 95-98%. Основным недостатком таких катализаторов является потеря их активности при повторном использовании, сопровождающемся вымыванием активного металла [12]. Позднее авторами [13] были подобраны оптимальные условия для процесса окисления ТМФ пероксидом водорода в присутствии титан- силикатных (Ti/SiO_2) катализаторов, получаемые путем «прививки» дихлорида титаноцена на поверхность различных силикагелей, «пришивая» таким образом титан к поверхности мезопористого силикатного носителя. Все катализаторы перед использованием прокаливались при 560 °С в течение 5 ч на воздухе. Каталитическое окисление ТМФ с H_2O_2 проводилось при интенсивном перемешивании (500 оборотов в минуту) в термостатированных стеклянных сосудах. Скорость перемешивания изменялась в диапазоне 200-1000 оборотов в минуту, с целью исключения внешнего диффузионного торможения. Оптимальными условиями для данного процесса являлись следующие: концентрация ТМФ 0.1 М;

растворитель ацетонитрил 1 мл; H_2O_2 0.35 М; катализатор 8-28 мг; температура 80 °С, время реакции 20-30 мин.

Авторы [13] пришли к выводу, что для успешного окисления ТМФ необходимо соблюдать следующие условия: (1) сорбции ТМФ на Ti центры способствует использование плохо координированного растворителя (ацетонитрила); (2) высокая температура проведения процесса (80 °С); (3) низкая концентрация ТМФ (не выше 0.1 м); (4) высокое молярное соотношение $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMP}$ (около 3.5) и (5) низкое соотношение ТМФ/Ti (< 10-20). Оптимальный Ti,Si- катализатор должен обладать мезопористостью (без микропор) и высокой дисперсностью Ti (без агрегатов TiO_2), чтобы обеспечить доступность к активным центрам. Для лучшей сорбции ТМФ и H_2O_2 поверхность катализатора должна быть достаточно гидрофильна. Катализатор должен обладать кислотными центрами Бренстедовского типа, (без ионов щелочных металлов), чтобы способствовать формированию активных форм гидропероксидной группы титана. Катализатор должен иметь оптимальную поверхностную концентрацию Ti (0.7-1.0 Ti/нм²) для формирования Ti "двойных" или, возможно, небольших олигомерных (кластерных) сайтов, которые появляются, чтобы сыграть ключевую роль в высоко селективном окислении ТМФ до ТМБХ. «Двойные» сайты являются идеальными каталитическими центрами для достижения быстрого последовательного "двойного" моноэлектронного трансфера из ТМФ и, таким образом, блокируют маршрут, ведущий к образованию феноксильной радикальной связи. При использовании оптимального катализатора при оптимальных условиях реакции выход ТМБХ может достичь 100% .

В своем недавнем исследовании авторы [14] описывают селективные катализаторы с ди(олиго)ядерными Ti центрами в окислении ТМФ. В присутствии таких катализаторов была достигнута 100 % селективность при 95 % конверсии ТМФ. При этом Ti не вымывался с поверхности катализатора. Окисление проводили при следующих условиях: концентрация

ТМФ 0.1 М, температура 80 °С, концентрация H₂O₂ 0.35 М, в качестве растворителя использовали ацетонитрил.

Авторы [15] исследовали окисление ТМФ до ТМБХ пероксомоносульфатом калия, KHSO₅, катализируемое либо фталоцианиновым тетрасульфонатом железа, [FePcTS] или фталоцианиновым тетрасульфонатом кобальта, [CoPcTS] в смеси метанол-вода. Предложенный механизм для такого окисления представлен на рисунке 1.5. Сначала водород отщепляется от ТМФ с помощью [Fe^{IV}(O)PcTS] с образованием 2,3,6-триметилфеноксильного радикала. Этот радикал подвергается воздействию [Fe^{IV}(O)PcTS] в пара положении, что приводит к образованию промежуточного продукта.

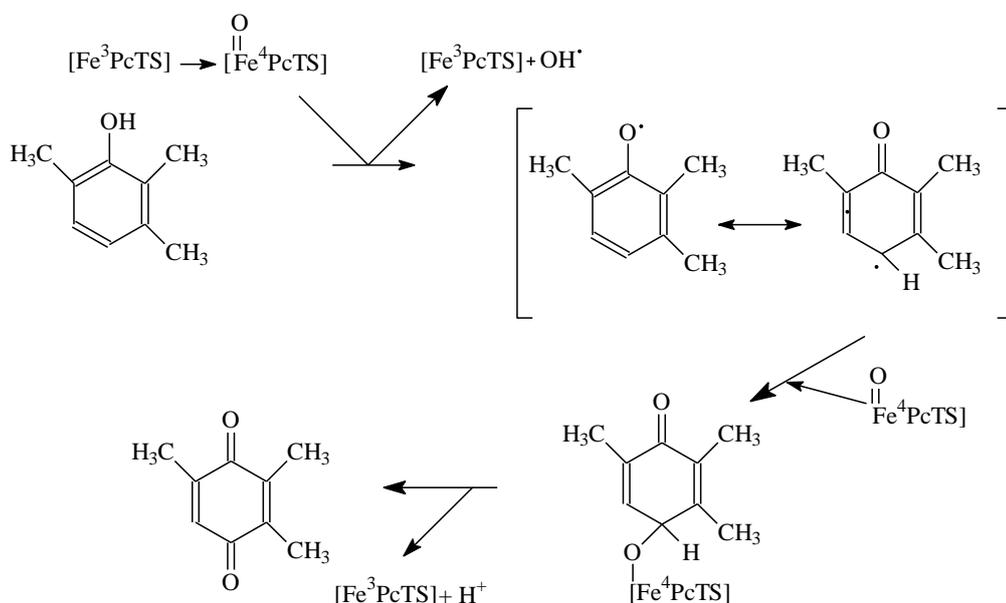


Рисунок 1.5 – Механизм окисления ТМФ с KHSO₅, катализируемой [Fe^{IV}(O)PcTS]

В процессе окисления ТМФ (0.075 М) до ТМБХ с пероксомоносульфатом калия, KHSO₅, катализируемое либо фталоцианиновым тетрасульфонатом железа, [FePcTS] или фталоцианиновым тетрасульфонатом кобальта, [CoPcTS] в смеси метанол-вода 8:1 степень конверсии ТМФ составляла 43.2 – 100.0 % и селективность ТМБХ 60.5 – 100.0 % после 5 мин при комнатной температуре, когда

молярное соотношение окислитель/субстрат было изменено от 1 до 4 при постоянном молярном соотношении субстрат/катализатор. Самая большая конверсия и селективность ТМФ наблюдались, когда время реакции было продлено до 30 мин. Побочный продукт, 2,2',3,3',5,5'-гексаметил-4,4'-бифенол, образовывался в реакции, проводимой с молярным соотношением окислитель/субстрат 3 или ниже. Когда в качестве катализатора вместо [FePcTS] был использован [CoPcTS], скорость реакции окисления ТМФ была медленнее и состав продуктов был примерно такой же, как и в реакции катализируемой [FePcTS].

Авторы [16] исследовали селективное окисление ТМФ в ионных жидкостях (рисунок 1.6). В качестве растворителя авторами был выбран тетрафторборат 1-бутил-3-метилимидазолия ([Bmim]BF₄). Было обнаружено, что CuCl₂·2H₂O и ТМФ может легко смешиваться с реакционной средой такого рода при нагревания, образуя коричневый гомогенный раствор. Окисление осуществлялось в течение 2 ч. Максимальная селективность 88.6 % со 100 % конверсией наблюдалась температуре 60 °С.



Рисунок 1.6 – Окисление ТМФ в присутствии [Bmim]BF₄

Подобное же окисление ТМФ до ТМБХ в ионной жидкости описывают исследователи [17]. Процесс проводят с молекулярным кислородом в качестве окислителя и хлоридом меди (II), в качестве катализатора в среде ионного раствора 1-бутил-3-метилимидозолия хлорида ([Bmim]Cl). Реакцию (рисунок 1.7) проводили в автоклаве, в который загружали раствор хлорида меди, в среде ионной жидкости и n-бутанола. В ходе эксперимента в автоклаве создавали давление кислородом (10 бар), нагревали до 60 °С и

выдерживали реакционную смесь в течении 5 часов. В качестве соразтворителя использовали n-бутанол, который положительно влиял на селективность. В данном исследовании обнаружено, что количество катализатора хлорида меди может быть существенно снижено в ионной жидкости без существенного снижения выхода ТМБХ. С количеством CuCl_2 2.5 % выход ТМБХ составлял 86 %. При увеличении количества ионной жидкости конверсия и селективность также уменьшались. Оксотетракупрат 1-n-бутил-3-метилимидозолюма $[\text{Cu}_4(\mu^4\text{-O})\text{Cl}_{10}]^{4-}$ был выделен как активный центр (рисунок 1.8). Четыре иона меди (II) составляют четырехгранник, который в центре имеет атом кислорода. Кроме того есть шесть соединенных и четыре, находящихся на конце атомов хлора. Четыре беспорядочно расположенных катиона 1-n-бутил-3-метилимидозолюма дополняют ассиметрическую структуру четырехгранника, как противоионы.

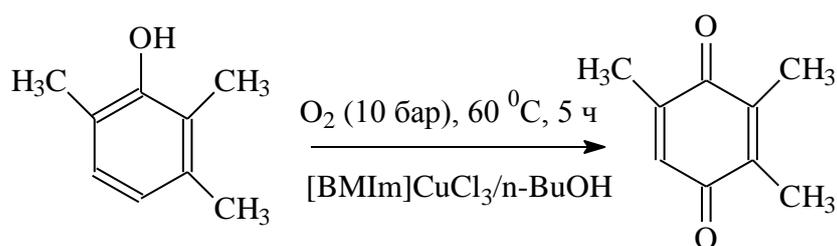


Рисунок 1.7 – Окисление ТМФ молекулярный кислородом в ионной жидкости

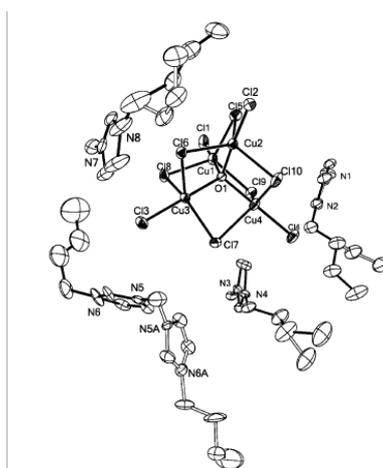


Рисунок 1.8 – Вид оксотетракупрата

С использованием ионных жидкостей в процессах окисления ТМФ достигаются высокие выходы, однако возникает проблема отделения целевого продукта от реакционной смеси.

Таким образом, применение различных неорганических катализаторов в процессах окисления ТМФ не дает достаточно эффективных результатов.

1.2 Характеристика пероксидазы корня хрена (КФ 1.11.1.7)

1.2.1 Строение пероксидазы

В последние годы все чаще в процессах окисления фенольных соединений применяется пероксидаза, в присутствии которой окисление протекает в мягких условиях с большим выходом и селективностью. Пероксидаза корня хрена – *Horseradish peroxidase* (HRP) является одним из наиболее изученных ферментов класса оксидоредуктаз. Большой интерес к этому ферменту связан с его доступностью. HRP легко экстрагировать и очищать [18-21]. Фермент характеризуется изоэлектрической точкой pI 9.0 и проявляет наибольшую активность при pH 6.0 – 8.0. Молекула HRP имеет диаметр 50 Å с молекулярной массой около 44 000 Да. Основную массу фермента составляет полипептидная цепь 33 890 Да, остальной молекулярный вес приходится на простетическую группу гем 572 Да, два иона кальция 80 Да и некоторые поверхностно связанные углеводные молекулы [18,22] (Рисунок 9). Полипептидная цепь HRP состоит из 308 аминокислотных остатков, имеет 13 α-спиралей и 3 β-складки [22,23]. Структура мономера пероксидазы представлена на рисунке 1.9.

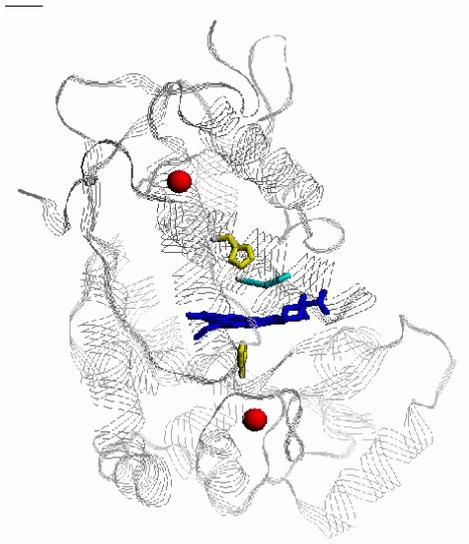


Рисунок 1.9 – Структура мономера пероксидазы, содержащего два иона кальция, на рисунке выделены два остатка гистидина (дистальный и проксимальный), аргинина и гем

Геминовая часть молекулы (гем, гемин) - железопроtopорфирин IX представлен на рисунке 1.10 [22]. Он состоит из четырех пиррольных колец, соединенных метиленовыми мостиками с железом (III) центрирующих молекулу.

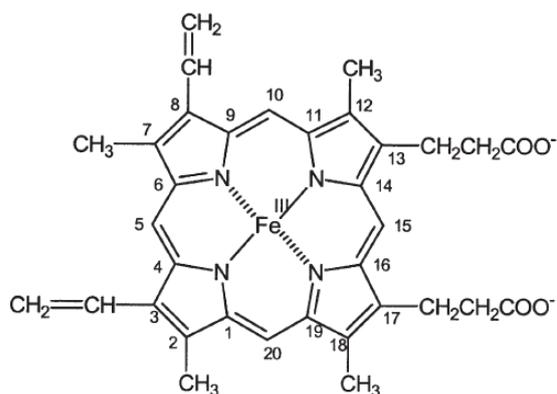


Рисунок 1.10 – Структура железопроtopорфина IX

Выполняя роль активного центра, гем участвует в разложении или активации перекиси водорода, в результате чего возникают радикалы соответствующих субстратов. Гем - это комплекс иона железа и молекулы проtopорфина. Гистидин занимает пятое координационное положение

иона железа, что сходно со структурой гемоглобина и миоглобина, поэтому этот гистидин называют проксимальным гистидином.

Два незаменимых иона кальция, входящие в состав HRP (один с дистальной, другой с проксимальной стороны) необходимы для поддержания термической стабильности молекулы [20].

HRP была определена в растениях, микроорганизмах и животных где она играет важную роль. В растениях HRP участвует в процессе лигнификации и в механизме защиты физически поврежденных или зараженных тканей [24,25].

Большое количество работ посвящено применению и рациональному использованию специфических окислительно-восстановительных свойств пероксидаз (КФ 1.11.1.X). Систематизируя представленные данные можно выделить следующие направления применения: 1) для детоксикации почв; 2) для биологической очистки сточных вод, загрязненных фенолами, крезолами и хлорированными фенолами; 3) создание биосенсоров для определения пероксида водорода и органических гидроперекисей. В то же время эти биосенсоры могут быть использованы для определения глюкозы, спиртов, глутамата и холина.

Так, в работе [26] изучается окислительная полимеризация фенолов и ароматических аминов, которая проводится в присутствии HRP в воде и смешивающихся с водой органических растворителей. Такая полимеризация может привести к новым типам ароматических полимеров.

Аналитическое применение HRP повсеместно расширяется в связи с ее высокой активностью, простотой определения продуктов реакции, стабильности и легкой иммобилизации и стабильности иммобилизованных препаратов [18-20,27,28]. Иммуноферментные пероксидазосодержащие аналитические тесты являются простым и надежным способом обнаружения токсинов, патогенных микроорганизмов, риска развития злокачественных опухолей [29].

1.2.2 Механизм действия пероксидазы

Как известно [30], оксидоредуктазы катализируют окислительно-восстановительные реакции. Субстрат, который подвергается окислению, выступает в роли донора водорода. В данном случае говорят о так называемом донорно-акцепторном механизме. HRP специфична только в отношении акцептора водорода, а именно пероксида водорода, в качестве доноров могут быть использованы различные соединения, такие как фенолы, ароматические амины, тиоанизол и др.

Реакция окисления в присутствии HRP представляет собой трехступенчатый циклический процесс, в котором фермент сначала окисляется H_2O_2 , а затем восстанавливается обратно до нативной формы за два последовательных шага, связанных с образованием двух ферментных промежуточных соединений I и II (рисунок 1.11) [22].

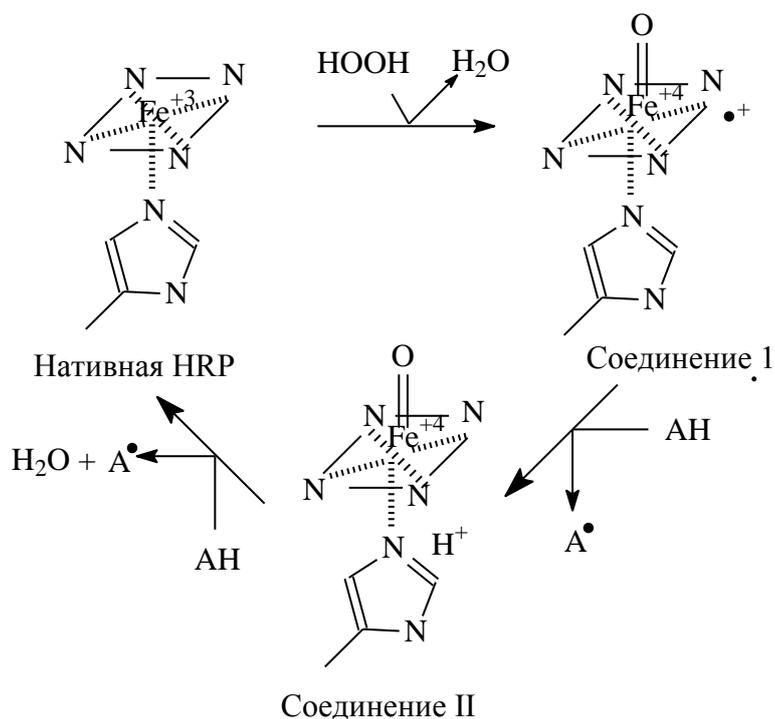


Рисунок 1.11 – Реакционный цикл HRP, показывающий промежуточные соединения I и II

Первым шагом в реакционном цикле является расщепление молекулы H_2O_2 , с получением воды и включением одного из атомов кислорода H_2O_2 в соединение I. Соединение I было впервые идентифицировано Theorell в 1941 году, через четыре года после идентификации соединения II Keilin and Hartree. Еще в 1953 году Джордж [31] правильно предложил трехступенчатый реакционный цикл для HRP. Тогда же он предположил, что соединение I имеет структуру железа (V). В настоящее время известно, что соединение I содержит оксоферрильную группу ($Fe^{IV}=O$), в которой железо находится в степени окисления +4, и порфириновый катионный радикал.

Соединение I способно окислять широкий спектр субстратных молекул (АН) по механизму с переносом одного электрона, по которому - катионный радикал разряжается (отрывается, освобождается) первым, что приводит к образованию второго промежуточного ферментного Соединения II. Соединение II, которое также содержит оксоферрильную группу ($Fe^{IV}=O$), затем восстанавливается с помощью второй молекулы субстрата (АН) до нативной ферментной формы железа (Fe^{III}). В течение этого одноэлектронного восстановления, феррильное железо возвращается в состояние железа, в то время как кислород принимает два протона с образованием молекулы воды.

Everse [32] предложил, что связь между железом и кислородом в обоих соединениях I и II не является обычной двойной связью. В самом деле, за исключением ее длины, все экспериментальные наблюдения показывают, что оксоферрильная связь может быть похожа на связи гема- O_2 в оксигемоглобине и окси-миоглобине, а также связи между атомами кислорода в озоне, т. е. би-радикальная, трехцентровая четырехэлектронная π -связь [22].

1.3 Способы иммобилизации пероксидазы

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ по сравнению с их нативной формой. К ним относятся увеличение стабильности фермента,

повторное или длительное использование, регулирование скорости реакции, простота отделения от продуктов реакции, возможность остановки реакции в любое время, модуляция каталитических свойств фермента, предотвращение загрязнения продуктов реакции. Очевидно, что иммобилизация ферментов может прямым образом повлиять на стоимость процесса и на качество целевых продуктов. Кроме того потенциальное изменение свойств ферментов посредством иммобилизации имеет свои перспективы. Например, при выборе метода иммобилизации можно улучшить температурный режим работы фермента, что в некоторых случаях позволяет проводить реакцию при более высоких температурах, тем самым увеличивая скорость реакции и выход продукта [33,34]. Методы иммобилизации подразделяются на два основных типа: химические и физические. К химическим методам относится ковалентное связывание белковой молекулы с носителем. К физическим методам иммобилизации ферментов относится адсорбция, включение фермента в гель (полимерную матрицу), инкапсулирование и включение в липосомы [35,36].

Одним из самых распространенных методов иммобилизации HRP является метод, при котором образуются новые ковалентные связи между ферментом и носителем. Этот метод иммобилизации обеспечивает стабилизацию молекулы фермента, создавая прочную и необратимую связь носителя с ферментом. При иммобилизации пероксидазы путем ковалентной сшивки важно, чтобы в иммобилизации участвовали функциональные группы, не задействованные в каталитическом процессе. Поэтому все химические методы иммобилизации классифицируют в зависимости от природы реакционной группы носителя, которая вступает в химическое взаимодействие с ферментной молекулой.

В работе [27] описывается простой и быстрый метод ковалентной иммобилизации HRP на химически синтезированном хитозансополимеризованном акрилате (хитозан-g-PEA) в виде шариков. Для подготовки хитозановых шариков хитозан (5г) растворяли в 2 % водной

уксусной кислоте (250 мл). Раствор хитозана погружали в разбавленный водный раствор NaOH, где хитозан осаждался непосредственно в форме шариков. Хитозановые шарики промывались дистиллированной водой, затем метанолом и высушивались в течении 24 ч при 40 С. Диаметр полученных шариков был в диапазоне около 250 нм. Необходимое количество заранее подготовленных хитозановых шариков и инициаторов добавлялись, чтобы ограничить количество дистиллированной воды в конической колбе, и энергично встряхивались 1 минуту, прежде чем было добавлено необходимое количество этилакрила и перемешивалось магнитной мешалкой 30 минут при комнатной температуре. Добавление раствора гидрохинона (3%) заканчивает полимеризационный процесс. Продукт отфильтровывался и промывался дистиллированной водой. Экстракция сополимера полиэтилакрилата выполнялась с бензолом. Посаженный сополимер высушивался при 40 С до постоянной массы.

HRP прикреплялась на хитозан-РЕА при помощи ковалентных связей по методу Каулета. Перед иммобилизацией поверхность хитозановых шариков активировали. Этот метод для связывания фермента является наиболее мягким, так как ферменты никогда не входят в контакт с химическими реагентами и таким образом избегают денатурирующих процессов. Процесс иммобилизации показан на рисунке 1.12.

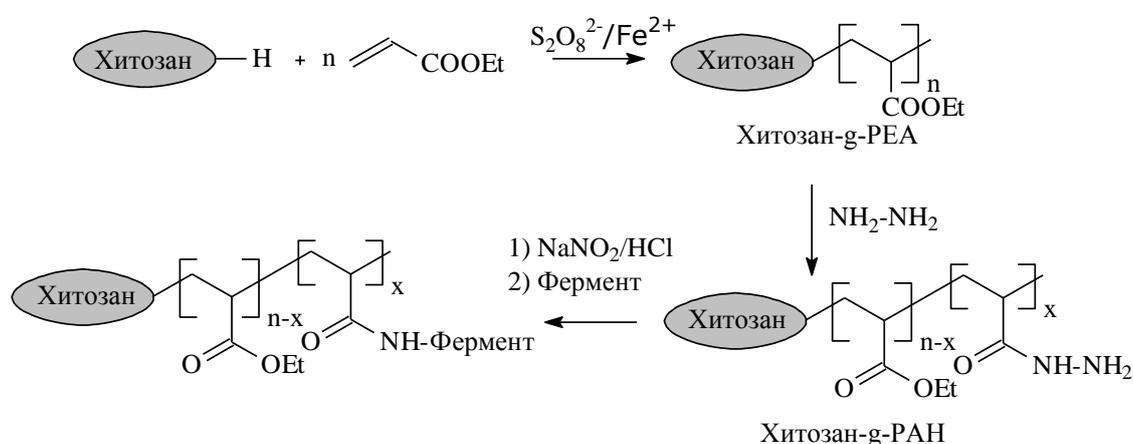


Рисунок 1.12 – Схема иммобилизации HRP на модифицированные хитозановые шарики

Активность иммобилизованной пероксидазы определялась по реакции окисления пирогаллола пероксидом водорода. Оптимальными условиями для эффективной работы биокатализатора являлись: температура 45 С, рН 10. Так же была подсчитана константа Михаэлиса K_m 3.784 ммоль/л, что было выше чем для нативной пероксидазы 2.235 ммоль/л. Полученные результаты указывают, что процессы иммобилизации немного снижают сродство пероксидазы к субстрату. С другой стороны активность иммобилизованной пероксидазы снижается медленнее по сравнению с нативной пероксидазой, сохраняя 65.8 % остаточной активности после 6 рециклов.

В работе [37] описывается способ ковалентной иммобилизации HRP на пористом кремнии, функционализированный 3-аминопропилдиэтоксисиланом. Активность HRP определяли спектрофотометрически с использованием гваякола и перекиси водорода. Единица пероксидазной активности определялась количеством фермента, при котором образовывался мкмоль тетрагваякола. Относительную термическую стабильность нативного и иммобилизованного ферментов определяли при 50 ° С. Иммобилизованный фермент инактивировался быстрее по сравнению с нативным, что объясняется теплопроводностью кремния и его тепловым воздействием кремниевой подложки на фермент. Для исследования влияния растворителя на активность фермента реакцию проводили в 50 % растворе ацетонитрила. Нативная пероксидаза потеряла 95 % своей активности в течении 2 часов, в то время как иммобилизованная HRP сохранила 80 % каталитической эффективности. Так же, активность нативной HRP сильно снижается в присутствии избытка перекиси водорода. Иммобилизованный фермент показал более низкий уровень инактивации, за счет связывания фермента с матрицей пористого кремния. Таким образом, HRP ковалентно иммобилизованная на пористый кремний перспективна для защиты окружающей среды. Она может использоваться для удаления такие как удаление выщелоченного красителя в текстильной промышленности или для

очистки различных промышленных стоков. Система может быть так же применена в области биомедицины.

Другой способ ковалентной иммобилизации пероксидазы – на модифицированных акрилонитриловых мембранах пероксидазы хрена [38]. Иммобилизованная, таким способом, пероксидаза хрена использовалась для понижения концентрации фенола в водных растворах с помощью окисления фенола перекисью водорода. Полное удаление фенола достигается в присутствии иммобилизованной пероксидазы хрена при концентрации перекиси водорода 0,5 ммоль/л и концентрации фенола в растворах в пределах 5-40 мг/л.

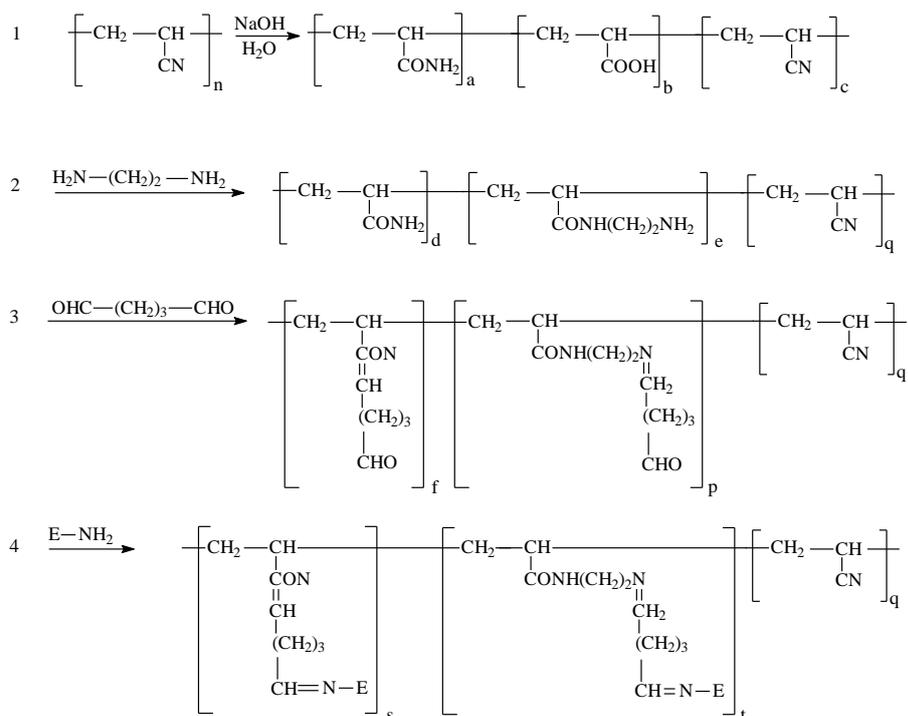
Ультрафильтрационная мембрана, приготовленная из акрилонитрилового сополимера (акрилонитриловый сополимер – 91.3%, метилметакрилат – 7.3%, винилсульфонат натрия – 1.4%), являлась носителем иммобилизованной HRP. Модификация мембраны была проведена в присутствии следующих химических соединений: гидроксид натрия и этилендиамин. Иммобилизация HRP на мембраны из акрилонитрилового сополимера была проведена с глутаровым альдегидом.

Часть модифицированной мембраны (100 см²) была помещена в 25% водный раствор глутарового альдегида объемом 50 см³ при 4°C на 60 минут. После мембрана была полностью промыта дистиллированной водой, 1М раствором NaCl и 0.1М буфером фосфата натрия (pH 7.0). Затем мембрана была погружена в раствор HRP объемом 50 см³ с концентрацией 1 мг/см³, приготовленный в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.0). Иммобилизация проводилась при температуре 4 °С в течение 20 часов. Готовая мембрана, являющаяся носителем ковалентно иммобилизованной HRP, была промыта дистиллированной водой, 1М раствором NaCl и 0.1М буфером фосфата натрия (pH 7.0). Мембрана хранилась в 0.02 % водном растворе NaN₃ при 4 °С.

Иммобилизация фермента на немодифицированной мембране была проведена таким же образом, но без выдерживания в глутаровом альдегиде (адсорбционная иммобилизация) [38].

Удельные активности свободной и иммобилизованной HRP были определены исследователями в стационарных условиях спектрофотометрически (длина волны 450 нм). 0.2 мл 1М раствора перекиси водорода смешиваются с 0.2 мл дистиллированной воды и 2.5 мл 0.01% раствора о-дианизидина (смесь 1:10 этанолацетатного буфера с рН 5 для иммобилизованного фермента и с рН 4.2 для свободного фермента). Смесь нагревается до температуры 26 °С в течение 10 минут, а затем иммобилизованная HRP на мембране или 0.1 мл 0.01% раствора HRP в 0.1М ацетатном буфере с рН 4.2 добавляется к смеси. HRP катализирует окисление о-дианизидина перекисью водорода, в результате чего меняется цвет раствора. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации о-дианизидина.

Процесс иммобилизации HRP на немодифицированных и модифицированных мембранах из акрилонитрилового (АН) сополимера поддерживался в оптимальных условиях. Иммобилизация HRP на преобразованной мембране проводилась в присутствии глутарового альдегида, который образует ковалентные связи между аминокруппами на поверхности носителя и белковыми молекулами.



В процессе экспериментальной работы установили, что нативная HRP проявляет максимальную активность при pH 4.2. Оптимум pH для иммобилизованной HRP сдвигается до 5.0. Этот сдвиг, возможно, обусловлен отрицательным зарядом карбоксильных групп, образовавшиеся в матрице мембраны после взаимодействия с NaOH, который не создает связей с этилендиамином и HRP. Эти группы притягивают ионы водорода к поверхности мембраны, что вызывает повышение pH в растворе. Было установлено, что оптимальная температура для свободной HRP 26°C. Иммобилизованный фермент достигает активности при 30°C [38].

Исследования зависимости термостабильность – активность фермента для свободной и иммобилизованной HRP проводились в следующих условиях: инкубация фермента в 0,1M ацетатном буфере при оптимальном pH, 40°C и 60°C в течение 7 часов. Для данных температур установлено, что термическая инактивация в течение 7 часов для свободной HRP проходит сильнее, чем для иммобилизованной на мембране из АН сополимера. Свободный фермент сохранил только 40% от начальной активности при 40°C после седьмого часа, тогда как иммобилизованная HRP потеряла только 37% своей активности. При 60°C обе формы фермента были значительно

дезактивированы, так что после семи часов свободная HRP сохранила 10% начальной активности, а иммобилизованная – 29%.

Для определения практической стабильности иммобилизованной на мембране из АН сополимера HRP. Стандартные растворы пропускались через мембрану с иммобилизованной HRP, используя ультрафильтрационную ячейку, в течение 10 дней. Объем каждого раствора составлял 230 см³. В течение этого времени наблюдались незначительные потери активности фермента. Инактивация до 50% начальной активности фермента была отмечена только после 20 дней [38].

Другим эффективным способом иммобилизации ферментов является их адсорбция на нерастворимых носителях. При таком способе иммобилизации фермент связывается с поверхностью носителя за счет электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей. Основной особенностью адсорбции ферментов на нерастворимых носителях является простота этого способа. Данный процесс осуществляется путем взаимодействия водного раствора фермента с носителем (например, при перемешивании). Однако, при адсорбции образуются непрочные связи между ферментом и носителем. Поэтому для упрочнения связей проводят предварительную модификацию фермента либо носителя [35].

В работе [39] описывается разработка высокочувствительного наноструктурированного электрохимического биосенсора на основе HRP адсорбированной на однослойные углеродные нанотрубки (ОУН). По этому методу ОУН сначала разгрупируются с желчной солью холата натрия, который впоследствии был заменен на HRP, холат натрия удаляли диализом в течение 12 ч при 4 °С. Далее полученный раствор HRP-ОУН диализовали при 4 °С для удаления неиспользованной HRP, с частой сменой буфера. Конечную суспензию центрифугировали в течение 1 ч и сохраняли надосадочную жидкость. HRP-ОУН был использован в амперометрическом биосенсоре, который объединялся с L-цистеином на золотом электроде за счет ковалентной связи S-Au и использовался в качестве субстрата для

иммобилизации ферментов. Модифицированный электрод показал высокую чувствительность к H_2O_2 . Оптимальным значением pH для работы биосенсора было 7.5.

Thais F. Schmidt и др. [40] описали способ иммобилизации HRP на хитозановой матрице в чередуемых слоях. Адсорбция материалов в чередующихся слоях в настоящее время изучена и может использоваться для иммобилизации различных биомолекул в разнообразных областях. Два основных фактора, как правило, учитываются для обоснования пригодности метода, а именно: возможности молекулярной инженерии, с обоснованием выбора носителя, а также мягкие условия для производства пленок. Успешная иммобилизация проведена для многих систем, верно также и то, что в большинстве случаев сохранение активности требует оптимизации условий изготовления пленок. Например, антигены, адсорбированные на пленки с чередующимися слоями для биодатчиков, сохраняли свою активность в течение длительного периода времени, если слои антигена чередовались со слоями дендримера, но не с полиэлектролитами. Не существует правила для прогнозирования, какой именно материал подойдет для данной биомолекулы. Однако, хитозаны и дендримеры являются одними из самых подходящих, первые обладают биосовместимостью, вторые имеют полую структуру. Дополнительными преимуществами хитозанов является их сродство к биомолекулам, особенно ферментам, их механическая прочность, жесткость и способность к биологическому разложению, экологичность, безопасность для человека и окружающей среды. Активность иммобилизованных биомолекул также сильно зависит от структуры пленки, и это опять же преимущество пленок, полученных с помощью чередования слоев, что позволяет точно управлять молекулярной структурой.

Сохранение активности биомолекул предполагает сохранение молекулярной структуры, что создает серьезную проблему для технологии иммобилизации. Ключевым фактором в этой связи является возможность сохранения захваченной пленкой воды, которая была доказана различными

экспериментальными методами, в том числе рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией.

Метод, описанный в [40], является первым, в котором участвуют только хитозан и HRP. Эксперименты проводились при температуре 23 ± 2 ° С. Хитозан был растворен в уксусной кислоте, 0,5 мг / мл, HRP растворяли в натрийфосфатном буфере (pH 7,5), где HRP становится отрицательно заряженной. Твердые носители погружали на различные периоды времени последовательно в четыре раствора: 1) хитозан, 2) уксусная кислота 1%. 0,5 моль / л NaCl, для удаления избытка хитозана, 3) HRP, 4) 0,05 г / л фосфата, 0,5 моль / л NaCl буфер, чтобы удалить избыток HRP. В хитозан и растворы ПХ твердые носители погружали на 10 мин, а в другие – на 1 мин. Это 4-ступенчатая процедура повторяется до образования 6-двухслойной пленки. Твердые носители сделаны из кварца.

Для определения активности ферментов, исследователи [40] поместили твердый носитель в среду, содержащую пирогаллола 12,8 ммоль / л и перекиси водорода 5 ммоль / л, определялась плотность при 420 нм в зависимости от времени. Все эксперименты проводились по 3 раза для проверки воспроизводимости. Была рассчитана активность фермента – 349 нг пирогаллола/мин/мг HRP. Потерю активности ферментов, иммобилизованных на твердых носителях, приписывают к более высокому ограничению подвижности и доступа субстрата (перекись водорода) к каталитическому сайту.

После 1 месяца 80% от активности фермента были сохранены, что близко к полученному результату для HRP, иммобилизованных на других матрицах. Несмотря на снижение активности, реакция с пирогаллолом может быть оптически проконтролирована в течение продолжительного периода времени.

Другой способ иммобилизации ферментов это их иммобилизация на различных матрицах, который позволяет получать биокатализаторы с новыми функциональными свойствами, повышенной стабильностью при

использовании и хранении. Так, работа [41] посвящена изучению иммобилизации пероксидазы в поли-N-винилкапролактамах (ПВК), стабилизированный фенолом (25-150 ммоль/дм³) с последующим его ферментативным окислением в присутствии пероксида водорода.

Поли-N-винилкапролактамы – термоосаждаемый полимер, обладающий высокой гидрофильностью, выраженной способностью к комплексообразованию, отсутствием токсичности, что позволяет использовать его в качестве матрицы для иммобилизации широкого спектра БАВ в т. ч., белков, аллергенов, ферментов [42].

За единицу пероксидазной активности принимали такое количество препарата, которое катализировало окисление фенола (1 мкмоль) за 20 с при рН 7,0 и 20 °С.

Процесс иммобилизации пероксидазы заключался в растворении навески фермента в 8-10%-ном растворе ПВК (М. м. 1.5 млн.) с последующим прикапыванием полученного раствора в термостатируемый при 40°С 0,1 моль/дм³-фосфатный буферный раствор (рН 7.0), содержащий 0.5%-ный фенол, как стабилизатор гранулообразования. Полученные, легко отделяемые гранулы ПВК с пероксидазой и включенным фенолом, помещали в Na-фосфатный буферный раствор (рН 7,0) и окисляли пероксидом водорода [41].

Количество включенного фенола исследователи находили по разности его содержания в исходном растворе и в растворах, полученных после отделения гранул согласно [42]. Степень трансформации включенного в ПВК фенола определяли путем растворения гранул в растворе гидроксида аммония (0,2 моль/дм³).

Высокая степень включения фенола (83.5-100%) наблюдается при его концентрациях – 50-150 ммоль/дм³, за 20 мин при рН 6.0-7.0 и температуре 40-42°С; при этом были получены препараты в виде оформленных, устойчивых гранул сферической формы.

Обнаружено, что в пределах концентраций фенола 25-100 ммоль/дм³ иммобилизованная HRP способствует его высокой степени конверсии (100-78.2%), тогда как нативная — трансформирует его лишь на 79.4-43.0% (рисунок 14б). Увеличение концентрации фенола до 150 ммоль/дм³ ингибирует активность пероксидазы, однако эффективность конверсии субстрата иммобилизованным препаратом была вдвое выше по сравнению с нативным [41].

При увеличении активности фермента (14.4-25.2 Ед/мг) степень конверсии фенола иммобилизованным препаратом в 1.6-2.3 раза превышала таковую по сравнению с нативным. Иммобилизованная в ПВК HRP (35°C) показала количественное сохранение ферментативной активности на протяжении 4 мес., нативная HRP уже через 2 недели теряла до 50% исходной активности.

Еще одним перспективным способом иммобилизации ферментов является золь-гель метод, в котором белковые молекулы инкапсулируются в химически инертную золь-гелевую подложку, получаемую путем гидролиза и поликонденсации металлоорганических прекурсоров. Золь-гель метод имеет свои преимущества, такие как простота исполнения, проведение процесса при температуре близкой к комнатной, что уменьшает денатурацию белка, легкость включения замещающих групп в матрицу диоксида кремния, невысокая стоимость и доступность прекурсоров [43].

В работе [44] описывается золь-гель метод иммобилизации пероксидазы в бездетергентную микроэмульсию, которая состояла из n-гексана/изопропанола/воды. В процессе иммобилизации смешивали тетраметоксилан, используемый в качестве прекурсора, и раствор фермента в фосфатном буфере. Затем полученную смесь переливали в раствор n-гексана и изопропанола до формирования прозрачной стабильной микроэмульсии, которая представляла собой трехфазную систему (n-гексан/изопропанол/вода). Через 3 минуты порошковый микрогель оседал на

дно колбы Эрленмейера и был отфильтрован через фильтровальную бумагу. Полученный порошок промывался и хранился в фосфатном буфере при 4 °С. Активность HRP определяли с помощью УФ-спектрофотометра при 430 нм с использованием 20 мМ пирогаллола и 5 мМ пероксид водорода. Одна единица активности HRP была определена как 1 мг пурпурогаллина, полученного из пирогаллола в течение 20 сек при 20 °С и рН 6.0. Имобилизованная таким способом HRP сохраняла свою первоначальную активность в течении 48 ч и оставалась стабильной в отношении избыточной перекиси водорода. Оптимальное соотношение фермента к прекурсоры было 2:1.

1.4 Нанокатализ и магнитный нанокатализ

Из-за того, что наночастицы имеют большое соотношение поверхности к объему, по сравнению с сыпучими материалами, они являются привлекательной альтернативой традиционным катализаторам.

С помощью нанокатализа можно синтезировать катализаторы с высокой активностью, большой селективностью, и превосходной стабильностью. Эти характеристики могут быть легко получены, изменением размера, формы, морфологии, состава, электронной структуры, и тепловой и химической стабильности наноматериала. Нанокатализ обладает существенными преимуществами: (1) Для осуществления любой химической реакции субстрат и каталитический центр должны контактировать. Из-за наноразмера частиц площадь поверхности активного компонента нанокатализатора высока, и это значительно увеличивает контакт между реагентами и катализатором; в свою очередь эта особенность позволяет гетерогенной каталитической системе достигнуть показателей близких к гомогенным. (2). Наноразмеры частиц обеспечивают увеличение отношения площади поверхности к объемной фазе. (3) Нанокатализаторы обладают свойствами, которыми не обладают макроскопические катализаторы. Таким

образом, нанокатализаторы имеют неоспоримые преимущества перед обычными каталитическими системами; однако, отделение нанокатализаторов от реакционной смеси затруднительно. Обычные методы (такие как фильтрация) не эффективны из-за их нано размера. Это уменьшает экономичность и экологическую устойчивость нанокатализаторов. Чтобы решить эту проблему, было предложено использовать магнитные наночастицы. Их нерастворимый и парамагнитный характер позволяет легко и эффективно отделить катализатор от реакционной смеси внешним магнитом. Кроме того, всесторонний контроль их свойств, включая размер, форму, морфологию и дисперсность позволяет ученым тщательно проектировать материалы, которые необходимы для специфического применения. Также магнитные материалы обладают высокой специфичностью и их активные центры имеют очень маленькие размеры. Еще одно важное преимущество магнитно разделяемых наночастиц – возможность их многократного использования [45].

1.4.1 Способы синтеза магнитных наночастиц

В настоящее время существует множество различных способов синтеза магнитных наночастиц: соосаждение, золь-гель синтез, сонохимические реакции, гидротермальные реакции, полиольные процессы, микроэмульсии, биологический синтез и др. Синтез суперпарамагнитных наночастиц из-за их коллоидной природы представляет собой сложный химический процесс. Основной задачей является определение экспериментальных условий синтеза, которые способствовали бы получению монодисперсных магнитных зерен подходящего размера. Второй важной задачей синтеза является выбор воспроизводимого процесса, который может быть индустриализован без сложной процедуры очистки.

1.4.1.1 Получение магнитных наночастиц методом соосаждения

Несмотря на большое разнообразие способов синтеза магнитных наночастиц, самым доступным и простым способом является метод химического соосаждения солей железа. С помощью этого метода можно синтезировать наночастицы металлов, оксидов металлов, гидроксидов, солей и др. Процесс синтеза наночастиц оксидов железа (Fe_3O_4 либо $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) обычно проводят в водной фазе, путем смешения ферро- и ферри- солей железа. В результате происходит формирование золь - коллоидных растворов наночастиц.

Химическую реакцию образования Fe_3O_4 можно записать как

$$\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O} \quad (1)$$

Значение pH должно быть от 8 до 14, при стехиометрическом соотношении Fe^{2+} и Fe^{3+} 1:2 в неокисляемой кислородом среде. Тем не менее, магнетит (Fe_3O_4) не является очень стабильным и чувствителен к окислению. Магнетит преобразуется в маггемит ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) в присутствии кислорода.



Размер и форма таких наночастиц могут быть адаптированы с относительным успехом регулируя pH, ионную силу, температуру, природу солей (перхлораты, хлориды, сульфаты и нитраты) или соотношение концентраций $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$.

Основным преимуществом процесса соосаждения солей железа является то, что таким способом может быть синтезировано большое количество наночастиц. Тем не менее, контроль распределения частиц по размеру ограничен. Процесс соосаждения происходит в два этапа: первый – зарождение кристаллов, когда концентрация достигает критического пересыщения, а затем происходит медленный рост зародышей путем диффузии растворенных веществ к поверхности кристалла. Для получения монодисперсных наночастиц оксида железа, эти две стадии должны быть

разделены, т.е. следует избегать зарождения кристаллов в период роста [46,47].

1.4.1.2 Полиольный метод получения магнитных наночастиц

Полиольный метод получения магнитных наночастиц является универсальным химическим подходом для синтеза нано- и микрочастиц с хорошо определяемыми формами и контролируемыми размерами. Растворители, такие как полиолы (например, полиэтиленгликоль) имеют интересные свойства: благодаря их высокой диэлектрической проницаемости, они выступают в качестве растворителей, способных растворять неорганические соединения, и в связи с их относительно высокими температурами кипения, они имеют широкий диапазон рабочих температур (от 25 °С до температуры кипения) для приготовления неорганических комплексов. Полиолы также служат в качестве восстановителей и стабилизаторов для контроля роста частиц и предотвращения агрегации между частицами [46].

В полиольном процессе, полярность полиола позволяет растворять различные неорганические соли. Из-за высокой температуры кипения растворителя, полиол улучшает реакционную способность различных реагентов. Что еще более важно, он может сократить много видов металлических ионов для синтеза металлических и оксидных наночастиц металлов [48].

В этих процессах, прекурсор суспендируют в жидком полиоле. Суспензию перемешивают и нагревают до заданной температуры, которая может достигать точки кипения полиола. Субмикронные частицы могут быть синтезированы путем увеличения температуры реакции или с помощью гетерогенной нуклеации, добавляя внешнее ядро. Последний способ является более приемлемым, так как повышение температуры приводит к термической деструкции полиола. Кроме того, гетерогенная нуклеация позволяет, в

некоторой степени, контролировать размер частиц в субмикронном диапазоне.

Полиольный метод имеет ряд преимуществ. Во-первых, поверхность готовой наночастицы магнетита покрыта гидрофильным полиольным лигандом *in situ*; таким образом, наночастицы могут быть легко диспергированы в водной среде и в других полярных растворителях. Во-вторых, относительно высокая температура реакции этой системы способствует высокой степени кристалличности частицы и, следовательно, более высокой намагниченности. Наконец, распределение по размерам наночастиц значительно меньше, чем частиц, образующихся при использовании традиционных методов.

1.4.1.3 Гидротермальный метод получения магнитных наночастиц

Гидротермальный метод в последнее время все больше применяется для получения нанокристаллических оксидных материалов. В процессе данного метода нагреваются соли, оксиды и гидроксиды металлов в виде растворов или суспензий при высокой температуре (около 300 С) и давлении (около 100 МПа). При этом в растворе происходит образование продукта реакции. Эти реакции проводят в водной среде обычно в автоклавах. Время реакции может достигать 24 часов.

В данных процессах реакционные условия, такие как температура, концентрация раствора, продолжительность процесса и так далее сильно влияют на целевой продукт реакции. Таким образом, морфологией (размер, форма, агломерация и распределение частиц по размерам) продукта можно управлять за счет изменения параметров проведения процесса. Действительно, было обнаружено, что размер магнитных частиц оксида железа увеличивался с увеличением времени реакции и, что высокое содержание воды приводит к осаждению крупных частиц Fe_3O_4 . Скорость зарождения зерна сильно зависит от температуры реакции. Зарождение

может быть быстрее, чем рост зерен при более высоких температурах, т.к. увеличивается растворимость веществ, что приводит к уменьшению размера частиц из-за медленного осаждения продуктов реакции.

Дешевизна, простота, экологическая приемлемость - одни из главных достоинств гидротермального метода [46,47].

1.4.1.4 Золь-гель метод получения магнитных наночастиц

Золь-гель метод является приемлемым жидкофазным способом синтеза магнитных наночастиц. Эти процессы основаны на гидроксилации и конденсации молекулярных прекурсоров в растворе. Первой стадией данного процесса является образование «золя» нанометровых частиц. Дальнейшая конденсация и неорганическая полимеризация приводит к трехмерной металлической оксидной сетке, именуемой жидким гелем. Поскольку эти реакции проводятся при комнатной температуре, дальнейшая тепловая обработка является необходимой для получения конечной уплотненной кристаллической структуры геля. Свойства геля сильно зависят от полученной структуры на стадии золя.

Золь-гель метод используют в основном для получения порошков оксидов металлов, пористой структуры с размером частиц до 1 нм. Так же этот метод может быть применен для синтеза наноразмерных металлов и «сплавных» биметаллических частиц [49, 50]. Главным преимуществом такого метода является возможность синтеза различных нанокомпозитов, типа «неорганика-органика» (органические молекулы включаются в неорганическую матрицу) и «неорганика-неорганика» (наночастицы серебра в матрице TiO_2).

1.4.2 Методы стабилизации магнитных наночастиц

Важное значение при получении магнитных наночастиц имеет их стабилизация, так как на поверхности каждой частицы имеются продукты ее химической модификации, которые влияют на ее свойства. Часто наночастицы пытаются стабилизировать при их получении, для того, чтобы на выходе продукт не менял свои свойства по истечении времени. Существует два способа стабилизации магнитных наночастиц в ходе их синтеза – это закрепление их в матрицах и получение наночастиц с покрытием поверхностно-активными веществами или специфическими материалу частицы лигандами. В первом случае имеют дело с наноматериалом для которого важны совместные свойства наночастиц. Второй случай имеет преимущества, когда надо модифицировать поверхность наночастицы. Существуют также композиционные материалы, которые представляют собой смеси наночастиц и полимерных материалов, например стабилизация наночастиц в матрицах дендримеров и в сферических полимерных образованиях [50]. Разделяют три основных вида стабилизаторов: мономерные, неорганические и полимерные стабилизаторы.

1.4.2.1 Стабилизация магнитных наночастиц с использованием мономерных соединений

Поверхность наночастиц магнетита может быть стабилизирована адсорбцией лимонной кислоты в водной среде. Эта кислота может быть адсорбирована на поверхности наночастицы магнетита путем координации с помощью одной или двух функциональных групп изокарбоновой кислоты, в зависимости от стерической необходимости и кривизны поверхности. Это позволит, по крайней мере, одной группе карбоновой кислоты, взаимодействующей с растворителем, отвечать за работу отрицательно заряженной и гидрофильной поверхности [51]. Оптимизация процесса

осаждения в присутствии избытка ионов цитрата натрия позволяет получать частицы с диаметром ядра 4 нм и гидродинамическим диаметром 8.6 нм. Карбоксилаты могут оказать существенное влияние на рост наночастицы оксида железа и на их магнитные свойства [51]. Вее и соавт. [53] исследовали влияние концентрации ионов цитрата на размер частиц маггемита. Krishnamurti и Huang изучили влияние цитрата на кинетику окисления Fe^{2+} и полученного гидролитического продукта Fe^{3+} . Huang и Ван показали, что константа скорости регулирующая окисление Fe^{2+} в присутствии неорганического лиганда уменьшается так: перхлорат > фторид > нитрат > хлорид > карбонат > сульфат > силикат > фосфат [54].

Liu и Huang [55] исследовали влияние присутствия лимонной кислоты в процессе синтеза оксида железа. При повышении концентрации лимонной кислоты происходит значительное уменьшение формирования кристаллов оксидов железа. Кроме того, присутствие цитрата привело к изменению геометрии поверхности. Также в качестве стабилизаторов оксида железа в водной среде могут быть использованы глюконовая кислота [56], димеркаптосукциновая кислота [57], фосфорилхолин [58]. Диапазон стабильности сильно зависит от pH и концентрации адсорбированных кислот или фосфонатов.

P. Hubert Mutin и соавт. [59] рассмотрели возможность использования поверхностно-активных веществ алкансульфокислоты и алканфосфоновой кислоты в качестве эффективно связывающих лигандов на поверхности наночастицы Fe_2O_3 и использование этих кислот как стабилизаторов для распределения частиц в органических растворителях. Yee и др. [60] предложили две возможные схемы связывания для ионов фосфоната на Fe^{3+} , по которым один или два атома O фосфонатных групп связываются на поверхности. Sahoo и соавт. [61] сообщали о поверхностном получении магнетита с помощью олеиновой кислоты, лауриновой кислоты, гексадецилфосфоной кислоты и дигексодецилфосфата. Это исследование

показало, что алкилфосфонаты и фосфаты могут быть использованы для получения термодинамически стабильных дисперсий магнитных наночастиц феррита. Лиганды, судя по всему, представляют собой квази-двухслойную структуру, с первичным слоем прочно связанным с поверхностью наночастиц.

1.4.2.2 Использование неорганических материалов для стабилизации магнитных наночастиц

Неорганические материалы, такие как диоксид кремния, золото или гадолиний (III) могут так же обеспечивать стабильность наночастиц оксида железа в растворе и способствуют связыванию различных биологических лигандов с поверхностями наночастиц. Такие наночастицы имеют внутреннее ядро оксида железа с наружной металлической оболочкой из неорганических материалов.

Так, например, используя диоксид кремния в качестве материала для покрытия магнитных наночастиц, можно предотвратить их агрегацию в жидкости и увеличить их химическую стабильность. Стабилизировать наночастицы можно путем экранирования магнитного дипольного взаимодействия с оболочкой диоксида кремния. С другой стороны, у наночастиц покрытых диоксидом кремния увеличивается электростатическое отталкивание, так как наночастицы диоксида кремния являются отрицательно заряженными [62]. Одним из преимуществ использования диоксида кремния в качестве стабилизатора является наличие поверхностных силанольных групп, которые могут легко вступать в реакцию с различными сшивающими агентами для ковалентного присоединения специфических лигандов к магнитным наночастицам. Например, аминокислоты путем гидролиза и конденсации органосилана (например, аминопропилтриэтоксисилана) присоединяли к магнитным наночастицам, которые были покрыты диоксидом кремния [63].

Другое неорганическое покрытие магнитных наночастиц, позволяющее их стабилизировать, – золото. Например, Lin и соавт. [64] синтезировали Fe/Au наночастицы. Ожидалось, что оболочка Au защищает ядро Fe и обеспечивает дальнейшую органическую функционализацию.

1.4.2.3 Использование полимерных материалов для стабилизации магнитных наночастиц

Часто в качестве стабилизаторов используют полимеры, которые способны образовывать на поверхности наночастиц защитную оболочку. Одним из примеров полимерного стабилизатора является декстран. Декстран является полимерным полисахаридом, состоящим исключительно из α -D-глюкопиранозильных остатков с разной длиной и разветвленностью. Декстран часто используют из-за его биологической совместимости [65]. Декстран способствует образованию сверхмалых магнитных оксидов железа в процессах соосаждения. Используя декстран можно получить стабильные наночастицы желаемых размеров.

Важным фактором в выборе декстрана является благоприятный размер цепи декстрана, что позволяет оптимизировать полярные взаимодействия (в основном водородные связи) с поверхностью железа. Хотя одиночные водородные связи являются относительно слабыми, полная энергия связи по длине молекулы полисахарида может быть очень высокой из-за большого количества гидроксильных групп на молекуле.

Другим распространенным полимерным носителем является полиэтиленгликоль, который представляет собой гидрофильный, водорастворимый, биосовместимый полимер. С его помощью можно получить частицы с размерами от 20 до 35 нм и от 60 до 100 нм. Авторами [66] был предложен способ синтеза полиэтилен-покрытых наночастиц оксида железа. В данном методе предлагалось гидролизовать $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в воде, после чего обработать раствор блок-сополимером полиэтиленгликоль-

полиаспарагиновая кислота. Полученные наночастицы показали хорошую растворимость и стабильность в водном и физиологическом растворах. Экспериментальные данные показали, что такие молекул являются мультивалентной связью на поверхности наночастиц оксида железа, посредством координирования между карбоновой кислотой в, содержащейся в блок-сополимерном сегменте полиаспарагиновой кислоты и Fe на поверхности наночастицы оксида железа.

1.5 Иммобилизация пероксидазы на магнитные наночастицы

Авторы статьи [67] описывают способ иммобилизации HRP на поли(глицидилметакрилат-со-метилметакрилат) (поли (GMA-MMA) посредством ковалентной связи. Иммобилизованный таким образом фермент авторы предлагают использовать для очистки фенольных сточных вод в непрерывных системах. Для этой цели были получены магнитные шарики путем дисперсионной полимеризации, которая проводилась в водной среде с дисперсией, содержащей FeCl₃ (0.3 М, использовался в качестве прекурсора для термического осаждения оксида железа в гранулах). Органическая фаза содержащая глицидилметакрилат (GMA), метилметакрилат (MMA), этиленгликольдиметакрилат (EGDMA, как сшивающий агент) и 5% поливиниловый спирт (PVA, в качестве стабилизатора) смешивают с 0.2 г α-α'-азоизобисбутиронитрилом (AIBN, в качестве инициатора) в толуоле. Реакцию полимеризации проводили при 70 °С в течение 2 ч, а затем при 80 °С в течение 1 часа. Далее во время тепловой обработки эпокси группы магнитных шариков были обращены в аминогруппы с помощью реакции аммонолиза из-за присутствия аммиака в среде. Аминированные магнитные шарики были активированы с помощью глутарового альдегида, после чего HRP ковалентно связывалась через аминогруппы с поли(GMA-MMA) магнитными шариками. Схематически данный процесс представлен на рисунке 1.13.

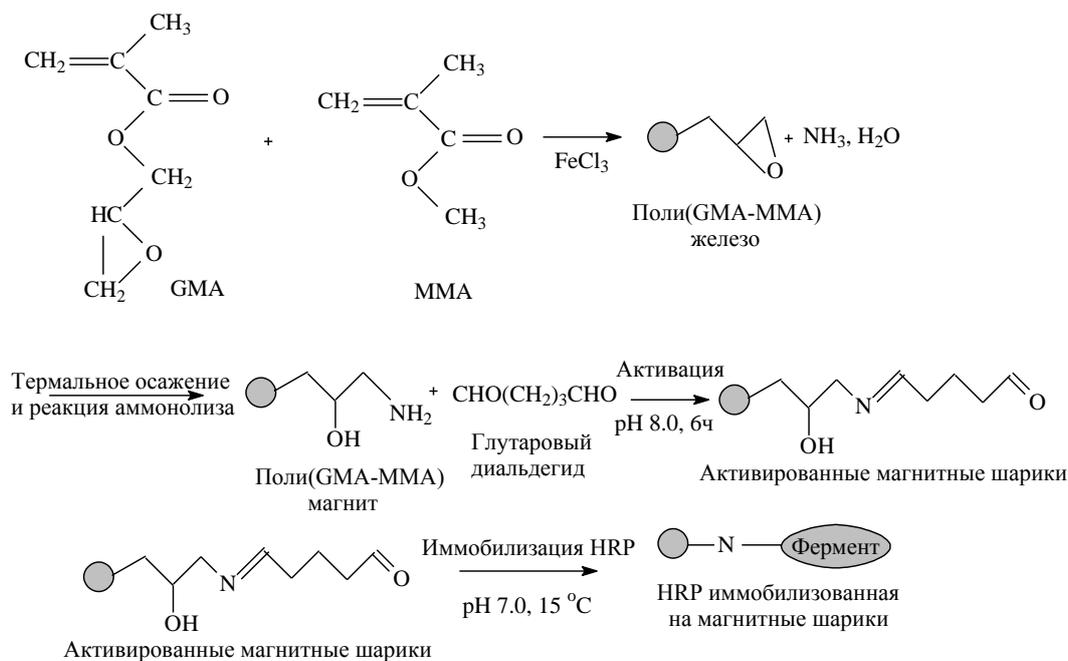


Рисунок 1.13 – Схема процесса иммобилизации HRP на поли(GMA-MMA) магнитные шарики

Иммобилизованная таким образом HRP сохранила 79% от активности нативной HRP. Иммобилизованная HRP в данном исследовании использовалась для удаления фенола и р-хлорфенола путем полимеризации растворенного фенола в присутствии перекиси водорода (H_2O_2). Оптимальное значение pH для нативной и иммобилизованной HRP наблюдалось при pH 7.0. Оптимальная температура для окисления фенолов с иммобилизованной HRP была между 25 и 35 ° C. Эксперименты показали, что иммобилизованная HRP инактивировалась при больших температурах, чем нативная HRP. Наконец, высокая рабочая стабильность иммобилизованной HRP в реакторе, указывает на то, что иммобилизованная HRP может успешно использоваться в широкомастабных непрерывных системах для ферментного удаления фенолов.

Другим примером иммобилизации HRP на магнитные наночастицы является работа [68]. Наночастицы были получены методом соосаждения Fe^{+2} и Fe^{+3} с NH_4OH . После чего, полученный оксид железа покрывался монослоем 3-аминопропилтриэтоксисиланом, который имеет $-\text{NH}_2$ группы,

способные присоединять биомолекулы (рисунок 1.14). Затем на полученные наночастицы ковалентно иммобилизовывали HRP. Средний диаметр таких наночастиц составлял 7.5 нм.

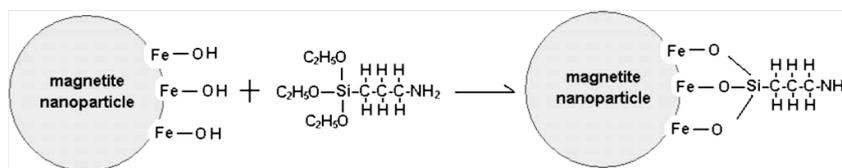


Рисунок 1.14 – Процесс нанесения 3-аминопропилтриэтоксисилана на магнитные наночастицы

Активность HRP исследовалась по изменению оптической плотности в реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбезидина пероксидом водорода. Результаты колориметрического анализа показывают, что оптическая плотность в присутствии HRP иммобилизованной на наночастицы, покрытые 3-аминопропилтриэтоксисиланом выше, чем в присутствии HRP иммобилизованной на наночастицы без 3-аминопропилтриэтоксисилана. Установлено, что количество адсорбированной HRP на покрытые 3-аминопропилтриэтоксисиланом наночастицы почти в 2 раза выше, чем без 3-аминопропилтриэтоксисилана, что объясняется наличием у него $-NH_2$ групп, которые образуют химические связи с HRP.

В работе [69] описывается адсорбционная иммобилизация HRP на магнитные наночастицы, полученные методом соосаждения Fe^{+2} и Fe^{+3} в щелочных условиях в атмосфере азота при 25 ° C (M25) или 90 ° C (M90). Мгновенный черный осадок Fe_3O_4 улавливали неодимовым магнитом, промывали и нейтрализовали, и хранили в дистиллированной воде для дальнейшего использования. Рассчитанный средний размер частиц для M25 и M90 был 8 и 10 нм соответственно. Для получения бионанокатализатора (БНК) магнетитовые суспензии обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин и смешивали с раствором HRP (M25-БНК и M90-БНК). Смесь инкубировали в шейкере при температуре 4 ° C в течение ночи. Свободные молекулы фермента были удалены с помощью колонок ультрацентрифугирования.

Активность HRP контролировали хромогенным фенол/ 4-аминоантипирин анализом, в результате которого образовывались феноксильные радикалы, которые легко вступают в реакцию с аминопирином, образуя краситель розового цвета хинонимин.

Максимальная скорость окисления фенола наблюдалась для нативной HRP и БНК с использованием H_2O_2 в миллимолярном диапазоне, в то время как при применении просто наночастиц требуются молярные концентрации H_2O_2 . Тем не менее, пик скорости с использованием M90-БНК произошел при больших концентрациях H_2O_2 , чем для M25-БНК и нативной HRP. Это может быть связано с игибированием нативного фермента высокими концентрациями субстрата. Активность M90-БНК была дополнительно исследована при различных значениях pH и температурах. Увеличение активности M90-БНК наблюдалось неорганических и органических буферах (фосфатный буфер, малонат натрия и тартрат натрия буферы) и во всем диапазоне температур эксперимента. БНК были более эффективными при низких температурах, чем нативная HRP, так нативный фермент имел более высокую скорость при высоких температурах.

В работе [70] HRP иммобилизовывали на амин функциональные магнитные наночастицы для синтеза хиральных вицинальных диолов из рацемических эпоксидов. Магнитные наночастицы были получены так же методом соосаждения Fe^{+2} и Fe^{+3} в щелочных условиях. Затем полученные частицы Fe_3O_4 обрабатывали тетаэтилортосиликатом, (3-аминопропил)триэтоксисиланом, глутаровым альдегидом и HRP. В синтезе хиральных вицинальных диолов, используя иммобилизованные ферменты, была достигнута максимальная конверсия 42 % и выход 80 %, в то время как при использовании нативного фермента максимальный выход составлял 74 %. При повторном использовании иммобилизованных ферментов их активность снижалась на 5-10 % после каждого рецикла. Авторы предлагают использование такой методики иммобилизации ферментов в крупномасштабных реакциях для синтеза хиральных спиртов.

2 МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ

2.1 Используемые реактивы

Сведения об использованных реагентах представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Список использованных реагентов

№	Реактив	Формула	Сведения
Фермент			
1	Пероксидаза корня хрена (<i>Horseradish Peroxidase</i>)		Великобритания, RZ > 2.0, акт. > 150 ед/мг, обессол., лиофил. порошок
Носители			
2	Оксид алюминия	$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	«Реахим»
3	Оксид кремния	SiO_2	«Реахим»
Магнитные наночастицы			
4	Хлорид железа (III) 6-водный	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	«НПФ Химмедсервис», ГОСТ 4147-74, ч
5	Сульфат железа (II) 7-водный	$\text{Fe}_3\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	«Нева реактив», ч.д.а.
6	Гидроксид натрия	NaOH	«Нева реактив», 98 %, ГОСТ 4328-77, ч.д.а.
7	Азот	N_2	ГОСТ 92-93-68, 99%
8	Этиленгликоль	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$	«Компонент-реактив», ГОСТ 10164-75, ч.д.а.
9	1,2-пропиленгликоль	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$	«НПФ Химмедсервис», ч., ТУ 6-09-2431-81
10	Мочевина	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	«Индикатор», ГОСТ 6691-77, ч.д.а.
11	Янтарная кислота	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	«Марбиофарм», ч.д.а.

		COOH	
Модификаторы			
12	Полистиролсульфонат натрия		«SIGMA-ALDRICH», США
13	Хитозан кислоторастворимый		ЗАО «Биопрогресс», степень диацетилирования 75 – 80 %
14	3-аминопропилтретоксисилан	$C_6H_{17}NO_3Si$	«SIGMA-ALDRICH», >98 %
Сшивающие агенты			
15	Глутаровый диальдегид		«Fluka», Швейцария
Субстраты			
16	2,3,6-триметилфенол	$C_9H_{12}O$	«SIGMA-ALDRICH», 95 %
17	Пероксид водорода	H_2O_2	«Купавнареактив», 50 %
Растворители			
18	Дистиллированная вода	H_2O	-
19	Фосфатный буфер		pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.4
20	Этанол	C_2H_5OH	«Медхимпром», 95 %
Хроматографический анализ			
21	Ацетонитрил	CH_3CN	«Panreac», E.U.
22	Бидистиллят	H_2O	-
23	2,3,5-триметилгидрохинон	$C_9H_{12}O_2$	«SIGMA-ALDRICH», 97 %
Исследование поверхностных характеристик			
24	Азот	N_2	ГОСТ 92-93-68, 99%
25	Этанол	C_2H_5OH	«Медхимпром», 95 %
ИК-Фурье-спектроскопия			
26	Бромид калия	KBr	Ч.д.а.

2.2 Методика приготовления биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на SiO_2 , Al_2O_3

Образцы носителя Al_2O_3 и SiO_2 массой по 1 г прокаливали при $300\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3 ч, после чего проводили модификацию их поверхности. Для этого Al_2O_3 или SiO_2 вводили в раствор полистиролсульфонат натрия (ПСС) (объем - 10 мл, концентрация, г/л: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75), перемешивали в течение 60 мин, отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до pH 7 и сушили под вакуумом при $60\text{ }^\circ\text{C}$ (24 ч). Затем модифицированные носители покрывались полиэлектролитным комплексом, содержащим легкодоступные аминогруппы, которые могут использоваться для межмолекулярного поперечного связывания с HRP. Поэтому, следующий этап модификации – обработка образцов раствором хитозана (0.1, 0.15, 0.2, 0.25 г/л) в 50 мл 0.01 М уксусной кислоте при перемешивании в течение 60 мин с последующим фильтрованием, отмывкой дистиллированной водой и высушиванием под вакуумом при $60\text{ }^\circ\text{C}$. Для прочного связывания фермента с носителем полученные образцы (1 г) обрабатывали раствором глутарового диальдегида (объем - 50 мл, концентрацию варьировали от 0.1 до 0.4 г/л) при перемешивании в течение 60 мин.

Применение хитозана обусловлено наличием у него аминогрупп, позволяют использовать его при ковалентной иммобилизации ферментов.

Применение глутарового диальдегида в качестве сшивающего агента объясняется его способностью образовывать азометиновую связь ($-\text{CH}=\text{N}-$) в реакции диальдегида с аминогруппами фермента и хитозана, присоединенного к поверхности носителя (рисунок 2.1) по донорно-акцепторному механизму:

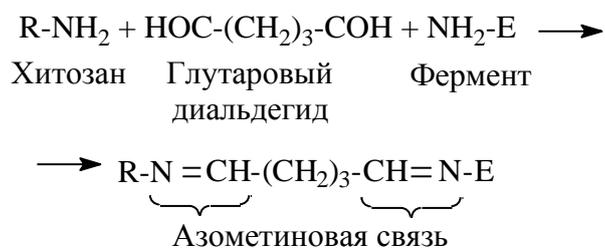


Рисунок 2.1 – Образование азометиновой связи

Легко и быстро образующиеся продукты конденсации – основания Шиффа – являются стабильными [71,72].

Подготовленный таким образом носитель помещали в раствор HRP (10 мл, 0.15 мг/мл), перемешивали, как и ранее, в течение 60 мин, полученный образец биокатализатора отфильтровывали, промывали и сушили при 25 °С под вакуумом.

Схематически стадии синтеза биокатализаторов показаны на рисунке 2.2.

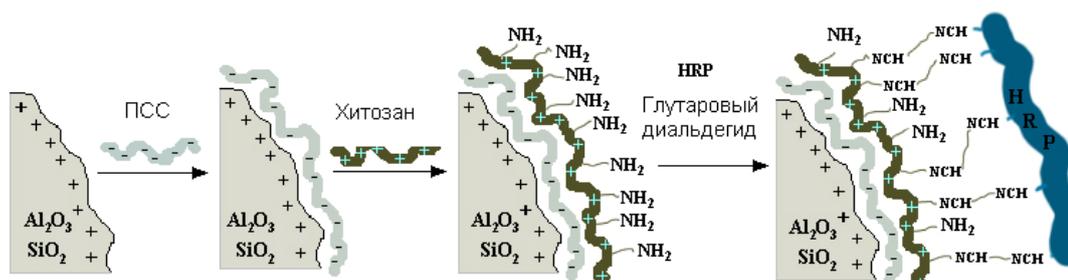


Рисунок 2.2 – Схема синтеза биокатализаторов на основе пероксидазы, иммобилизованной на неорганические носители Al₂O₃ и SiO₂

В результате такого способа иммобилизации HRP, были получены следующие биокатализаторы: Al₂O₃/ПСС/Хит/Глут/HRP и SiO₂/ПСС/Хит/Глут/HRP.

2.3 Методика приготовления биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на магнитные наночастицы

2.3.1 Методика синтеза магнитных наночастиц

Среди различных способов синтеза магнитных наночастиц для сравнения были выбраны два способа их получения – метод соосаждения и полиольный процесс.

2.3.1.1 Метод соосаждения

Метод соосаждения является одним из самых распространенных способов получения магнитных наночастиц. Наночастицы Fe_3O_4 синтезировали путем осаждения Fe^{2+} и Fe^{3+} в щелочной среде, в атмосфере азота при 25°C [69]. Кислый раствор (25 мл) смеси солей железа (2.8 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 5.2 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) добавляли по каплям к раствору NaOH (250 мл, 1.5 М) при постоянном перемешивании. Полученный черный осадок Fe_3O_4 отделяли от реакционной среды, промывали водой до нейтрального значения pH. Все операции по отделению магнитных частиц от раствора проводили с помощью неодимового магнита. Наночастицы оксида железа получают согласно реакции:



Метод соосаждения является простым в исполнении. Для обеспечения коагуляционной устойчивости наночастиц, синтезированных по данному методу необходимо использовать стабилизаторы, которые хорошо бы растворялись в дисперсионной среде и содержали бы функциональные группы (-OH, -COOH, -NH₂) [73]. В данном диссертационном исследовании в качестве стабилизатора использовали цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0.05 мг/мл). $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ имеет две свободные карбоксильные группы и одну гидроксильную, обеспечивая тем самым химическое взаимодействие с

поверхностью магнитной наночастицы, обладающей активными центрами (Fe^{2+} , 2Fe^{3+} , OH^- , O^{2-}). К синтезированным по методу соосаждения наночастицам добавляли 50 мл водного раствора $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (0.05 мг/мл), полученный раствор обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин., перемешивали в течение 4 ч, после чего суспензию промывали водой до нейтрального значения pH.

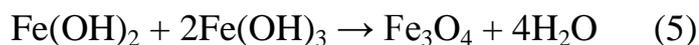
2.3.1.2 Полиольный метод

Преимуществами полиольного процесса является легкость в исполнении и то, что полученные частицы Fe_3O_4 характеризуются высокой намагниченностью [48].

Для получения магнитных наночастиц полиольным методом исследовалось два растворителя: этиленгликоль и 1,2-пропиленгликоль. В химическом стакане были полностью растворены в 30 мл этиленгликоля (1,2-пропиленгликоля): $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 ммоль), янтарная кислота (1 ммоль) и мочевины (30 ммоль) при энергичном перемешивании магнитной мешалкой (30 мин.). Полученный раствор переносился в тefлоновый стакан (объемом 50 мл) автоклава из нержавеющей стали (Part Instr.) и выдерживался при 200 °C от 2 до 4 часов. После охлаждения до комнатной температуры, магнитом отделялся черный осадок, который промывался этанолом несколько раз до прозрачного раствора. Затем высушивался под вакуумом при 60 °C в течение 6 часов.

В этом процессе, полиол выступает в качестве растворителя и восстанавливающего агента, соль трехвалентного железа используется в качестве источника железа, янтарная кислота является катализатором и мочевины обеспечивает гидроксильный ион. Химизм процесса выражается следующими уравнениями реакций:





Образование наномангнитных кластеров можно разделить на два этапа. Первый заключается в формировании предшественника оксида железа, зарождение оксида железа и самосборка частиц. Вторым этапом является созревание по Отсвальду [48]. Одиночные кристаллы, обладая высокой поверхностной энергией, стремятся объединиться вместе, образуя тем самым сферические структуры. Центральный кристалл, обладая стабильной молекулярной сборкой, не позволяет кластеру развалиться. Крупные структуры обладают меньшей поверхностной энергией, в результате чего вторичная структура не разрушается [74]. Схематически рост наночастиц в полиольном процессе представлен на рисунке 2.3).

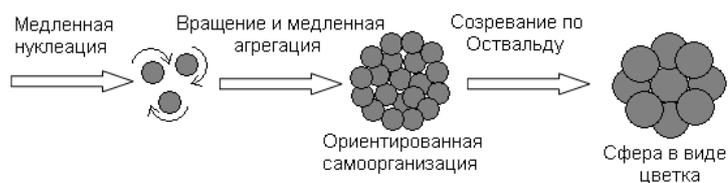


Рисунок 2.3 – Морфология роста наночастиц в полиольном процессе

2.3.2 Модификация поверхности магнитных наночастиц

Наночастицы Fe_3O_4 способны адсорбировать ионы и молекулы в растворе из-за большого количества свободных связей на их поверхности. Наночастицы, диспергированные в нейтральном водном растворе имеют атомы Fe и O, способные адсорбировать группы OH- и H- соответственно, в результате чего поверхность наночастиц обильно покрывается OH- группами [68]. В свою очередь группа OH- способна взаимодействовать с АПТС (рисунок 2.4).

Для модификации магнитных наночастиц АПТС к их 25 мл коллоидного этанольного раствора приливали 150 мл этанола и 1 мл воды,

т.к. реакция конденсации АПТС эффективнее будет проходить в полярном растворителе [75]. К полученной смеси добавляли АПТС разной концентрации (1; 2; 3 мкл/мл). Раствор перемешивали в течение 5 часов на магнитной мешалке. Затем раствор промывался 5 раз этанолом и 5 раз дистиллированной водой. Обработанные АПТС наночастицы хранились для дальнейшего использования в воде.

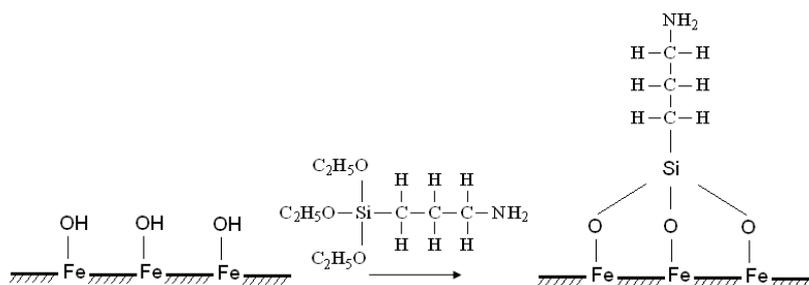


Рисунок 2.4 – Процесс взаимодействия поверхности наночастицы с АПТС

2.3.3 Иммобилизация пероксидазы на магнитные наночастицы

HRP была ковалентно иммобилизована на предварительно модифицированные магнитные наночастицы Fe_3O_4 . Отмытые дистиллированной водой магнитные наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}$ обрабатывались раствором HRP (0.10; 0.15; 0.20 мг/мл). Смесь перемешивали при температуре 4°C в течение 6 часов. На рисунке 2.5 дано схематическое изображение химической структуры биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на магнитные наночастицы.

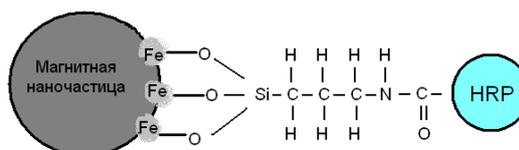


Рисунок 2.5 – Схематическое изображение химической структуры биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на магнитные наночастицы

В результате такого способа иммобилизации был получен следующий биокатализатор: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$.

2.4 Методика проведения процесса окисления 2,3,6-триметилфенола

Процесс окисления ТМФ осуществлялся по схеме, представленной на рисунке 2.6.

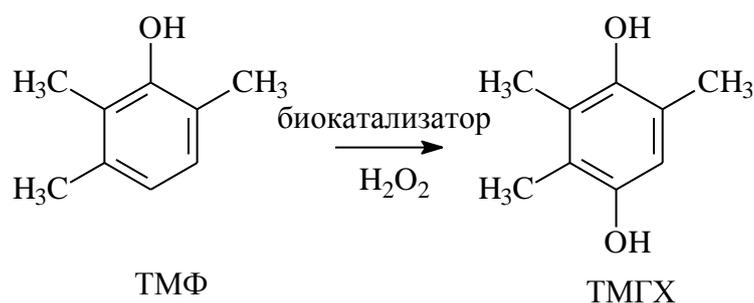
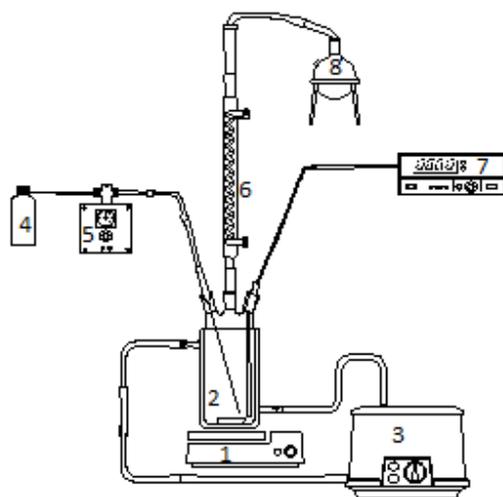


Рисунок 2.6 – Уравнение реакции процесса окисления ТМФ

Окисление ТМФ проводили в стеклянном реакторе, снабженном мешалкой и рубашкой для обогрева (рисунок 2.7). В ходе проведения реакции контролировали температуру и концентрации субстрата и пероксида водорода. Частота вращения мешалки составляла 800 об/мин, что исключало влияние внешнего диффузионного торможения. Суспензию катализатора (0.1 г) и этанольный раствор субстрата (30 мл) помещали в реактор (2). Реакцию проводили при перемешивании в термостатируемых условиях. В ходе реакции дискретно добавляли пероксид водорода в количестве, эквивалентном содержанию субстрата, для предотвращения субстратного ингибирования. Для поддержания постоянного значения рН среды в реакционную смесь добавляли фосфатный буфер. Через определенные промежутки времени отбирали пробы реакционной смеси. После проведения эксперимента биокатализатор отделяли фильтрацией (для $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$ и $\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$). При использовании $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$ биокатализатор отделяли неодимовым магнитом.



1 - Магнитное перемешивающее устройство; 2- стеклянный реактор (ячейка); 3 – термостат; 4 –емкость с перекисью водорода; 5 - HPLC-насос; 6 – холодильник; 7 - рН-метр; 8 – сборник для конденсата

Рисунок 2.7 – Схема установки для проведения процесса окисления ТМФ

2.5 Методика анализа реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Анализ реакционной смеси проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В ходе анализа использовали ВЭЖХ установку Ultimate 3000 (Dionex), оборудованную ультрафиолетовым датчиком, масспектрометром – API-2000 (Applied Biosystems), аналитической колонкой Luna C18 (7 мкм) с теоретическим числом тарелок 40000 и размером 150×4 мм. Раствор ацетонитрил : вода в соотношении 50:50 использовался в качестве мобильной фазы. Расход элюента – 0.5 мл/мин при 7 МПа и 30 °С. Детектирование осуществлялось УФ детектором на длине волны 254 нм. Дополнительные продукты и промежуточные продукты реакции не были обнаружены в реакционной смеси, что может быть объяснено высокой субстратной специфичностью HRP.

В качестве детектора использовался квадрупольный хроматомасс-спектрометр API 2000 (Канада). Для анализа применялся режим сканирования в области 100-200 а.е.м., для ионизации ионов использовалось электрораспыление. Был получен сигнал из двух молекулярных ионов, первый отвечал 2,3,6-триметилфенолу, второй 2,3,5-триметилгидрохинону (Рисунок 2.8).

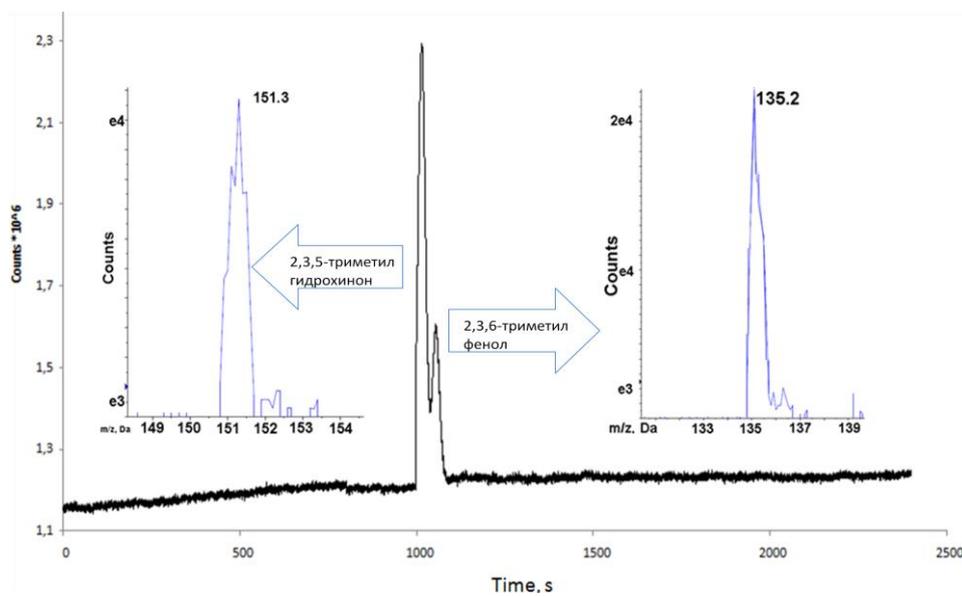


Рисунок 2.8 – Хроматограмма и масс-спектр молекулярных ионов ТМФ и ТМГХ

2.6 Методика расчета кинетических и термодинамических параметров

Максимальную скорость V_{\max} и константу Михаэлиса K_m определяли, используя различные начальные концентрации субстрата, поскольку ферментативная реакция наиболее полно характеризуется в начальный момент времени, пока не происходит ингибирование продуктом реакции [35]. Уравнение Михаэлиса – Ментен (2.1) преобразовывалось в такую форму, что графически оно выражалось прямой (2.2).

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2.1)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (2.2)$$

где V – начальная скорость реакции, V_{\max} - максимальная скорость реакции при бесконечно большой концентрации субстрата; K_M - константа Михаэлиса; $[S]$ – начальная концентрация субстрата.

Уравнение (2.2) получило название – уравнение Лайнувера – Берка (метод двойных обратных координат).

Строится график зависимости $1/V$ от $1/[S]$. Полученная прямая на пересечении с осью ординат дает $1/V_{\max}$. А с осью абсцисс – минус $1/K_M$. Угол наклона - K_M/V_{\max} .

За единицу активности биокатализатора принимали количество биокатализатора, которое катализирует 1 мг ТМГХ из ТМФ в течение 20 секунд при 40 °С.

Расчет термодинамических параметров осуществлялся с помощью теории активных комплексов, которая детально рассматривает процесс химического превращения [76]. Особое внимание уделяется состоянию реагирующих молекул, которые являются промежуточными в ходе такого превращения. В теории активных комплексов вводятся величины энтропии и энтальпии активации – ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger , которые равны энтропии и энтальпии перехода реагентов к активному комплексу. Эти величины можно определить, используя уравнение Эйринга (2.3):

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\Delta S^\ddagger / R} e^{-\Delta H^\ddagger / RT} \quad (2.3)$$

где k – константа скорости, k_B – постоянная Больцмана, h – постоянная Планка.

Это уравнение удобно преобразовать в логарифмическую форму (2.4):

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \Delta H^\ddagger / RT \quad (2.4)$$

Строят зависимость $\ln(k/T)$ от $1/T$ и получают прямую, наклон которой равен $-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$. Точка пересечения с осью ординат $-\Delta S^\ddagger$.

2.7 Физико-химические методы исследования образцов биокатализаторов

2.7.1 Просвечивающая электронная микроскопия образцов биокатализаторов

Анализ образцов биокатализаторов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) был выполнен на химическом факультете университета Индианы (США) на приборе JEOL JEM1010. Образцы подготавливались методом микросреза. Магнитные наночастицы обрабатывались эпоксидной смолой, после чего производился срез толщиной 50 нм. Затем проводился анализ при ускоряющем напряжении электронной пушки 60 кВ. Размеры частиц рассчитывался с использованием пакета программ Scion Image.

2.7.2 Методика измерения намагниченности.

Измерения намагниченности выполнялись в Техническом университете Дармштадта, Германия методом вибрационного магнитометра в установке PPMS-14 фирмы Quantum Design. В работе вибрационного магнитометра использован индукционно-непрерывный метод, основанный на взаимодействии переменного магнитного поля колеблющегося образца с системой неподвижных катушек. При использовании компактной градиентометрической конфигурации измерительной катушки, относительно большой амплитуды колебаний (1-3 мм) и пиковой частоте 40 Гц, система способна разрешить изменения намагничивания меньше, чем 10^{-6} А м² со скоростью передачи данных 1 Гц.

Основной принцип работы для вибрационного магнитометра в том, что изменение магнитного потока будет индуцировать напряжение в

измерительной катушке. В зависимости от времени индуцированное напряжение задается следующим уравнением (2.5):

$$V_{\text{катушк.}} = \frac{d\Phi}{dt} = \left(\frac{d\Phi}{dz} \right) \left(\frac{dz}{dt} \right) \quad (2.5)$$

В уравнении (2.5), Φ является магнитным потоком, проходящим через поперечное сечение измерительной катушки, z - вертикальное положение образца по отношению к катушке, и t - время. Для синусоидально-колеблющегося образца, напряжение, индуцированное внутри катушек, равно (2.6):

$$V_{\text{катуш.}} = 2\pi f C m A \sin(2\pi f t) \quad (2.6)$$

В уравнении (2.6), C является константой связи, m - магнитный момент образца, A - амплитуда колебаний, и f - частота колебаний. Определение магнитного момента заключается в измерении коэффициента отклика синусоидального напряжения в измерительной катушке.

2.7.3 Исследование образцов биокатализаторов методом инфракрасная спектроскопия

Изучение структуры многокомпонентных биокатализаторов проводилось с использованием ИК-Фурье спектрофотометра IR Prestige 21 в институте нано и биотехнологий Тверского государственного технического университета. ИК-Фурье спектрофотометр снабжен приставкой диффузного отражения, позволяющей анализировать неоднородные образцы с высокой точностью в спектральном диапазоне $350\text{-}7800\text{ см}^{-1}$.

Высокая чувствительность обеспечивалась за счет специального керамического источника излучения, интерферометра с позолоченными зеркалами и термостабилизированного детектора DLATGS для средней инфракрасной области. Переключение рабочих областей инфракрасного излучения (NIR – MIR – FIR) осуществлялось путем установки программно –

распознаваемых светодетекторов с автоматической сменой источников излучения и детекторов.

Для анализа многокомпонентных образцов биокатализаторов использовали ИК-Фурье спектрометр, снабженный интерферометром Майкельсона со смежным углом в 30 градусов с электромагнитным приводом и цифровой динамической юстировкой; оптической однолучевой системой; германиевым покрытием KBr пластин в средней области ИК-спектра; высокоинтенсивным керамическим источником излучения для Middle/Far IR; галогеновой лампой.

В качестве фонового спектра применяли спектр образца KBr, измельченного до фракции менее 2 мкм.

Спектры регистрировались в диапазоне 250-4000 см^{-1} с шагом 4 см^{-1} .

2.7.4 Рентгенофотоэлектронная спектроскопия образцов биокатализаторов

РФЭС представляет особую важность для биокатализа, поскольку является поверхностно чувствительным методом [77,78]. РФЭ спектры позволяют определить химические сдвиги аналитических подуровней элементов и концентрации атомов на поверхности.

Методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) образцов биокатализаторов на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы был установлен качественный состав поверхности и определено валентное состояние металла.

Измерения проводились с помощью спектрометра ЭС 2403 М-Т СКБ АП РАН оснащенного анализатором энергий RHOIBOS 100-5MCD (SPECS, Германия) и источника рентгеновских лучей XR-50 (SPECS, Германия) в институте нано и биотехнологий Тверского государственного технического университета. Для фотоэлектронного возбуждения использовалось характеристическое Mg K α излучение ($h\nu = 1253.6$ эВ). Мощность источника

излучения 250 Вт. Для компенсации статической зарядки образца, которая происходит в диэлектриках из-за медленного возмещения потери части электронов вызываемой рентгеновскими лучами, была применена низковольтная электронная пушка. Спектры записаны при давлении $2 \cdot 10^{-6}$ Па с предварительно дегазированных в сверхвысоком вакууме образцов [77-79]. В качестве референтного пика был использован пик C 1s (285.0 эВ). Обзорные спектры регистрировались в диапазоне 1100-0 эВ с шагом по энергии 0.5 эВ при энергии пропускания анализатора 80 эВ. Спектры высокого разрешения регистрировались с шагом по энергии 0.05 эВ при энергии пропускания анализатора 7 эВ, что соответствует ПШВП стандарта Ag 3d_{5/2} 0.85 эВ. Обработка спектров проводилась с применением программного пакета CasaXPS.

По данному методу измеряется кинетическая энергия электронов выбитых из образца под действием рентгеновских лучей определенной энергии. РФЭ спектры - графики зависимости интенсивности потока эмитированных электронов от энергии связи этих электронов в образце, рассчитанных по классической формуле (2.7):

$$E_{\text{св}} = h\nu - E_{\text{кин}} + \phi, \text{ где} \quad (2.7)$$

$E_{\text{св}}$ – энергия связи электрона на энергетическом подуровне;

$E_{\text{кин}}$ – кинетическая энергия электрона;

$h\nu$ – энергия рентгеновского кванта;

ϕ – работа выхода материала спектрометра.

2.7.5 Методика определения удельной поверхности и пористости методом низкотемпературной адсорбции азота

Методом низкотемпературной адсорбции азота проводились измерения удельной поверхности и пористости в институте нано и биотехнологий Тверского государственного технического университета.

Измерения осуществлялись на приборах:

1. Анализатор площади поверхности и распределения пор по размерам: BECMAN COULTER™ SA 3100™ (COULTER CORPORATION, Miami, Florida);

2. Прибор подготовки образцов: BECMAN COULTER™ SA-PREP™ (COULTER CORPORATION, Miami, Florida).

Образец помещался в предварительно взвешенную кварцевую кювету, которая устанавливалась в прибор подготовки образца SA-PREP™. Проба подготавливалась при следующих параметрах:

Температура	120 ⁰ С;
Газ	азот;
Время подготовки	60 мин.

После завершения пробоподготовки кювета охлаждалась, взвешивалась и переносилась в аналитический порт прибора BECMAN COULTER™ SA 3100™.

В ходе анализа применялись следующие модели: модель Ленгмюра, Брунауэра, Эммета и Теллера, t-график, Баррета, Джойнера и Халенду. Для расчета распределения пор было использовано уравнение Харкинса-Юра.

2.7.6 Исследование образцов биокатализаторов методом хемосорбции водорода

Для определения количества поверхностно активных атомов железа был проведен анализ магнитных наночастиц оксида железа до и после нанесения HRP методом пульсовой хемосорбции с использованием Chemosorb 310 (Micrometrics, USA). Измерения проводились в институте нано и биотехнологий Тверского государственного технического университета. Для проведения анализа в кварцевую кювету помещали 0,2 г исследуемого образца, после чего образец продували аргоном в течении 12

часов. После стабилизации сигнала катарометра в кювету подавались аликвоты водорода по 5 мл в течение 15 раз.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Синтез и характеристики биокатализаторов на основе Fe_3O_4 , SiO_2 и Al_2O_3

3.1.1 Получение и выбор эффективного носителя на основе Fe_3O_4 . Результаты просвечивающей электронной микроскопии и магнитные характеристики образцов биокатализаторов на основе Fe_3O_4

В результате использования ПЭМ были получены микрофотографии синтезированных наночастиц Fe_3O_4 . На рисунке 3.1 представлены микрофотографии магнитных наночастиц Fe_3O_4 , полученных методом соосаждения (рисунок 3.1 а) и полиольным способом с использованием этиленгликоля (рисунок 3.1 б) и 1,2-пропиленгликоля (рисунок 3.1 в).

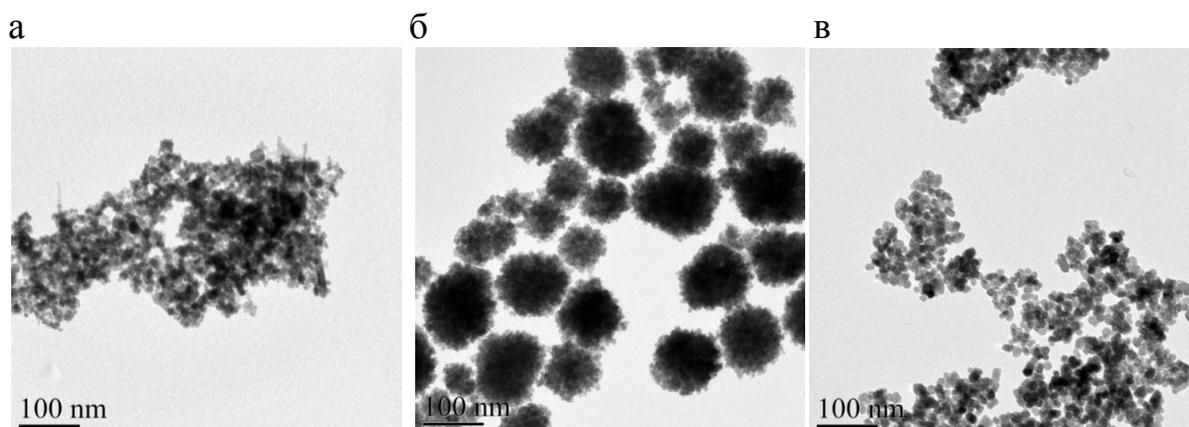


Рисунок 3.1 – Микрофотографии синтезированных наночастиц Fe_3O_4 , полученных: а) методом соосаждения, б) полиольным методом с использованием этиленгликоля, в) полиольным методом с использованием 1,2-пропиленгликоля.

Микрофотография (рисунок 3.1 а) показывает, что наночастицы синтезированные путем метода соосаждения имеют зернистую неоднородность. Наночастицы, синтезированные полиольным методом с использованием этиленгликоля (рисунок 3.1 б), образовывали крупные

кластеры со средним диаметром 111 ± 5 нм в форме близкой к сферической, состоящей из множества небольших наночастиц. При использовании 1,2-пропиленгликоля (рисунок 3.1 в) в качестве растворителя было получено множество отдельных наночастиц. Для экспериментов в качестве носителя для фермента были выбраны наночастицы Fe_3O_4 , синтезированные полиольным методом с использованием этиленгликоля в качестве растворителя.

На рисунке 3.2 показаны микрофотографии наночастиц Fe_3O_4 , полученных полиольным методом с использованием этиленгликоля за разное время проведения синтеза.

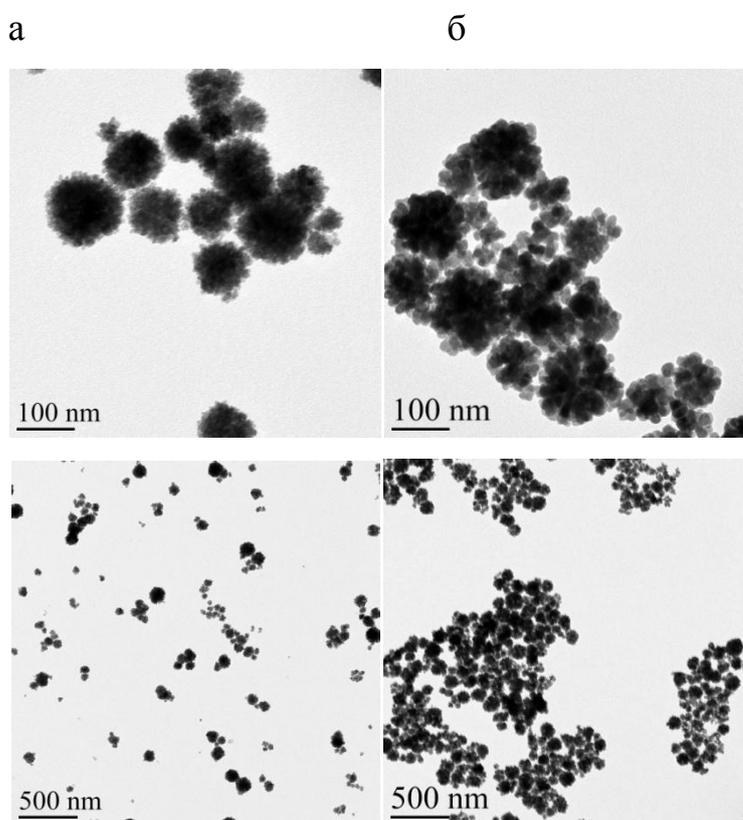


Рисунок 3.2 - Микрофотографии синтезированных наночастиц Fe_3O_4 полиольным методом с использованием этиленгликоля в качестве растворителя за: а) 2 часа; б) 4 часа

Через 2 часа проведения процесса образовывалось много наночастиц Fe_3O_4 небольшого размера (около 7 нм), которые сосуществовали с более крупными кластерами порядка 110 нм (рисунок 3.2 а). Через 4 часа все

наночастицы объединялись в кластеры со средним диаметром около 140 нм, переходя из компактной структуры в «цветок-подобную» (рисунок 3.2 б). После формирования наночастиц Fe_3O_4 в полиоле, они самопроизвольно собираются в кластеры из-за их высокой поверхностной энергии. Скомбинированные друг с другом наночастицы Fe_3O_4 становятся наиболее стабильными в растворе. Используя этиленгликоль в качестве растворителя, наночастицы оксида железа имеют достаточно времени, чтобы повернуться и связаться с соседними наночастицами под надлежащим углом, что приводит к более правильной их расстановке. Большинство наночастиц Fe_3O_4 в кластере разделяется одинаковыми ориентациями кристалла и менее неправильной расстановкой между наночастицами, что приводит к небольшой поверхностной энергии. Когда происходит созревание Оствальда, то неровные наночастицы в кластере исчезают, но большинство из наночастиц с одинаковой ориентацией достаточно стабильно, чтобы выдерживать тепловую флуктуацию. Между тем, мелкие наночастицы, которые выравниваются с одинаковой ориентацией постепенно интегрируют в более крупную мезокристаллическую частицу. Вторичная структура остается неизменной, даже если первичные наночастицы вырастают выше 30 нм в кластере [48]. Наночастицы Fe_3O_4 , синтезированные полиольным методом с использованием этиленгликоля в течение 4 часов были выбраны в качестве носителя для фермента, т.к. и их морфология является более регулярной, представляя собой правильно сформированную сферу. Кроме того были исследованы магнитные характеристики наночастиц Fe_3O_4 .

Магнитные наночастицы Fe_3O_4 с размерами до 200 нм обладают суперпарамагнитными свойствами. Для определения степени взаимодействия частиц с магнитным полем используют кривые намагничивания [80]. Кривая намагничивания синтезируемых биокатализаторов представленная, как зависимость удельной намагниченности M магнитных наночастиц Fe_3O_4 от величины магнитного поля H (при комнатной температуре) показана на рисунке 3.3.

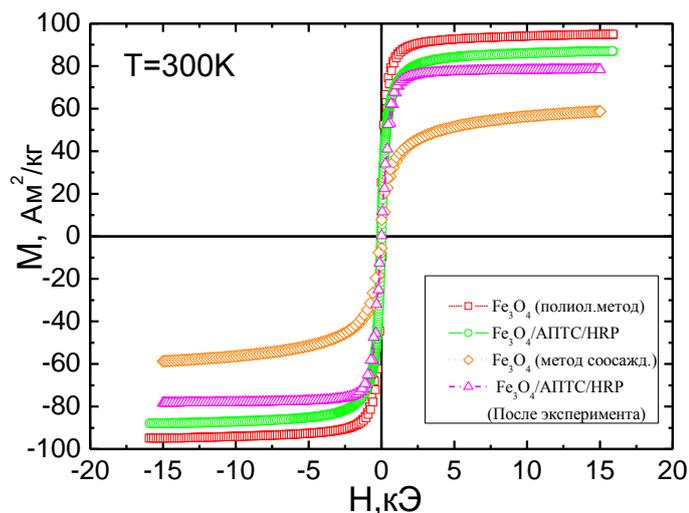


Рисунок 3.3 – Зависимость удельной намагниченности M магнитных наночастиц Fe_3O_4 от величины магнитного поля H ($T = 300\text{ K}$)

Кривые намагничивания (рисунок 3.3) подтверждают, что полученные наночастицы Fe_3O_4 обладают суперпарамагнитными свойствами. Из рисунка 3.3 видно, что наночастицы Fe_3O_4 , подготовленные полиольным методом обладают большей намагниченностью ($92 \text{ Am}^2/\text{kg}$) по сравнению с наночастицами, синтезированными по методу соосаждения ($58 \text{ Am}^2/\text{kg}$). Наночастицы Fe_3O_4 , синтезированные полиольным способом, собираются в кластеры. С увеличением размеров кластеров увеличивается их намагниченность [48]. После нанесения HRP на оксид железа удельная намагниченность наночастиц уменьшилась до $83 \text{ Am}^2/\text{kg}$. После эксперимента удельная намагниченность биокатализатора уменьшилась до $75 \text{ Am}^2/\text{kg}$. Уменьшение удельной намагниченности может быть связано с уменьшением магнитной восприимчивости магнитных наночастиц [81].

Таким образом, в качестве носителя для фермента более предпочтительными оказались наночастицы Fe_3O_4 , синтезированные полиольным методом, т.к. намагниченность таких наночастиц выше, следовательно их легче отделять от реакционной среды.

На рисунке 3.4 представлены ПЭМ изображения наночастиц Fe_3O_4 обработанных АПТС, HRP и биокатализатора после эксперимента.

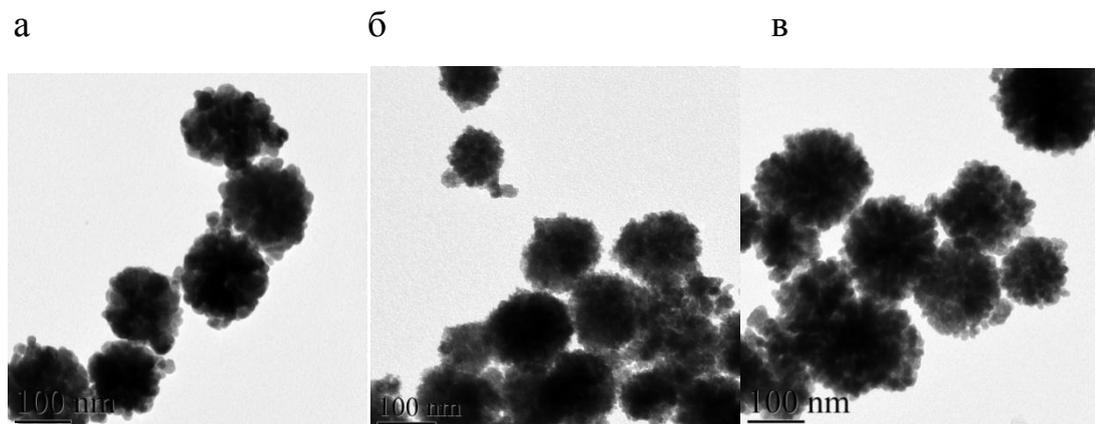


Рисунок 3.4 – Микрофотографии наночастиц Fe_3O_4 а) обработанных АПТС, б) обработанных HRP, в) биокатализатора после эксперимента

Как видно из рисунка 3.4, для образцов модифицированных АПТС и HRP значительного изменения морфологии не происходит. Средний диаметр наночастиц Fe_3O_4 , обработанных АПТС составляет около 142 нм, обработанных HRP – 163, после эксперимента – 187 нм. Увеличение размеров наночастиц Fe_3O_4 связано с адсорбцией химических реагентов на их поверхности.

Дополнительно была исследована удельная намагниченность полученных образцов биокатализаторов при температуре 40 °С (рисунок 3.5).

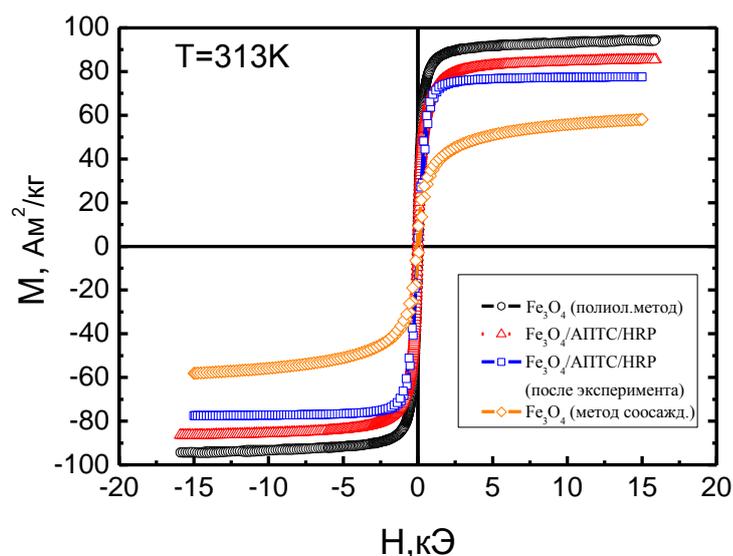


Рисунок 3.5 – Зависимость удельной намагниченности M магнитных наночастиц Fe_3O_4 от величины магнитного поля H ($T = 313\text{K}$)

Рисунок 3.5 показывает, что удельная намагниченность наночастиц снизилась незначительно при испытаниях при $40\text{ }^\circ\text{C}$. Для наночастиц Fe_3O_4 , синтезированных полиольным способом намагниченность была $90\text{ Am}^2/\text{kg}$, намагниченность наночастиц с HRP $81\text{ Am}^2/\text{kg}$, после эксперимента $73\text{ Am}^2/\text{kg}$, удельная намагниченность наночастиц, полученных методом соосаждения составляла $56\text{ Am}^2/\text{kg}$. Суперпарамагнитные свойства наночастиц сохраняются.

3.1.2 Синтез биокатализаторов на основе Fe_3O_4 , SiO_2 и Al_2O_3 и установление их структуры

3.1.2.1 ИК-Фурье спектроскопия и подбор оптимального состава для биокатализаторов на основе SiO_2 , Al_2O_3

Для изучения образования ковалентной сшивки фермента с носителями проводили исследование полученных образцов с помощью метода ИК Фурье спектроскопии диффузного отражения.

Первым образцом для изучения модификации поверхности носителя стал биокатализатор на основе HRP, иммобилизованной на SiO₂ (рисунок 3.6 и таблица 3.1).

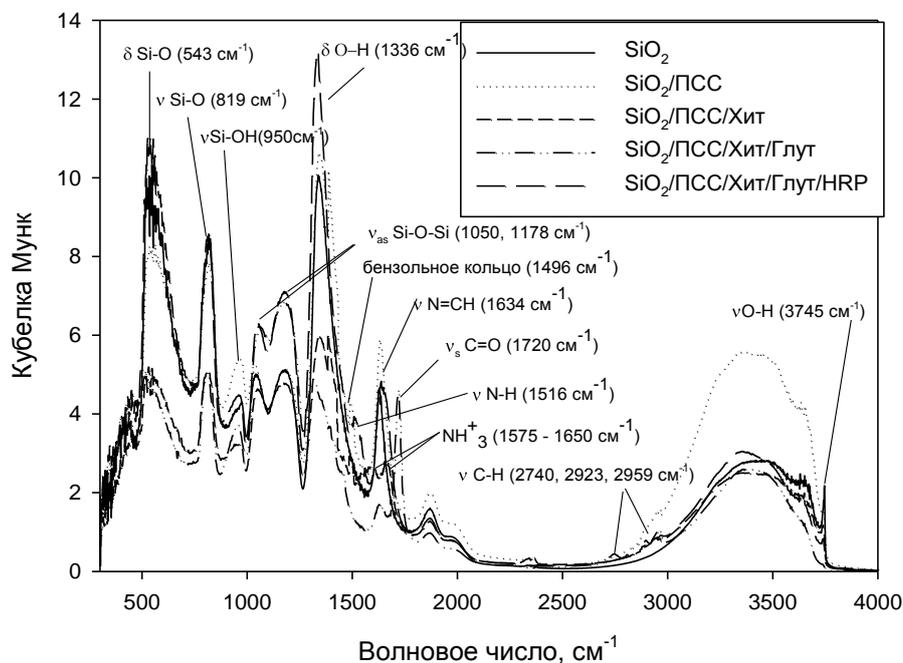


Рисунок 3.6 - Инфракрасные спектры образцов на основе HRP, иммобилизованной на SiO₂

Таблица 3.1 – Положение основных полос поглощения в ИК спектре для биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на SiO₂

Характеристическая группа	Частота колебаний, см ⁻¹		Тип колебаний
	Наблюдаемые данные		
	До иммоб.	После иммоб.	
О-Н	3745	3738	ν
О-Н	1336	1336	δ
Si-ОН	950	950	ν
Si-O-Si	1050, 1178	1050, 1178	ν _{as}
Si-O	819	819	ν

Si-O	543	543	δ
H ₂ O _{адс.}	1628	-	δ
C-H	-	2959	ν
N=CH	-	1634	ν
N-H	-	1516	δ (колебания NH ₃ ⁺)
-CO ₂ ⁻	-	1570	ν
Амид II	-	1559	$\delta_{\text{NH}^+} \nu_{\text{CN}}$

Для детального изучения ковалентной сшивки носителя с ферментом были дополнительно построены сравнительные графики на каждой стадии модификации носителя (рисунки 3.7 – 3.10).

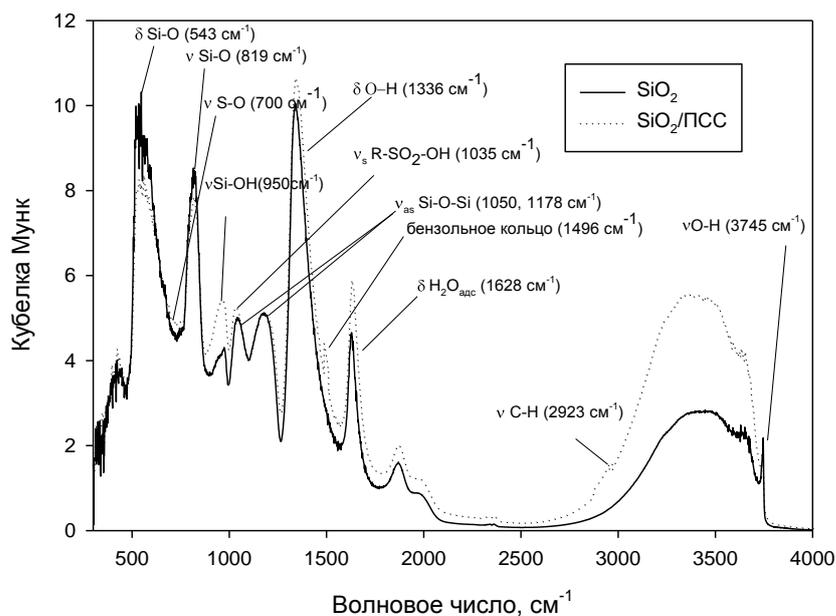


Рисунок 3.7 - Инфракрасные спектры SiO₂ и SiO₂/ПСС

ИК-спектроскопия (рисунок 3.7) показывает, что образец SiO₂ имеет характерные для него связи: ν O-H (3745 см⁻¹), широкая полоса в области 3000 – 3600 см⁻¹ также относится к ν O-H колебаниям, колебаниям связанной OH-группы соответствует полоса 1336 см⁻¹, ν_{as} Si-O-Si (1050, 1178 см⁻¹), ν Si-OH (валентные колебания OH относительно Si, 950 см⁻¹), ν Si-O (819 см⁻¹), δ Si-O (543 см⁻¹), полоса в области 1870 см⁻¹ относится к

комбинационным и обертонным колебаниям остова кремнезема [82-86]. После обработки этого образца ПСС, появились характерные для модифицирующего реагента полосы: ν C-H (2923 см^{-1}), бензольное кольцо (1496 см^{-1}), ν_s R-SO₂-OH (1035 см^{-1}), ν S-O (700 см^{-1}). Пики соответствующее ОН связям после обработки поверхности SiO₂, стали больше, следовательно, можно предположить, что обработка образца носителя дает увеличение количества ОН-групп. По ИК-спектрам (рисунок 3.7) можно сделать вывод, что ПСС не образует никаких химических связей с носителями или образует в незначительных количествах. Очевидно, он удерживается на поверхности носителя электростатическими силами.

Следующий этап – нанесение на поверхность SiO₂/ПСС хитозана (рисунок 3.8).

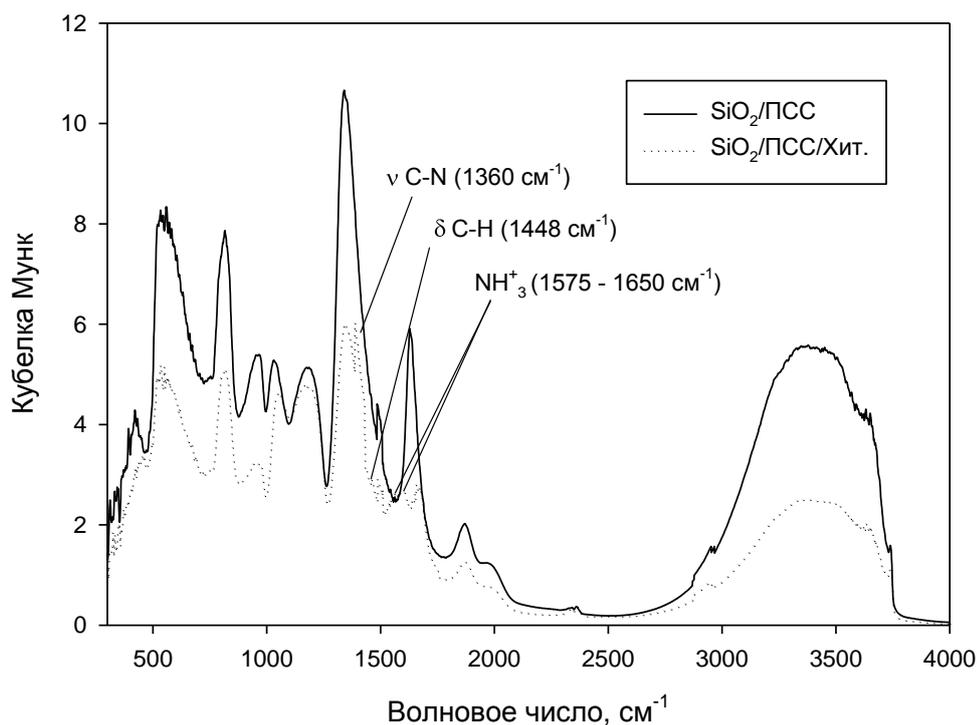


Рисунок 3.8 - Инфракрасные спектры SiO₂/ПСС и SiO₂/ПСС/Хит

Рисунок 3.8 показывает, что после обработки образца SiO₂/ПСС хитозаном, помимо полос идентифицирующих колебания первоначального образца образуются полосы, характерные для деформационных (в интервале

1575-1650 cm^{-1}) и валентных (3030-3130 cm^{-1}) колебаний NH_3^+ группы хитозана, δ C-H (1448 cm^{-1}) [87-88]. После обработки хитозаном поверхности SiO_2 наблюдается уменьшение полос, характерных для OH-групп.

Для прочного связывания фермента с носителем образец $\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}$ обрабатывали глутаровым диальдегидом (рисунок 3.9).

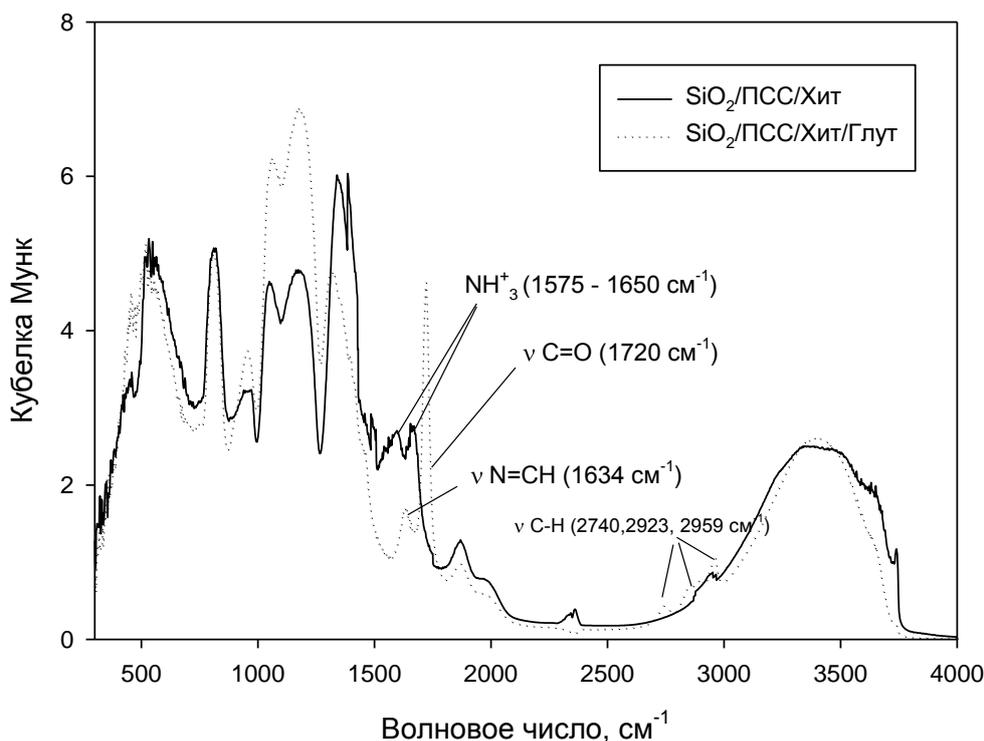


Рисунок 3.9 - Инфракрасные спектры $\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}$ и $\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}$

ИК-спектроскопия показывает (рисунок 3.9), что образец $\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}$ помимо характерных для него связей, описанных выше, имеет новую азометиновую связь $\nu\text{N}=\text{CH}$ (1634 cm^{-1}), за счет взаимодействия глутарового диальдегида с аминогруппами хитозана. В результате этого взаимодействия линии, характерные для деформационных колебаний NH_3^+ группы хитозана уменьшились. Так же образовались новые полосы, отвечающие за свободные карбонильные группы $\nu\text{C}=\text{O}$ (1720 cm^{-1}).

При использовании глутарового альдегида в качестве сшивающего агента фермент связывается с модифицированным носителем посредством

аминогрупп, что является более предпочтительным, т.к. аминогрупп больше, чем карбоксильных и поэтому связывание фермента с носителем прочнее.

После обработки поверхности носителя глутаровым диальдегидом проводили иммобилизацию HRP на модифицированную поверхность SiO₂ (рисунок 3.10).

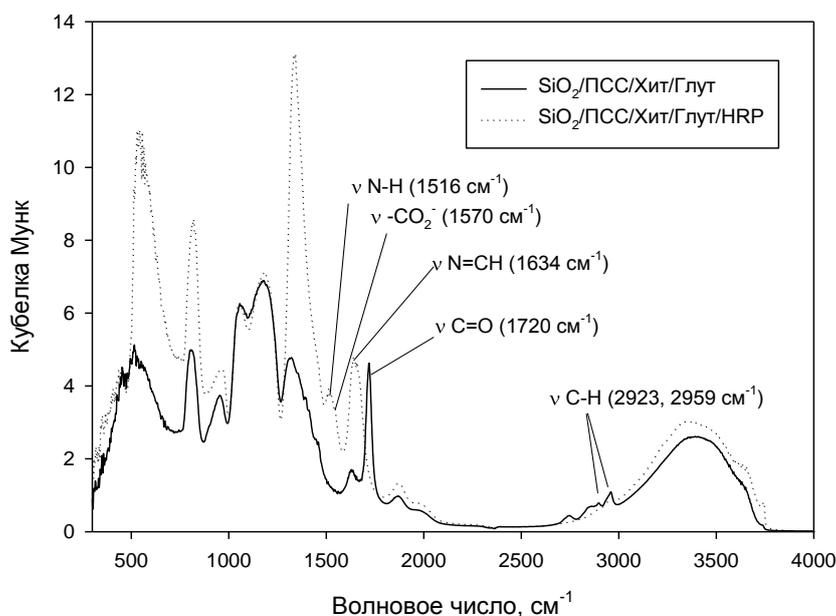


Рисунок 3.10 – Инфракрасные спектры SiO₂/ПСС/Хит/Глут и SiO₂/ПСС/Хит/Глут/HRP

Анализируя ИК-спектры биокатализатора на основе HRP, иммобилизованной на SiO₂ (рисунок 3.10), можно отметить, что полоса валентных колебаний альдегидной группы исчезла, что говорит о конверсии альдегидной группы в другую функциональную группу. При этом увеличилась интенсивность пика валентных колебаний $\nu\text{N}=\text{CH}$, на основании чего можно сделать вывод, что процесс сшивания фермента с поверхностью носителя посредством глутарового диальдегида прошел успешно. Белок ковалентно связался с носителем. Связи, указывающие на наличие фермента: $\delta\text{N}-\text{H}$ (1516 cm^{-1}), $\nu\text{-CO}_2^-$ (1570 cm^{-1}) и полоса Амид II, идентифицирующая пептидную связь за счет $\delta_{\text{NH}} + \nu_{\text{CN}}$ (1559 cm^{-1}) [88].

Следующий исследуемый образец – биокатализатор на основе HRP, иммобилизованной на Al_2O_3 (рисунок 3.11 и таблица 3.2).

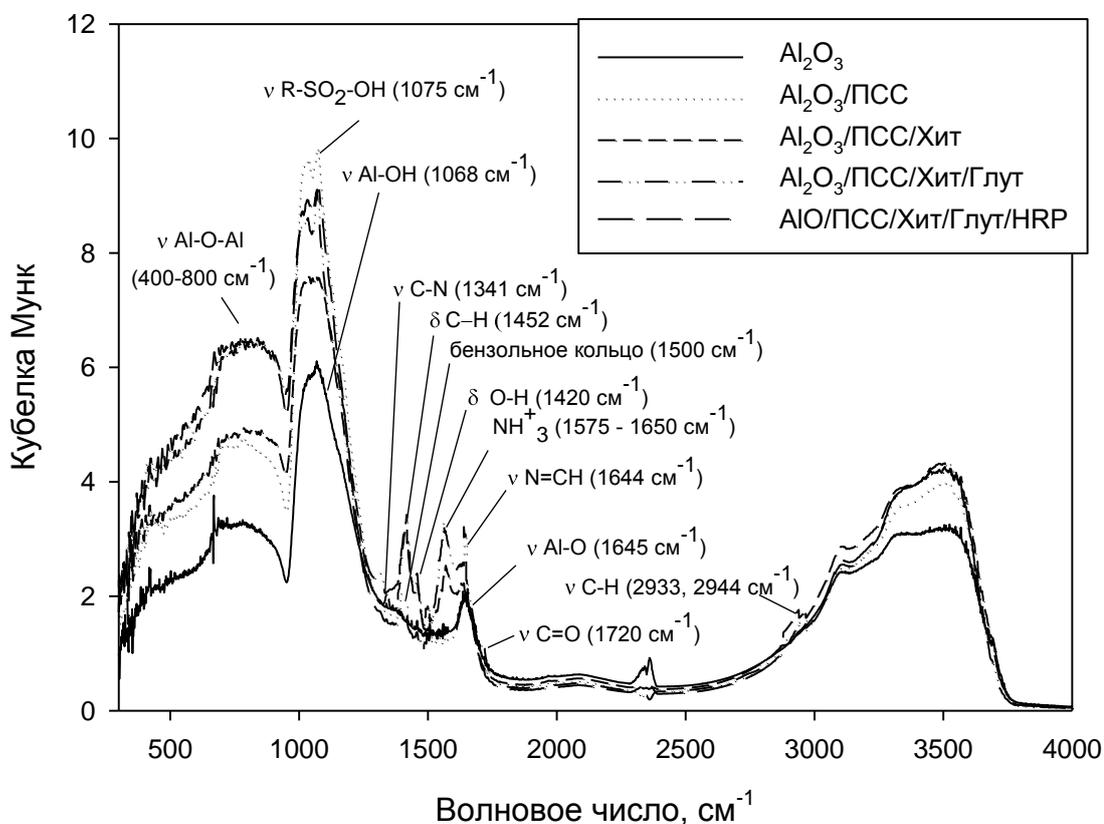


Рисунок 3.11 - Инфракрасные спектры образцов на основе HRP, иммобилизованной на Al_2O_3

Таблица 3.2 – Положение основных полос поглощения в ИК спектре для биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на Al_2O_3

Характеристическая группа	Частота колебаний, cm^{-1}		Тип колебаний
	Наблюдаемые данные		
	До иммоб.	После иммоб.	
О-Н	3518, 3107	3510, 3107	ν
Al-O-Al	400 – 800	400 – 800	ν
Al-O	1645	1645	ν
С-Н	-	2944	ν

N=CH	-	1644	ν
N-H	-	1509	δ (колебания NH_3^+)
$-\text{CO}_2^-$	-	1564	ν
NH_3^+	-	1405	Торсионные колебания
Амид II	-	1543	$\delta_{\text{NH}^+} \nu_{\text{CN}}$

С образцом на основе Al_2O_3 проводились аналогичные образцу на основе SiO_2 исследования ИК-спектров на каждой стадии модификации носителя (рисунки 3.12 – 3.15).

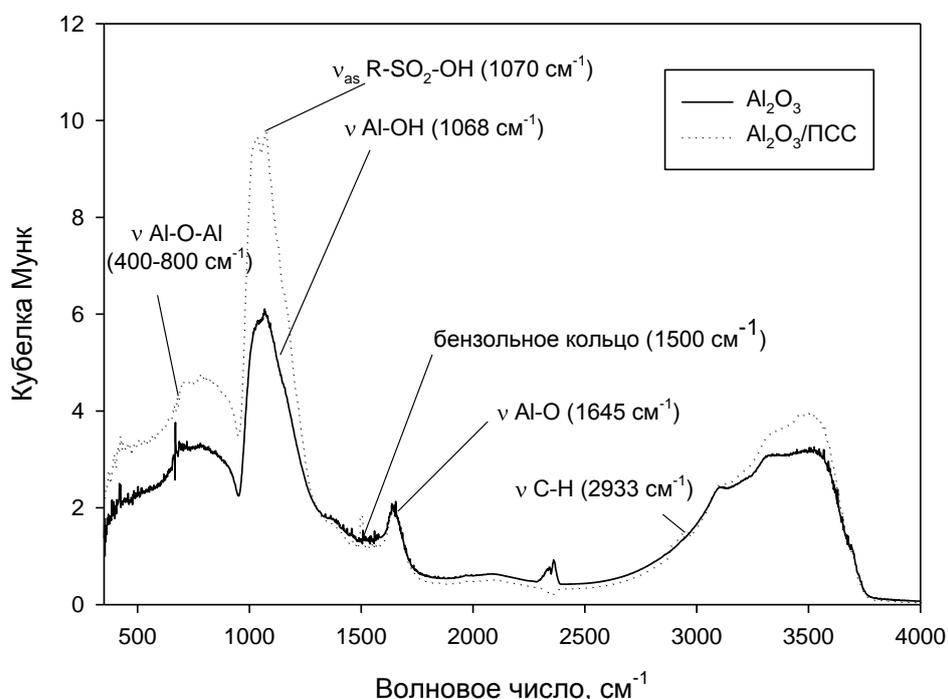


Рисунок 3.12 – Инфракрасные спектры Al_2O_3 и $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}$

Анализируя ИК-спектры образца Al_2O_3 (рисунок 3.12) четко видна характерная для ν Al-O-Al группа полос ($400 - 800 \text{ см}^{-1}$), ν Al-O (1645 см^{-1}), ν Al-OH (1068 см^{-1}) [83, 89-92]. После обработки носителя ПСС помимо связей, характерных для ПСС (ν C-H (2933 см^{-1}), бензольное кольцо (1500 см^{-1}), $\nu\text{R-SO}_2\text{-OH}$ (1070 см^{-1})), новых связей, отвечающих за связывание Al_2O_3 и ПСС

не образуется, т.к. ПСС на поверхности оксида алюминия удерживается за счет электростатических сил. Рисунок 3.12 также показывает, что наблюдается увеличение интенсивности полос, отвечающих за гидроксильные группы.

Следующий этап обработки $Al_2O_3/ПСС$ – нанесение хитозана (рисунок 3.13).

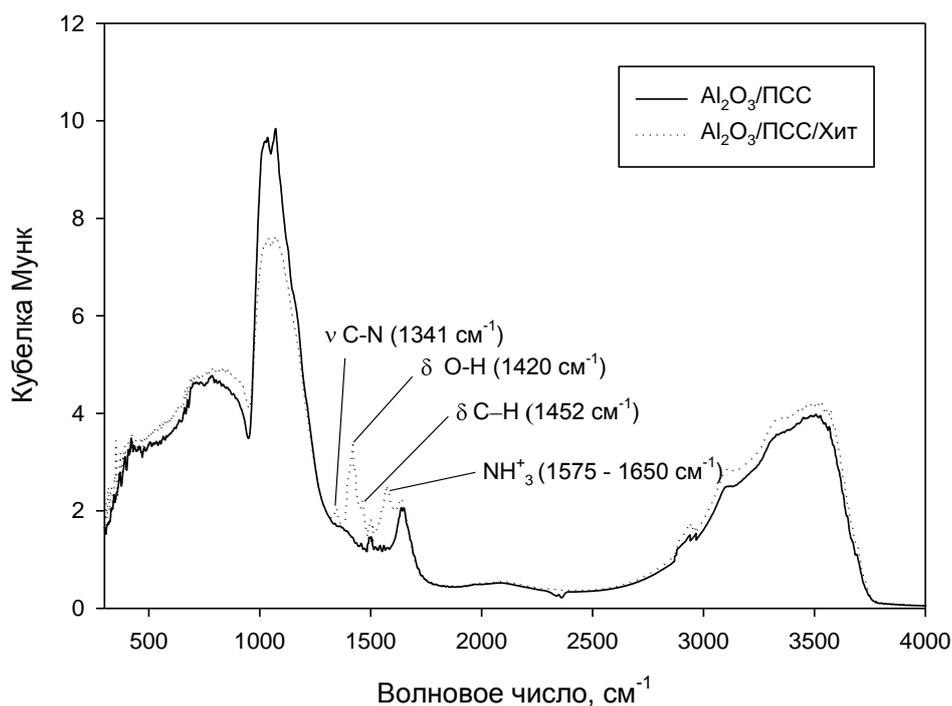


Рисунок 3.13 – Инфракрасные спектры $Al_2O_3/ПСС$ и $Al_2O_3/ПСС/Хит$

После обработки Al_2O_3 раствором хитозана на поверхности носителя (рисунок 3.13) наблюдаются характерные для этого полисахарида деформационные колебания NH_3^+ группы (в интервале $1575-1650\text{ см}^{-1}$), $\delta\text{ C-H}$ (1456 см^{-1}), $\delta\text{ O-H}$ (1420 см^{-1}), $\nu\text{ C-N}$ (1341 см^{-1}) [87].

После нанесения хитозана на Al_2O_3 , образец перемешивался в растворе глутарового диальдегида (рисунок 3.14).

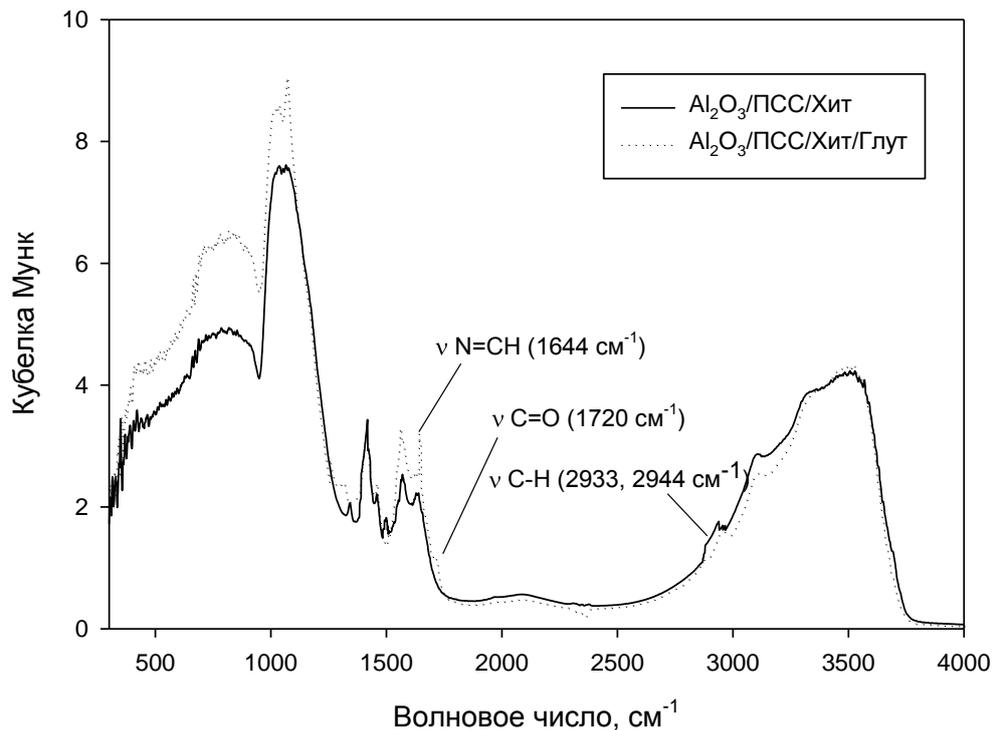


Рисунок 3.14 – Инфракрасные спектры $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}$

Глутаровый диальдегид на поверхности модифицированного носителя Al_2O_3 удерживается за счет образования азометиновой связи $\nu \text{N}=\text{CH}$ (1644 см^{-1}). Интенсивность полосы спектров аминогрупп, относящихся к хитозану, уменьшается за счет образования прочных азометновых связей с глутаровым диальдегидом.

Заключительным этапом подготовки биокатализатора является – иммобилизация HRP на поверхность подготовленного носителя (рисунок 3.15).

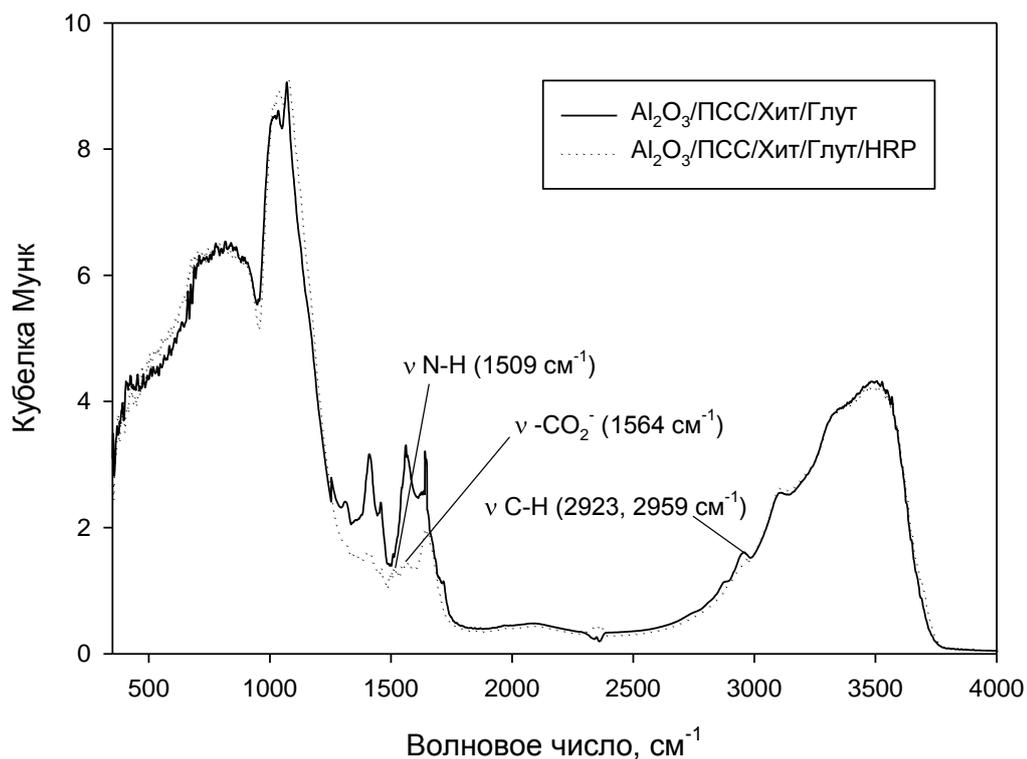


Рисунок 3.15 – Инфракрасные спектры $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$

Анализируя ИК-спектры готового биокатализатора (рисунок 3.15), можно сказать, что иммобилизация фермента прошла успешно. Об этом свидетельствует то, что полоса, отвечающая за азометиновую связь, стала интенсивнее, а линия, отвечающая за свободные карбонильные группы, исчезла за счет их взаимодействия с аминогруппами HRP. О фиксации фермента на поверхности носителя свидетельствуют связи, характерные для полипептидов: $\delta\text{N-H}$ (1509 см^{-1}), $\nu\text{-CO}_2^-$ (1564 см^{-1}) и полоса Амид II, идентифицирующая пептидную связь за счет $\delta_{\text{NH}} + \nu_{\text{CN}}$ (1543 см^{-1}) [88]. Таким образом, можно сказать, что фермент был ковалентно иммобилизован на поверхность Al_2O_3 , однако в меньшем количестве по сравнению с носителем на основе SiO_2 , что подтверждается данными по кинетическим расчетам.

Для повышения эффективности процесса окисления ТМФ проводилась оптимизация состава биокаталитических систем, т.к. биокатализатор должен

обладать высокой активностью, селективностью, устойчивостью в процессе его эксплуатации и то же время быть экономически приемлемым [2; 93-94]. Необходимо так же отметить, что HRP является наиболее подходящим ферментом для окисления ТМФ. Отличительное свойство HRP – высокая активность и специфичность по отношению к окислителю – пероксиду водорода, стабильность при хранении, доказанная эффективность в процессах окисления фенольных соединений, доступность данного фермента [18; 20-24].

Определение влияния концентрации полистиролсульфоната натрия на активность иммобилизованного фермента

Поскольку поверхность неорганических носителей Al_2O_3 и SiO_2 имеет положительный заряд, а для успешного присоединения необходима отрицательно заряженная поверхность, образцы были предварительно модифицированы анионным полимером ПСС. В результате чего поверхность носителей становится отрицательно заряженной.

Для определения влияния концентрации ПСС поверхности Al_2O_3 и SiO_2 обрабатывали раствором ПСС (10 мл) концентрацией, г/л: 0.1, 0.25, 0.5 и 0.75. Затем все образцы модифицировали раствором хитозана (50 мл, 0.1 г/л) и обрабатывали раствором глутарового диальдегида (50 мл, 0.1 г/л). Модифицированные и активированные образцы носителей перемешивали с раствором HRP (50 мл) концентрации 0.15 мг/мл.

Кинетические кривые образования ТМГХ в реакции окисления ТМФ от концентрации ПСС для биокатализаторов на основе SiO_2 и Al_2O_3 представлены на рисунке 3.16.

Рисунок 3.16 показывает, что наибольшая скорость накопления ТМГХ наблюдается при модификации поверхности носителей раствором ПСС с концентрацией 0.25 г/л для SiO_2 .

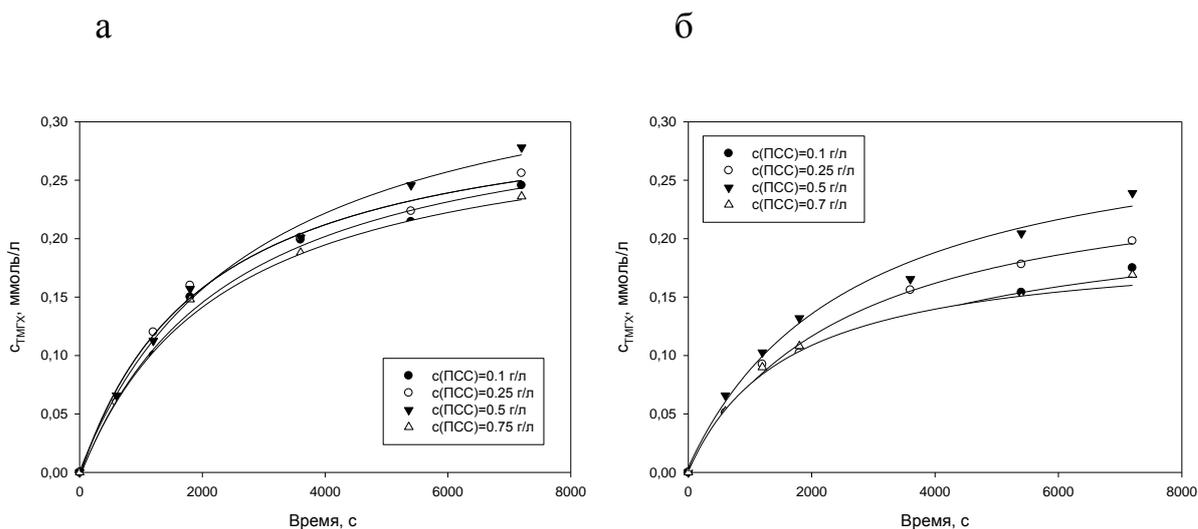


Рисунок 3.16 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМФ (ммоль/л) при модификации носителя: а) SiO₂, б) Al₂O₃ с различной концентрацией ПСС

($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5$ ммоль/л; $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л; pH 6.5; $T = 35$ °C, $c_{\text{кат}} = 0.2$ г/л)

Образец на основе SiO₂ показал лучшие результаты выхода ТМГХ по сравнению с образцом на основе Al₂O₃. Что может быть объяснено тем, что поверхность SiO₂ имеет изначально большее количество –ОН групп, что подтверждается физико-химическими исследованиями ИК-спектроскопии.

Определение влияния концентрации хитозана на активность иммобилизованного фермента

Одним из способов ковалентного связывания ферментов является их включение в полиэлектролитный комплекс природного или синтетического полимера с последующей иммобилизацией на различных носителях. Чаще всего для такого способа иммобилизации ферментов используют природные полисахариды, которые имеют определенные преимущества. К ним относятся возможность варьирования химической природы, молекулярной массы, возможность использования различных производных полисахаридов, варьирование их молекулярной массы, а так же количества взятого полимера

для иммобилизации. Наиболее изученным и востребованным полисахаридом является хитозан, который способен обеспечивать наибольшую активность и стабильность иммобилизованных ферментов [27, 40, 95-97]. Хитозан содержит большое количество свободных аминогрупп, которые могут активировать карбоксильные группы активного фермента за счет их вандерваальсового взаимодействия.

Поверхности Al_2O_3 и SiO_2 , предварительно обработанные раствором ПСС с концентрацией 0.25 г/л для SiO_2 и 0.5 г/л для Al_2O_3 , модифицировали растворами хитозана различных концентраций, г/л: 0.10, 0.15, 0.20 и 0.25. Далее образцы обрабатывали раствором глутарового диальдегида (50 мл, 0.1 г/л). Заключительную стадию синтеза биокатализатора – иммобилизацию HRP (50 мл, 0.015 г/л), проводили как описано выше.

Кинетические кривые образования ТМГХ в реакции окисления ТМФ от концентрации хитозана для биокатализаторов на основе SiO_2 и Al_2O_3 представлены на рисунке 3.17.

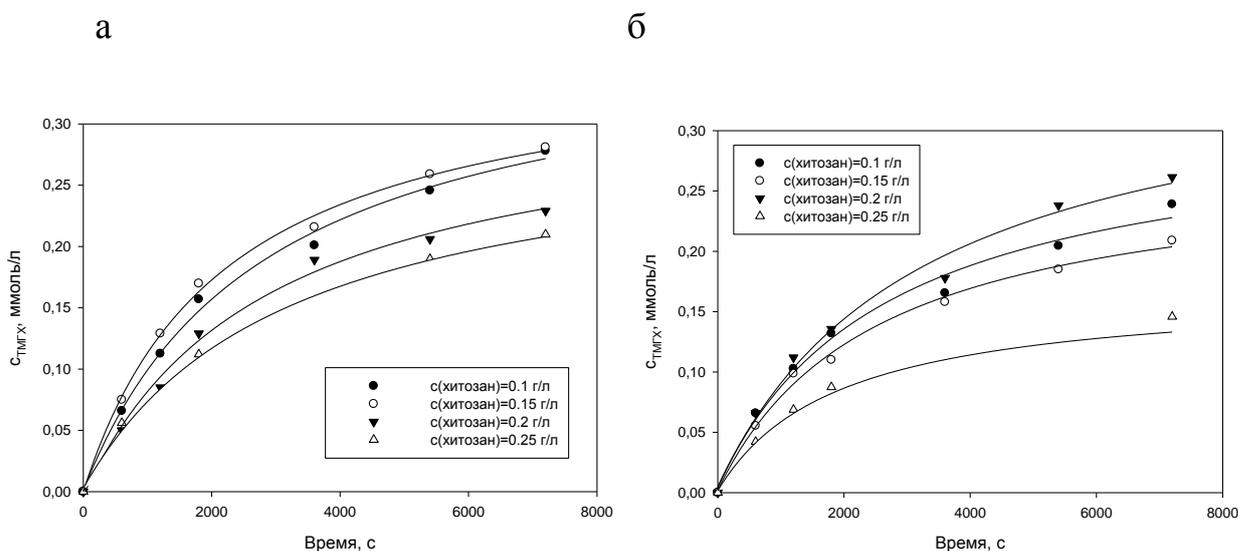


Рисунок 3.17 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМФ (ммоль/л) при модификации носителя: а) SiO_2 , б) Al_2O_3 различной концентрацией хитозана ($c_0^{ТМФ} = 1.5$ ммоль/л; $c_0(H_2O_2) = 1.5$ моль/л; pH 6.5; $T = 35$ °C, $c_{kat} = 0.2$ г/л)

Из рисунка 3.17 видно, что наиболее активный биокатализатор на основе SiO_2 (рисунок 3.17 а) модифицированный 0.15 г/л раствором хитозана, который показал наибольшую активность по сравнению с биокатализатором на основе Al_2O_3 (рисунок 3.17 б), приготовленным с 0.2 г/л раствора хитозана. Это можно объяснить наибольшим количеством ОН-групп на поверхности SiO_2 , чем на Al_2O_3 и, как следствие, наибольшим количеством прочных связей активных центров биокатализатора.

Определение влияния концентрации глутарового диальдегида на активность иммобилизованного фермента

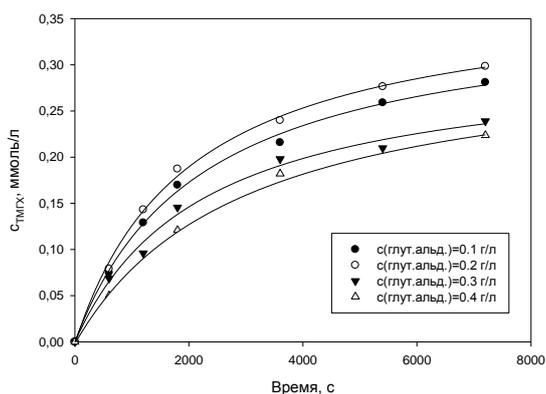
Чтобы создать активировать поверхность полимерного носителя в настоящее время применяются различные типы сшивающих агентов, которые имеют необходимые функциональные группы для ковалентной сшивки ферментов. Поэтому тип сшивающего агента и его концентрация играют существенную роль в эффективном синтезе биокатализатора [98].

Для оценки этого параметра на активность пероксидазы, иммобилизованной на модифицированные образцы SiO_2 и Al_2O_3 с оптимальной концентрацией ПСС (0.25 г/л для SiO_2 и 0.5 г/л для Al_2O_3) и хитозана (0.15 г/л для SiO_2 и 0.2 г/л для Al_2O_3) были пропитаны 50 мл растворов глутарового диальдегида различной концентрации: 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 г/л.

По полученным экспериментальным данным была подсчитана концентрация образовавшегося ТМГХ в процессе окисления ТМФ в присутствии полученных оптимальных биокатализаторов (рисунок 3.18).

Обработка поверхности носителя глутаровым альдегидом приводит к получению максимального количества свободных альдегидных групп способных к взаимодействию с аминокруппами фермента пероксидазы.

а



б

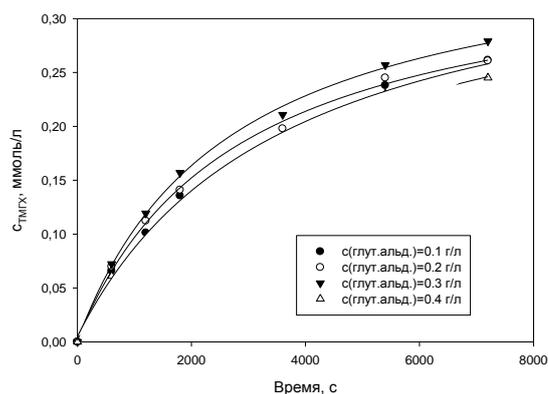


Рисунок 3.18 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМФ (ммоль/л) при активации носителя: а) SiO₂ б) Al₂O₃ различной концентрацией глутарового диальдегида ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5$ ммоль/л; $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л; pH 6.5; T = 35 °C, $c_{\text{kat}} = 0.2$ г/л)

Рисунок 3.18 показывает, что самым активным биокатализатором является HRP, нанесенная на с 0.2 г/л раствора глутарового диальдегида. Поскольку к поверхности SiO₂ было пришито большее количество хитозана, по сравнению с поверхностью Al₂O₃, соответственно большее количество сшивающего агента способно прикрепиться к поверхности такого носителя. Для биокатализатора, приготовленного на Al₂O₃ оптимальная концентрация глутарового диальдегида является 0.3 г/л.

По результатам определения оптимальных условий синтеза биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на SiO₂ и Al₂O₃ видно, что оптимальными являются следующие:

А) для 1 г SiO₂: 0.25 г/л раствора ПСС; 0.15 г/л раствора хитозана; 0.2 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл пероксидазы;

Б) для 1 г Al₂O₃: 0.5 г/л раствора ПСС; 0.2 г/л раствора хитозана; 0.3 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл пероксидазы.

3.1.2.2 ИК-Фурье спектроскопия и подбор оптимального состава для биокатализатора на основе Fe_3O_4

ИК-спектры биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 представлены на рисунке 3.19 и таблице 3.3.

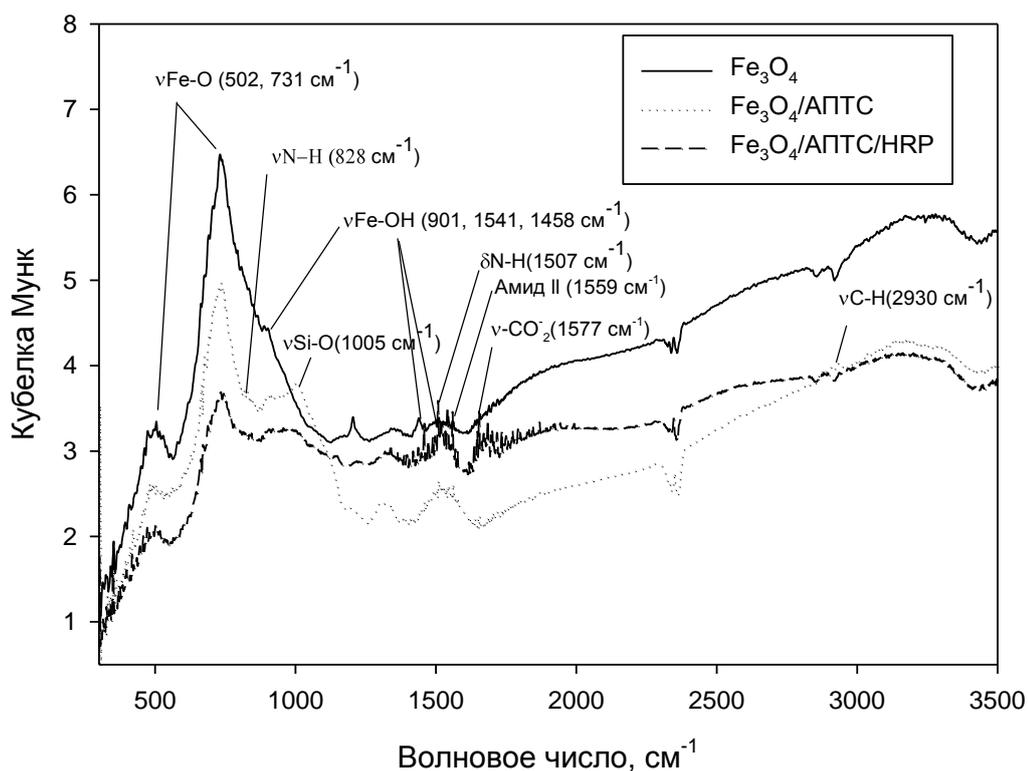


Рисунок 3.19 - Инфракрасные спектры образцов на основе HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4

Таблица 3.3 – Положение основных полос поглощения в ИК спектре для биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на Fe_3O_4

Характеристическая группа	Частота колебаний, cm^{-1}		Тип колебаний
	Наблюдаемые данные		
	До иммоб.	После иммоб.	
О-Н	3224	3220	ν
Fe-ОН	1541, 1458, 901	1541, 1458	ν

Fe-O	731,502	731,502	ν
C-H	-	2930	ν
N-H	-	828	δ
Si-O	-	1005	ν
C-N	-	1055	ν
N-H	-	1507	δ (колебания NH_3^+)
$-\text{CO}_2^-$	-	1577	ν
Амид II	-	1559	$\delta_{\text{NH}^+} \nu_{\text{CN}}$

Сравнивая ИК-спектры магнитных наночастиц покрытых АПТС и непокрытых АПТС (рисунок 3.19 и таблица 3.3), можно увидеть, что Fe_3O_4 обработанный модифицирующим реагентом имеет, помимо связей ν Fe-OH ($1541, 1458 \text{ см}^{-1}$), ν Fe-O ($731, 502 \text{ см}^{-1}$), связи, указывающие на наличие АПТС, а именно: ν C-H (2930 см^{-1}), δ N-H (828 см^{-1}), ν Si-O (1005 см^{-1}), ν C-N (1055 см^{-1}). После иммобилизации HRP на предварительно модифицированную поверхность образуются связи, свидетельствующие о присутствии HRP на поверхности носителя: δ N-H (1507 см^{-1}), ν $-\text{CO}_2^-$ (1577 см^{-1}) и полоса Амид II, идентифицирующая пептидную связь за счет $\delta_{\text{NH}^+} + \nu_{\text{CN}}$ (1559 см^{-1}) [91, 92].

Для оптимизации соотношения компонентов, входящих в состав биокаталитических систем на основе магнитных наночастиц проводились реакции по окислению ТМФ при постоянной начальной концентрации ТМФ ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5 \text{ ммоль/л}$) и H_2O_2 ($c_0^{\text{пер.}} = 1.5 \text{ моль/л}$), pH 6.5, температуре ($T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$), концентрации катализатора ($c_{\text{kat}} = 0.2 \text{ г/л}$) и первоначальном объеме реакционной смеси ($V_0 = 30 \text{ мл}$).

Подбор оптимальной концентрации 3-аминопропилтриэтоксисилана

Оксид железа Fe_3O_4 имеет адсорбционные свойства за счет координационно-ненасыщенных ионов Fe^{+3} и Fe^{+2} , а также ионов O^{2-} и OH^- . Атомы железа могут выступать как доноры и акцепторы электронов. OH^- группы способны взаимодействовать с АПТС, который в свою очередь

модифицирует поверхность реакционноспособными аминогруппами. К модифицированным таким образом наночастицам Fe_3O_4 могут ковалентно присоединяться ферменты [68].

Для оценки влияния концентрации АПТС образцы с оптимальной концентрацией цитрата натрия (0.5 мг/мл) обрабатывались раствором АПТС (1 мкл/мл, 2 мкл/мл, 3 мкл/мл) и HRP (0.15 мг/мл). Кинетические кривые представлены на рисунке 3.20.

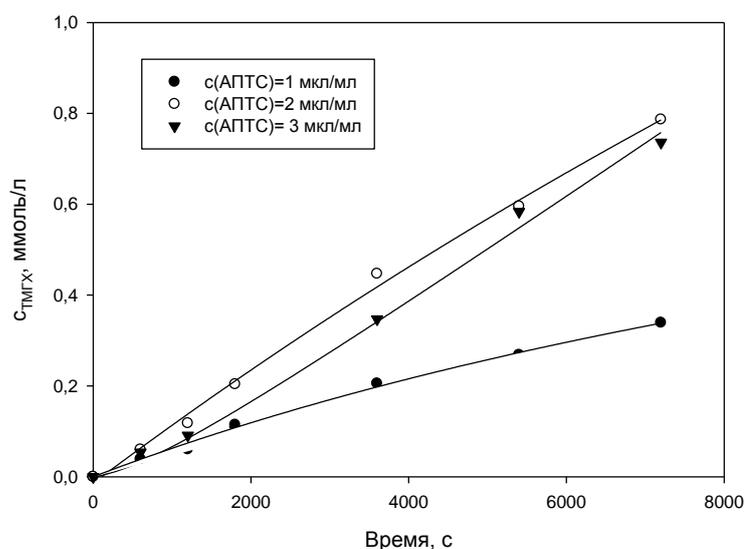


Рисунок 3.20 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМГХ (ммоль/л) при модификации магнитных наночастиц Fe_3O_4 различной концентрации АПТС ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л, $T = 40$ °С, $c_{\text{кат}} = 0.2$ г/л)

Из рисунка 3.20 видно, что самым эффективным катализатором является катализатор на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 , покрытые АПТС с концентрацией 2 мкл/мл, поскольку при данной концентрации происходит максимальное насыщение поверхности магнетита. Дальнейшее увеличение концентрации АПТС не имеет большого влияния на процесс окисления ТМФ. При меньшей концентрации АПТС, скорее всего не образуется достаточного количества кремнийорганического слоя, соответственно меньшее количество фермента может присоединиться к поверхности наночастицы Fe_3O_4 .

Подбор оптимальной концентрации пероксидазы

Для определения оптимальной концентрации HRP готовили серию биокатализаторов, путем синтеза магнитных наночастиц Fe_3O_4 , обработанных АПТС (2 мкл/мл) и HRP с концентрациями 0.10; 0.15 и 0.20 мг/мл.

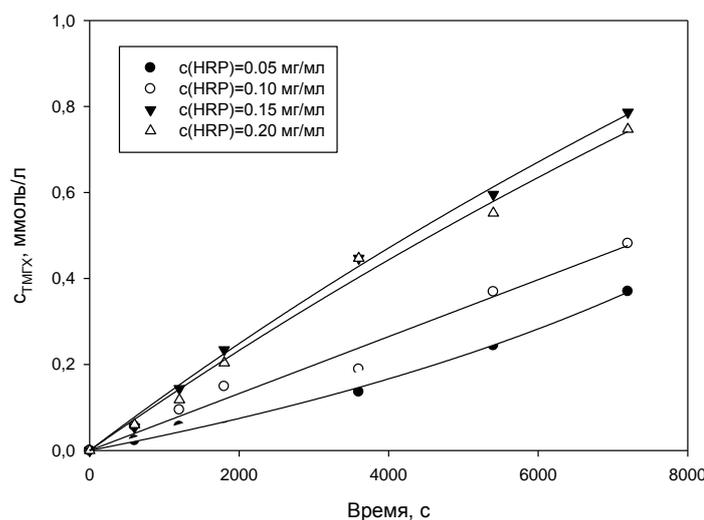


Рисунок 3.21 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМГХ (ммоль/л) при иммобилизации HRP различной концентрации на магнитные наночастицы Fe_3O_4 ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5 \text{ ммоль/л}$, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5 \text{ моль/л}$, $T = 40^\circ\text{C}$, $c_{\text{кат}} = 0.2 \text{ г/л}$)

Рисунок 3.21 показывает, что оптимальной концентрацией HRP для приготовления биокатализатора является 0.15 г/л. При такой концентрации раствора смесь становится достаточно насыщенной ферментом, поскольку при дальнейшем увеличении концентрации HRP не происходит значительных изменений начальной скорости реакции окисления ТМФ. Концентрация HRP ниже 0.15 г/л недостаточна для полного покрытия поверхности наночастицы Fe_3O_4 .

Таким образом, оптимальным соотношением компонентов для синтеза биокатализатора на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 является: концентрация АПТС 2 мкл/мл, концентрация

HRP 0.15 мг/мл. Биокатализатор, синтезированный таким образом, был использован во всех дальнейших экспериментах.

3.1.2.3 Результат анализа образца биокатализатора на основе Fe₃O₄ методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии

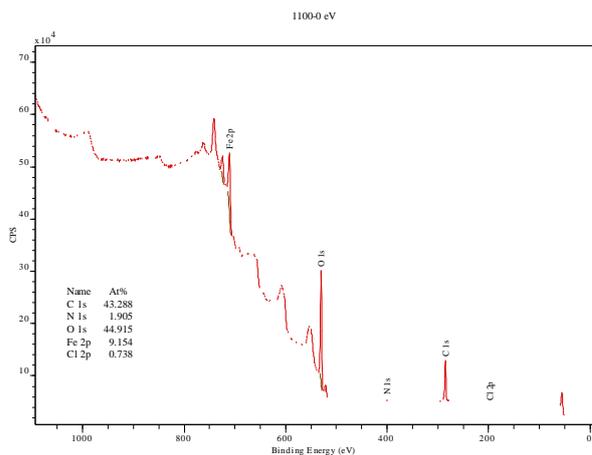
Состав поверхности образцов Fe₃O₄, Fe₃O₄/АПТС, Fe₃O₄/АПТС/HRP и Fe₃O₄/АПТС/HRP (после эксперимента) представлен на рисунке 3.22 и в таблице 3.4.

Таблица 3.4 - Состав поверхности образцов катализатора

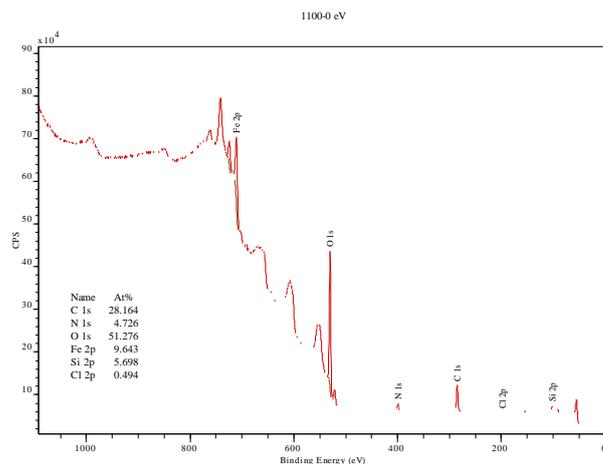
Образец	Элемент, % ат						
	C	O	N	Fe	Si	Cl	P
Fe ₃ O ₄	43.3	44.9	1.9	9.2	0.0	0.7	0.0
Fe ₃ O ₄ /АПТС	28.2	51.3	4.7	9.6	5.7	0.5	0.0
Fe ₃ O ₄ /АПТС/HRP	60.1	32.3	1.0	3.8	2.7	0.2	0.0
Fe ₃ O ₄ /АПТС/HRP (после эксперимента)	54.1	36.4	0.8	3.8	2.4	0.0	2.5

Из представленных данных следует, что в ходе нанесения HRP происходит увеличение содержания на поверхности углерода более чем в два раза и снижение содержания таких элементов поверхности как кислород в 1.6 раза, азот в 4.7 раза, железа в два с половиной раза, кремния и хлора примерно в два раза.

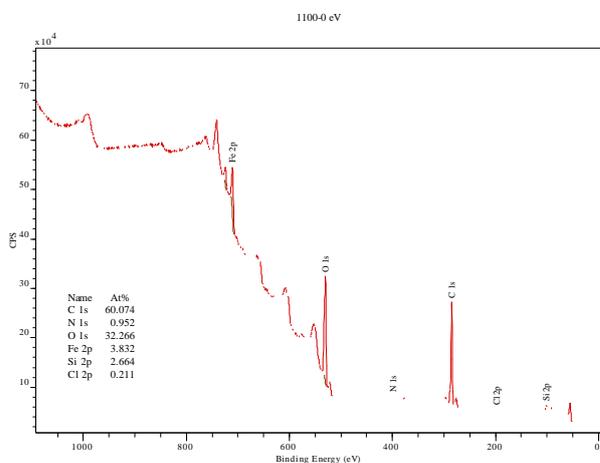
а



б



в



г

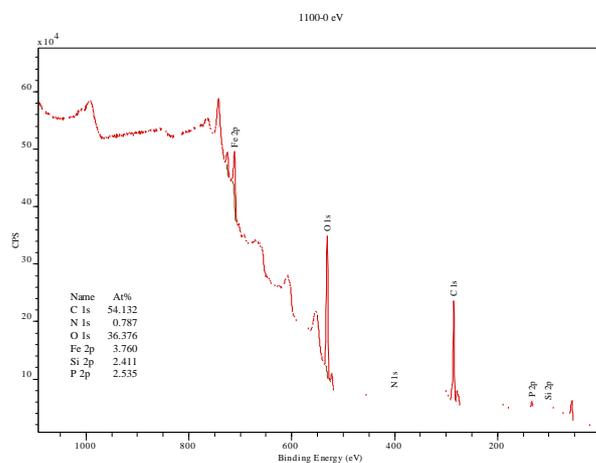


Рисунок 3.22 - Обзорные спектры образцов:

а) Fe_3O_4 ,

б) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}$,

в) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$

г) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$ (после эксперимента)

На рисунке 3.23 представлены спектры высокого разрешения фотоэлектронных полос C 1s, Fe 2p, O 1s, N 1s, Si 2p. В спектре высокого разрешения C 1s наблюдается не только общее увеличение интенсивности сигнала, но и возникновение пика в области 288-290 эВ, отвечающего окисленным формам углерода - карбонильным и карбоксильным группам, наличие которых характерно для белковой молекулы. В ходе нанесения белка

химическое состояние железа не изменилось, т.к. энергия связи подуровня Fe $2p_{3/2}$ до и после нанесения составила 710.7 эВ. Из данных, представленных на рисунке 3.23в, следует, что кислород в составе поверхности образца Fe₃O₄/АПТС находится в двух состояниях, характерных для Fe₃O₄ и FeOOH: O 1s 530.0 эВ и 531.7 эВ [99]. Последнее состояние объясняется наличием OH-групп на поверхности частиц Fe₃O₄. После нанесения фермента, компонента O 1s, отвечающая кислородным мостикам структуры Fe₃O₄ 530.0 эВ сохраняется, в то время как область 531.7 эВ может быть описана только широким интегральным пиком, отвечающим множеству химических состояний кислорода - -OH, -COOH, >C=O и т.д. - в структуре молекулы белка. В то же время, при нанесении белка происходит изменение химического состояния кремния - увеличение энергии связи подуровня Si $2p$ с 101.4 эВ до 102.0 эВ (рисунок 3.23д), что соответствует увеличению степени окисления или локализации электронной плотности на химическом окружении, т.е. образованию химической связи АПТС с HRP.

На основании вышесказанного можно утверждать, что в ходе нанесения фермента, белковые молекулы адсорбировались на поверхности Fe₃O₄ и были химически пришиты к поверхности Fe₃O₄. Поскольку содержание железа на поверхности уменьшилось в два с половиной раза и обусловлено оно появлением на поверхности Fe₃O₄ фермента, то степень покрытия поверхности можно оценить в 0.6 монослоя молекул фермента.

Появление фосфора на поверхности образца Fe₃O₄/АПТС/HRP (после эксперимента) объясняется использованием фосфатного буфера и адсорбцией его компонентов на поверхность катализатора, а уменьшение содержания углерода при неизменном содержании железа позволяет утверждать, что компоненты фосфатного буфера адсорбировались на поверхности белковой молекулы.

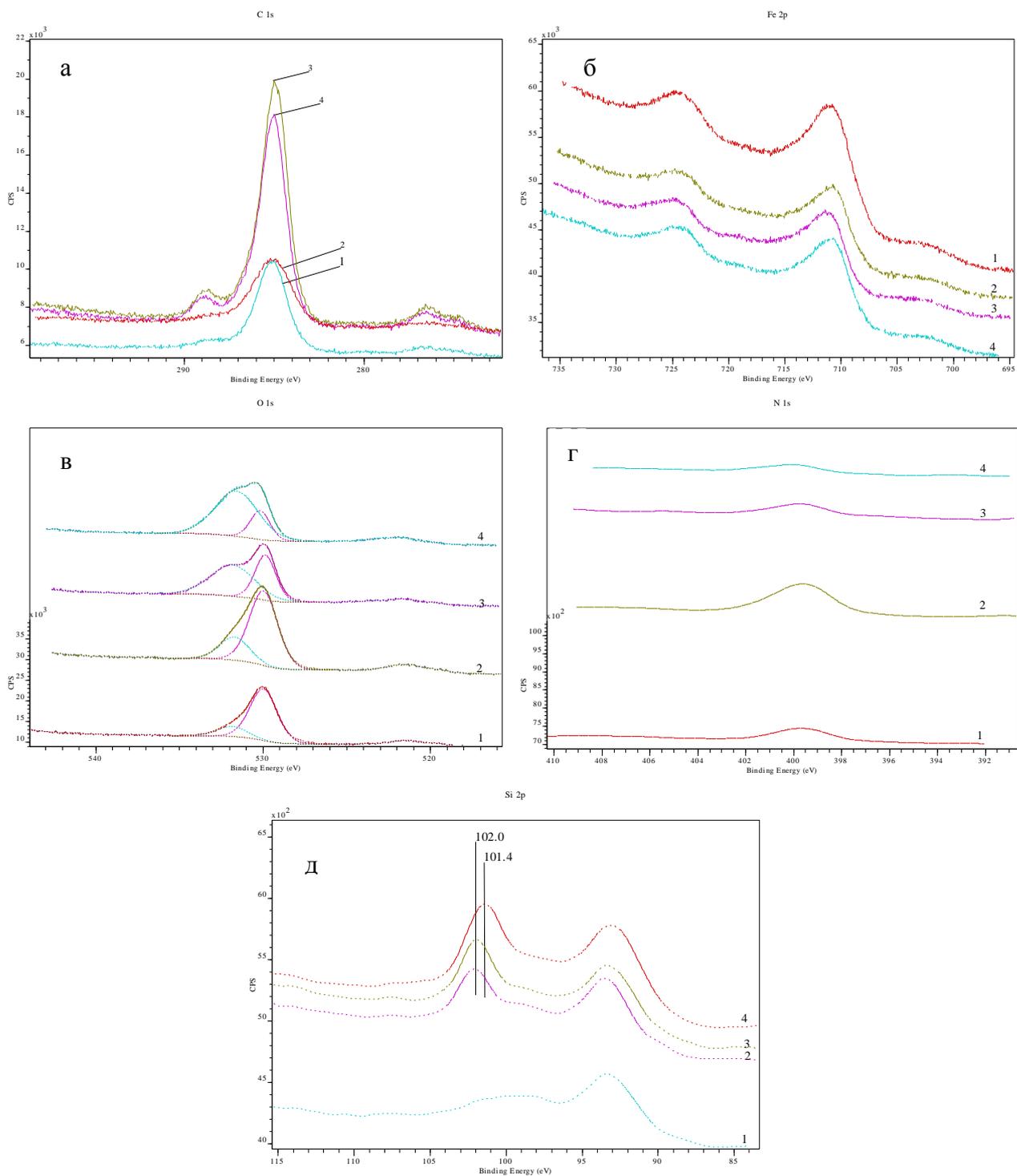


Рисунок 3.23 - Спектры высокого разрешения линий: а) C 1s; б) Fe 2p; в) O 1s; г) N 1s; д) Si 2p образцов:

- 1) Fe_3O_4 ,
- 2) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}$,
- 3) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$
- 4) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$ (после эксперимента)

Сохранение профилей спектров высокого разрешения, энергий связи подуровней и состава поверхности после одного каталитического цикла, позволяет утверждать, что смывание белка с поверхности магнитных наночастиц незначительно. Данный факт свидетельствует о стабильности полученного биокатализатора.

3.1.2.4 Характеристика поверхности образца биокатализатора на основе Fe_3O_4 методом низкотемпературной адсорбции азота

Методом низкотемпературной адсорбции азота были исследованы образцы на основе магнитных наночастиц Fe_3O_4 . На основе полученных данных были построены изотермы адсорбции-десорбции (рисунок 3.24).

Из рисунка 3.24 видно, что все представленные изотермы адсорбции-десорбции можно отнести к изотермам IV типа (характерный признак изотерм типа IV – петля гистерезиса), которые ассоциируются с капиллярной конденсацией в мезопорах. Петлю гистерезиса можно отнести к H3 типу, указывающему на щелевидные поры [100-102]. После эксперимента петля гистерезиса сузилась, вероятно, это связано с закупориванием пор субстратом и продуктом реакции.

Изотермы адсорбции-десорбции были обработаны с применением модели мономолекулярной адсорбции Ленгмюра и модели полимолекулярной адсорбции Брунауэра-Эммета-Тейлора (модель БЭТ).

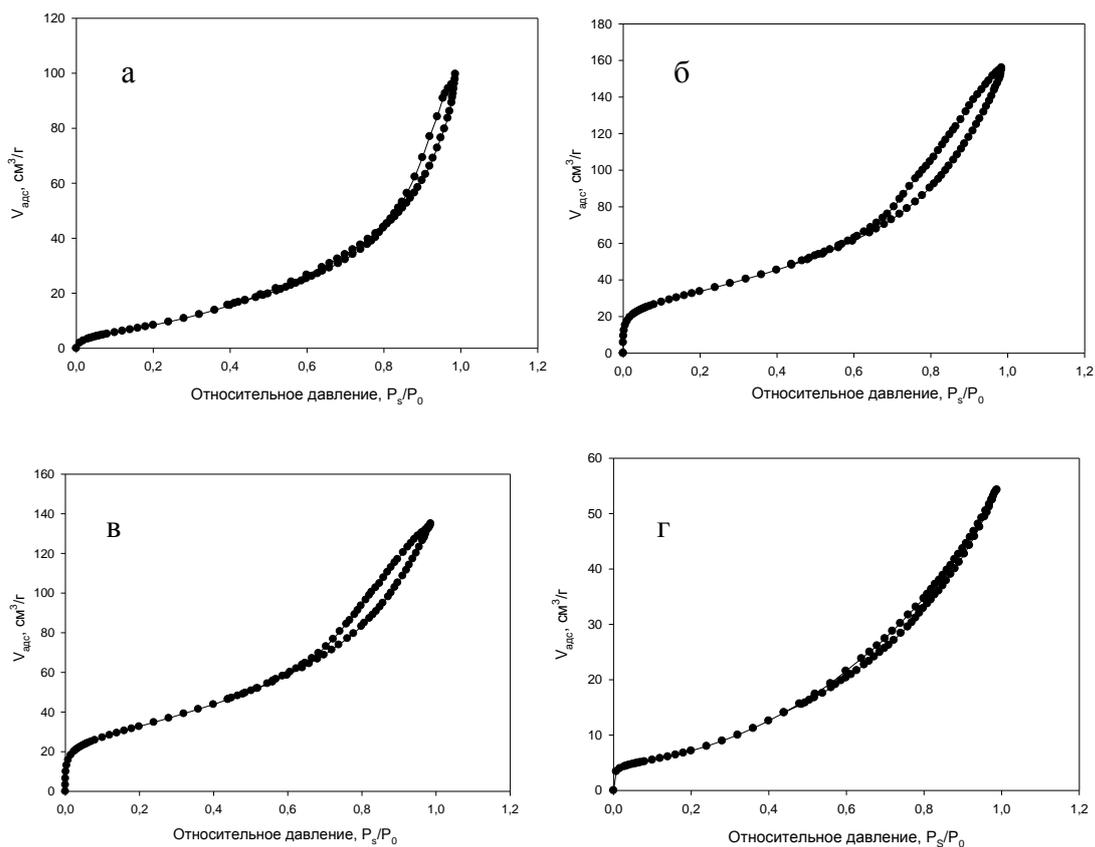


Рисунок 3.24 – Сравнение изотерм адсорбции-десорбции:

а) Fe_3O_4 ;

б) $Fe_3O_4/APTC$;

в) $Fe_3O_4/APTC/HRP$;

г) $Fe_3O_4/APTC/HRP$ (после эксперимента)

Значения удельных площадей поверхности исследуемых биокатализаторов по каждой модели представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Значения удельной площади поверхности исследуемых биокатализаторов

Образец	Площадь поверхности, $м^2/г$	
	Модель Ленгмюра	Модель БЭТ
Fe_3O_4	24.7	35.1
$Fe_3O_4/APTC$	27.9	33.1
$Fe_3O_4/APTC/HRP$	28.5	31.3
$Fe_3O_4/APTC/HRP$ (после эксперимента)	22.1	26.4

Из таблицы 3.5 видно, наибольшую удельную площадь поверхности (модель БЭТ) имеют не обработанные магнитные наночастицы. После обработки носителя модифицирующими реагентами и после использования биокатализатора происходит уменьшение удельной площади поверхности, в связи с закупориванием пор.

На основании модели БЭТ было определено распределение пор по объему для биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на Fe_3O_4 (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Распределение пор по объему в зависимости от их диаметра для биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на Fe_3O_4

Распределение пор по объему, %								
Диаметр пор, нм	< 6	6 – 8	8 – 10	10 – 12	12 – 16	16 – 20	20 – 80	80 <
Fe_3O_4								
Адсорбция	19.03	8.49	6.48	6.16	8.07	7.63	29.78	14.35
Десорбция	14.75	7.99	8.04	8.93	12.21	12.42	31.29	4.37
Fe_3O_4 /АПТС								
Адсорбция	25.28	13.01	7.05	8.02	8.77	8.34	24.26	5.26
Десорбция	22.56	12.20	7.34	8.30	9.50	9.11	25.90	5.10
Fe_3O_4 /АПТС/HRP								
Адсорбция	28.09	13.61	7.57	8.02	8.55	8.25	21.62	4.28
Десорбция	25.49	13.18	7.35	8.57	9.13	8.70	23.38	4.20
Fe_3O_4 /АПТС/HRP (после эксперимента)								
Адсорбция	29.13	14.18	7.60	8.41	8.39	8.15	20.64	3.48
Десорбция	24.38	13.26	7.90	8.80	8.98	8.68	23.86	4.13

Из таблицы 3.6 можно сделать вывод, что магнитные наночастицы в основном обладают мезопорами, которые могут способствовать сорбции АПТС и фермента. Так же этот факт свидетельствует о том, что в процессе

окисления ТМФ исключается диффузионное торможение. После модификации поверхности наночастиц Fe_3O_4 количество мезопор снижается, а количество микропор увеличивается. Следовательно, можно предположить, что адсорбция происходит в основном в мезопорах.

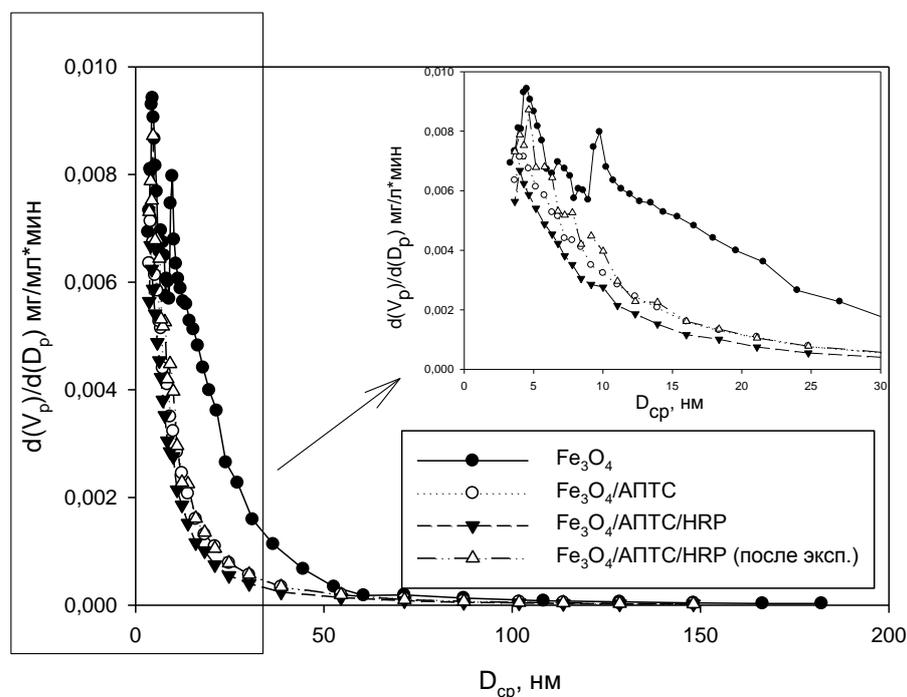


Рисунок 3.25 – График распределения объема пор в зависимости от их диаметра

На основании полученных данных по низкотемпературной адсорбции азота, можно сделать вывод о том, что все представленные образцы имеют мезопористую структуру. Диаметр пор составляет в среднем 4-11 нм (рисунок 3.25), который обеспечивает свободный доступ молекулы HRP, имеющий средний диаметр нативной молекулы 4 нм [103].

3.1.2.5 Результат анализа образца биокатализатора на основе Fe_3O_4 методом хемосорбции водорода

Методом хемосорбция водорода можно оценить количество активных центров на поверхности носителя. При хемосорбции образуется связь между поверхностью носителя и молекулой адсорбированного водорода, при этом

один атом водорода может прикрепиться к одному поверхностному атому твердого металлического носителя [104].

Измерения методом хемосорбция водорода проводились для образцов Fe_3O_4 и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$. В соответствии с количеством поглощённого водорода было рассчитано количество поверхностно активных атомов железа, которое составило 1,2 ммоль/г для необработанных наночастиц оксида железа и 0,7 ммоль/г для частиц с нанесенной HRP. Уменьшение количества поверхностно активных атомов железа может быть связано с образованием ковалентных связей между железом, модификатором и ферментом. Таким образом, на основании анализа хемосорбция водорода можно предположить, что при протекания реакции окисления ТМФ в присутствии HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы, исключается диффузионное торможение.

3.1.2.6 Определение области протекания процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии иммобилизованной пероксидазы

Для исключения внешнедиффузионного торможения на границе раздела гетерогенного катализатора и реакционного раствора проводились эксперименты по окислению ТМФ с разной интенсивностью перемешивания, т.к. увеличение скорости перемешивания способствует уменьшению диффузионных ограничений [105]. Исследования проводились с гетерогенным биокатализатором – $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$.

Экспериментальные данные показали, что с увеличением интенсивности перемешивания до 600 оборотов мешалки в минуту (rpm) увеличивался расход ТМФ. При интенсивности перемешивания выше этого значения кинетические кривые полностью совпадают. В связи, с чем можно предположить, что на кинетику исследуемого процесса гидродинамические условия больше не оказывают влияния.

Гидродинамическое влияние определялось по изменению пути всей кинетической кривой расхода ТМФ во времени, т.к. кинетические кривые имеют сложный характер. В этом случае использовался метод трансформации [76]. Для этого шкала времени линейно преобразовывалась умножением времени реакции – t на определенный коэффициент (η). При этом все кинетические кривые совмещались с кинетической кривой, соответствующей минимальной скорости реакции (рисунок 3.1 а, кривая 1). Такая кинетическая кривая является стандартной, для которой коэффициент преобразования (трансформации) – η был равен 1.

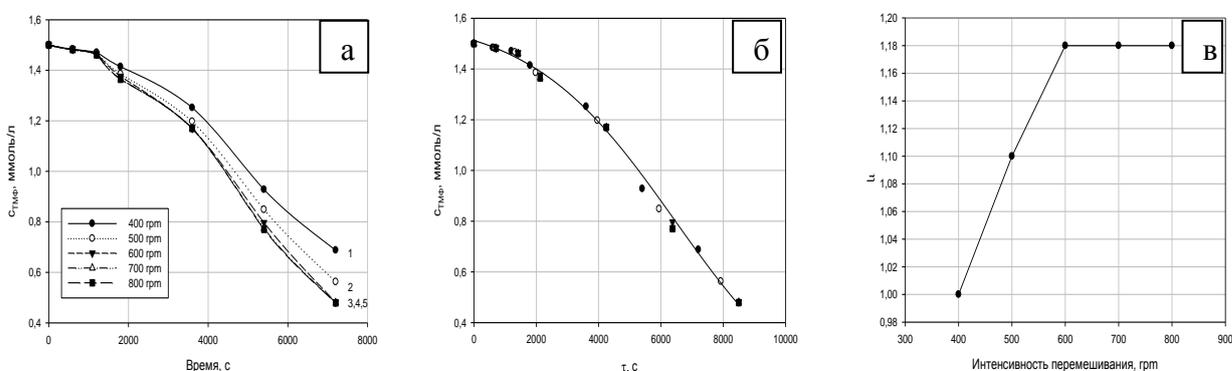


Рисунок 3.26 – Влияние скорости перемешивания а) кинетические кривые расходования ТМФ при различных оборотах мешалки (rpm); б) линейное преобразование кинетических кривых во времени;

с) зависимость коэффициента трансформации (η) от числа оборотов мешалки

$$(c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5 \text{ ммоль/л}, c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5 \text{ моль/л}, T = 40 \text{ }^\circ\text{C}, c_{\text{кат}} = 0.2 \text{ г/л})$$

После проведенного преобразования ход кинетических кривых в координатах концентрация ТМФ – приведенное время ($\tau = \eta \cdot t$) для разных гидродинамических условий совпадает. В связи с этим можно полагать, что коэффициенты трансформации (η) соответствуют относительным скоростям реакции. Зависимость относительной скорости реакции от числа оборотов мешалки представлена на рисунке 3.26 (в).

Из рисунка 3.26 (а, б, в) видно, что скорость окисления ТМФ увеличивается линейно при увеличении интенсивности перемешивания

мешалки до 600 rpm. При интенсивности перемешивания выше этого значения начальная скорость окисления ТМФ практически не зависит от интенсивности перемешивания, что свидетельствует об исключении влияния внешнедиффузионного торможения. В связи с этим все дальнейшие эксперименты проводились при интенсивности перемешивания 600 rpm. Таким образом, предположение, выдвинутое на основании результатов анализа низкотемпературной адсорбции азота и хемосорбции водорода, о том, что реакция протекает в кинетической области является верным.

3.2 Тестирование полученных биокатализаторов и подбор оптимальных условий проведения процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии биокатализаторов на основе пероксидазы

В процессе выполнения экспериментов с целью определения оптимальных условий процесса окисления ТМФ варьировали нагрузку на катализатор, температуру, pH реакционной среды и стабильность полученных биокатализаторов.

Известно, что на скорость окисления ТМФ влияют наночастицы Fe_3O_4 , катализируя эту реакцию, т.к. они обладают пероксидазо-подобным действием, за счет атомов железа на их поверхности, которые сначала формируют промежуточный комплекс с субстратом перед катализом [106]. Высокое сродство наночастиц к субстрату может привести к их более высокой каталитической активности. Электростатическое взаимодействие между субстратом и поверхностью наночастиц способно повысить их сродство. В связи с этим были проведены эксперименты по окислению ТМФ в присутствии наночастиц, синтезированных полиольным методом.

Таким образом, проводились эксперименты по оптимизации условий процесса окисления ТМФ с нативной HRP; магнитными наночастицами Fe_3O_4 ; HRP, иммобилизованной на SiO_2 , Al_2O_3 и Fe_3O_4 . В кинетике ферментативного катализа используется расчет начальных скоростей

реакции при различных концентрациях субстрата, так как начальная фаза реакции наиболее полно характеризует ее протекание из-за отсутствия возможного ингибирования продуктами целевой и побочных реакций и торможения, вызываемого расходом субстрата.

3.2.1 Определение оптимальной концентрации 2,3,6-триметилфенола

Для определения оптимальной концентрации субстрата проводились эксперименты по окисления ТМФ (0.5; 0.75; 1.0; 1.5; 2.0 и 2.5 ммоль/л) в присутствии нативной HRP и HRP иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 . Кинетические кривые зависимости выхода продукта от начальной концентрации субстрата представлены на рисунке 3.27. Оптимальная концентрация ТМФ составляла 1.5 ммоль/л как при использовании нативной HRP, так и HRP иммобилизованной на Fe_3O_4 , поскольку при данной концентрации достигается максимальный выход продукта. Это может быть связано с тем, что ферментативная реакция способна ингибироваться большой концентрацией субстрата.

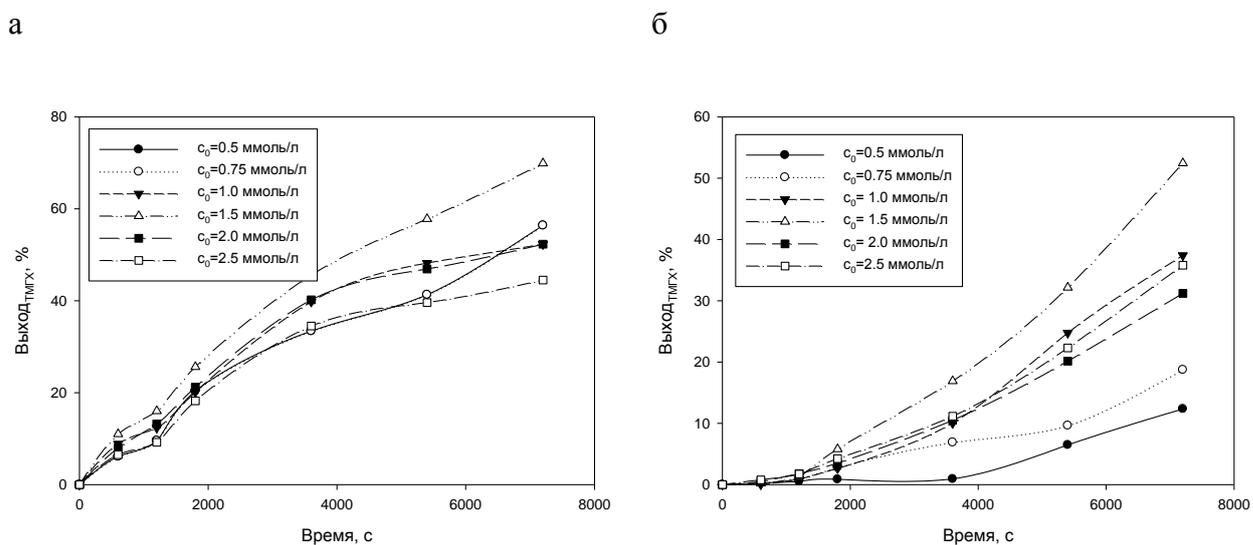


Рисунок 3.27 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМГХ а) нативная HRP; б) HRP иммобилизованная на магнитные наночастицы Fe_3O_4

Так же необходимо отметить, что форма кривых меняется с «выпуклой» на «вогнутую», что может быть связано с изменением возможности доступа субстрата к активным центрам биокатализатора.

3.2.2 Подбор оптимальной температуры

Известно [71,107,108], что температура может повлиять на активность ферментов, поскольку для ферментов характерен «температурный оптимум». При увеличении температуры скорость ферментативной реакции увеличивается в результате ускорения движения молекул, приводящего к повышению вероятности взаимодействия реагирующих веществ, доходя до определенного предела, а затем постепенно снижается из-за инактивации фермента, происходящей вследствие тепловой денатурации белковой молекулы.

Для определения оптимальной температуры проведения процесса окисления ТМФ в присутствии синтезированных биокатализаторов была проведена реакция окисления ТМФ при температурах 30 °С, 40 °С, 45 °С, 50 °С, 55°С. Результаты экспериментов приведены на рисунке 3.8. Эксперименты проводились при первоначальном реакционном объеме 30 мл, концентрации биокатализатора 0.2 мг/мл, концентрации ТМФ 1.5 ммоль/л, рН 6.5, концентрации H_2O_2 1.5 моль/л.

Рисунок 3.28 показывает, что при увеличении температуры активность НRP иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 не снижается, фермент становится термостабильным. Вероятно, это происходит в результате прочного связывания белковой молекулы с носителем, вследствие чего нативная конформация фермента не претерпевает сильных изменений и денатурация белковой молекулы затрудняется [109].

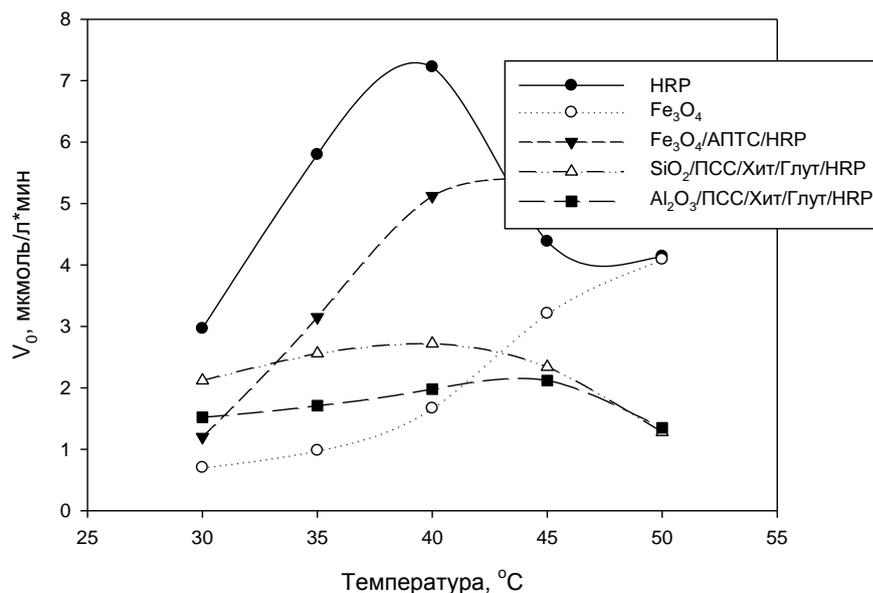


Рисунок 3.28 – Начальная скорость реакции окисления ТМФ при различных температурах ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л, pH 6.5, $c_{\text{кат}} = 0.2$ г/л)

При температуре выше 40 °C происходит дезактивация фермента, поэтому оптимальной температурой для проведения процесса окисления ТМФ в присутствии биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на Fe₃O₄ будет 40 °C. Поскольку, при более высокой температуре в процессе окисления ТМФ в большей степени участвуют наночастицы, а не фермент.

Для остальных образцов катализаторов оптимальная температура процесса окисления ТМФ так же 40 °C. Поэтому все дальнейшие эксперименты проводились при данной температуре.

Была рассчитана кажущаяся энергия активации E_a и предэкспоненциальный множитель K_0 для нативной HRP, которые составляют 61 кДж/моль и $1.4 \cdot 10^7$ соответственно. Для HRP иммобилизованной на магнитные наночастицы E_a составляет 67.71 кДж/моль, $K_0 - 6.6 \cdot 10^7$. То есть в последнем случае увеличивается число активных центров.

3.2.3 Подбор оптимального значения рН

Значение рН также является важным параметром в реакциях с участием ферментов. Известно, что кривая при изменении значения рН в ферментативных реакциях будет иметь точку, в которой фермент проявляет максимальную активность, так как существует некоторое оптимальное состояние ионизации фермента, которое обеспечивает эффективное связывание белковой молекулы и субстрата, улучшая тем самым катализ реакции [110-112].

Для оценки влияния значения рН были проведены эксперименты в интервале рН от 6.0 до 7.4 (рисунок 3.29). Эксперименты проводились при первоначальном реакционном объеме 30 мл, концентрации биокатализатора 0.2 мг/мл, концентрации ТМФ 1.5 ммоль/л, температура 40 °С, концентрации H_2O_2 1.5 моль/л.

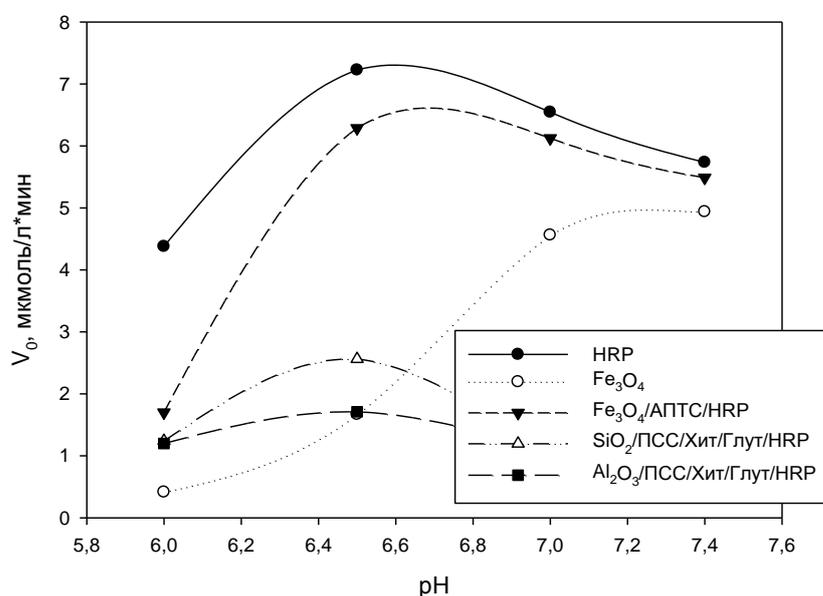


Рисунок 3.29 – Начальная скорость реакции окисления ТМФ при различных значениях рН ($c_0^{ТМФ} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(H_2O_2) = 1.5$ моль/л, $T = 40$ °С, $c_{кат} = 0.2$ г/л)

Кинетические кривые (рисунок 3.29) показывают, что оптимальным значением pH для процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии биокатализатора на основе HRP (для всех носителей) и нативной HRP является 6.5. Это свидетельствует о том, что иммобилизация на магнитные наночастицы Fe₃O₄ не вызвала сдвига оптимума pH, по сравнению с нативной HRP. В то время как при использовании магнитных наночастиц Fe₃O₄ без фермента скорость реакции увеличивается с увеличением значения pH.

3.2.4 Определение стабильности биокатализаторов

Для оценки стабильности синтезируемых биокатализаторов были выполнены 5 последовательных экспериментов окисления одними и теми же образцами (рисунок 3.30). Эксперименты проводились при первоначальном реакционном объеме 30 мл, концентрации биокатализатора 0.2 мг/мл, концентрации ТМФ 1.5 ммоль/л, температура 40 °С, pH 6.5, концентрации H₂O₂ 1.5 моль/л.

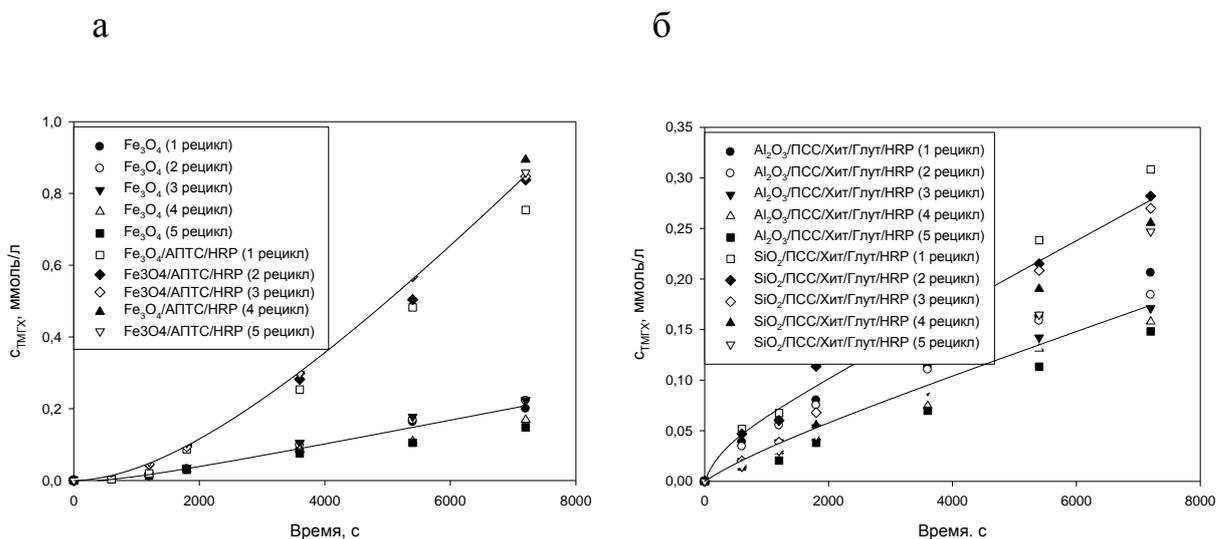


Рисунок 3.30 – Зависимость концентрации ТМГХ от количества рециклов биокаталитической реакции ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л, pH 6.5, $T = 40$ °С, $c_{\text{кат}} = 0.2$ г/л)

В результате стабилизации активных центров фермента иммобилизованная HRP становится наиболее стабильной. Кинетические кривые показывают, активность биокатализаторов на основе HRP, иммобилизованной на SiO_2 и Al_2O_3 снижается незначительно. Снижение активности может быть объяснено вымыванием фермента с поверхности носителя.

В случае HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 начальная скорость реакции сначала немного увеличивается, а затем уменьшается. Увеличение активности биокатализатора может быть вызвано увеличением количества активных центров фермента. Подобный эффект описан авторами [109] при иммобилизации HRP в гидрогель. Стабильность биокатализатора на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 подтверждается РФЭС исследованиями, поскольку сохраняются профили спектров высокого разрешения, энергий связи подуровней и состава после каталитического цикла.

3.2.5 Влияние времени реакции окисления 2,3,6-триметилфенола

С самым эффективным биокатализатором $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$ были проведены эксперименты по увеличению времени реакции (рисунок 3.31). Реакция проводилась в течение 5 часов.

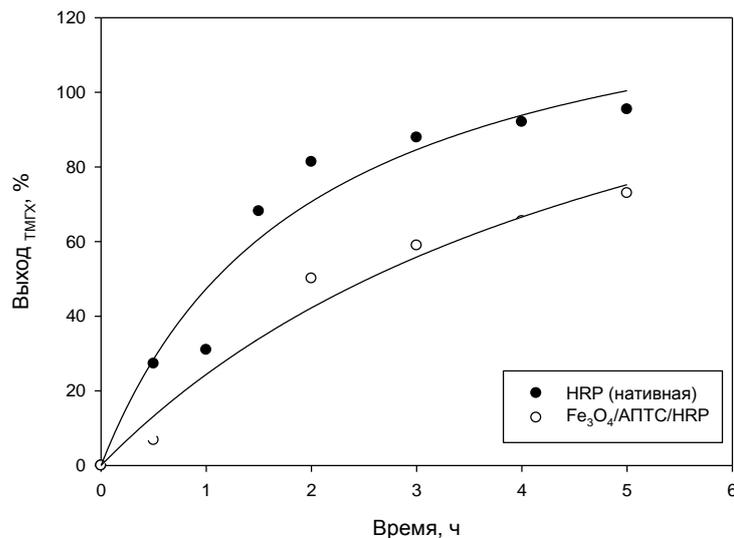


Рисунок 3.31 – Влияние времени реакции окисления ТМФ ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л, pH 6.5, $c_{\text{кат}} = 0.2$ г/л) на выход ТМГХ

Рисунок 3.31 показывает, что с увеличением времени до 5 часов выход продукта при использовании нативной HRP увеличивается практически до 100 %, при использовании биокатализатора выход достигает 72 %.

3.2.6 Исследование влияния типа растворителя на каталитическую активность пероксидазы

Известно [113], что ТМФ малорастворим в воде (1 г/л), поэтому были дополнительно проведены исследования по окислению ТМФ в присутствии иммобилизованной HRP в стандартных растворителях (рисунок 3.32).

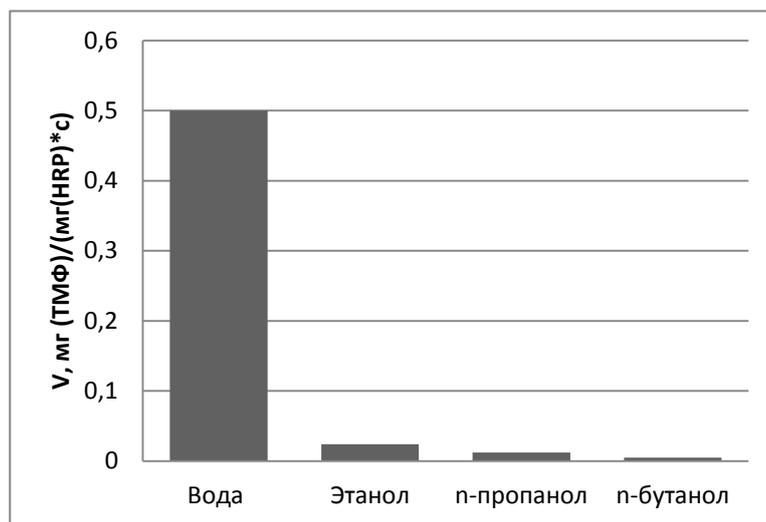


Рисунок 3.32 – Влияние типа растворителя на скорость окисления ТМФ в присутствии НРР ($T = 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_0^{\text{ТМФ}} = 0.5\text{ мг/мл}$, $c^{\text{НРР}} = 0.01\text{ мг/мл}$, $\text{pH } 6.5$)

В присутствии органических растворителей скорость окисления резко снижается, вследствие денатурации белковой молекулы фермента. Самая высокая скорость наблюдается с использованием этанола в качестве растворителя. Поэтому дополнительно было изучено влияние концентрации этанола на скорость окисления ТМФ в присутствии НРР (рисунок 3.33).

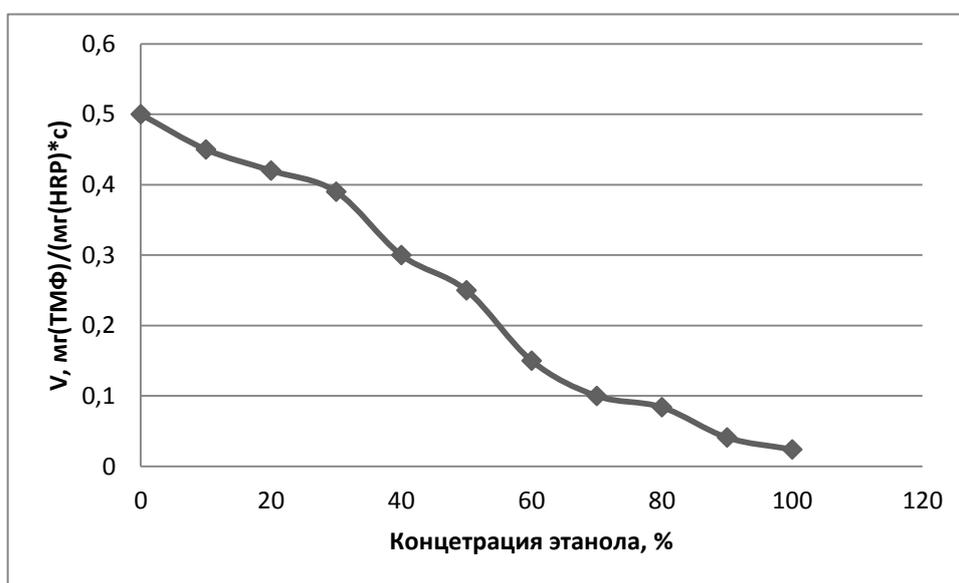


Рисунок 3.33 – Влияние концентрации этанола на скорость окисления ТМФ ($T = 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_0^{\text{ТМФ}} = 0.5\text{ мг/мл}$, $c^{\text{НРР}} = 0.01\text{ мг/мл}$, $\text{pH } 6.5$)

Рисунок 3.33 показывает, что при концентрации растворителя 25 %

достигается скорость окисления ТМФ $0.04 \text{ мг(ТМФ)/(мг(HRP)*с)}$, при этом растворимость ТМФ составляет 5 г/л. Поэтому эксперименты по окислению ТМФ в присутствии иммобилизованной HRP можно проводить в среде этанола с концентрацией 25 %.

3.2.7 Определение кинетических параметров синтезированных биокатализаторов

Кинетические эксперименты проводились при различных концентрациях ТМФ (для определения постоянных параметров уравнения Михаэлиса – Ментен) и фиксированных концентрациях фермента и перекиси водорода.

Для нахождения кинетических параметров V_{\max} и K_m использовался метод Лайнуивера – Берка. Константа Михаэлиса представляет собой константу диссоциации фермент - субстратного комплекса, так как при рассмотрении механизма использовали равновесную кинетику Михаэлиса - Ментена [114].

Кинетические параметры реакции окисления ТМФ, определенные по графику в координатах Лайнуивера – Берка (рисунок 3.34) приведены в таблице 3.7.

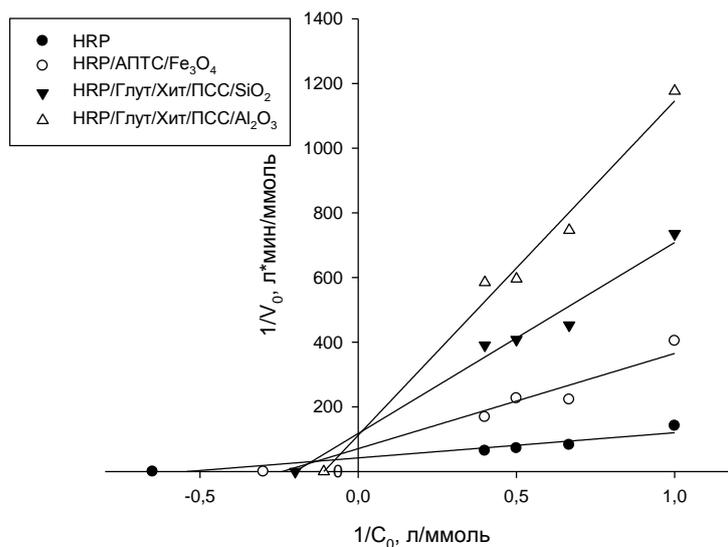


Рисунок 3.34 - Зависимость $1/V_0$ от $1/C_0$ в реакции окисления ТМФ для нативной HRP ($c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л, $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6.5$, $c_{\text{кат}} = 0.2$ г/л)

Таблица 3.7 – Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов

№	Катализатор	K_m , ммоль/л	V_{max} , ммоль/л·мин	Активность, ед.акт./г(кат)
1	HRP	1.78	0.024	0.346
2	$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$	4.15	0.014	0.237
3	$\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$	5.02	0.009	0.218
4	$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$	9.19	0.009	0.180

Из таблицы 3.7 видно, что нативная HRP имеет самую маленькую K_m 1.78 ммоль/л и самую большую V_{max} 0.024 ммоль/л·мин и активность 0.346 ед.акт./г(кат.). Следующим по эффективности биокатализатором является биокатализатор на основе HRP, иммобилизованная на магнитные наночастицы Fe_3O_4 , для которого K_m 4.15 ммоль/л, V_{max} 0.014 ммоль/л·мин и активность 0.237 ед.акт./г(кат.). Фермент, иммобилизованный на SiO_2 и Al_2O_3 имеет сравнительно высокие значения K_m 5.02 и 9.19 ммоль/л и невысокие значения V_{max} 0.009 и 0.009 ммоль/л·мин и активность 0.218 и 0.180 ед.акт./г(кат.) соответственно. Невысокие значения активностей для

биокатализаторов на основе SiO_2 и Al_2O_3 по сравнению с биокатализатором на основе Fe_3O_4 могут быть связаны с меньшим количеством пришитого фермента, а также изменением его конформации, вследствие иммобилизации.

Снижение активности для иммобилизованной HRP по сравнению с нативной HRP можно объяснить изменением термодинамических параметров [76, 115]. Для нахождения этих параметров проводилась серия экспериментов определению зависимости константы скорости данной реакции от температуры для нативного фермента и HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 (рисунок 3.35).

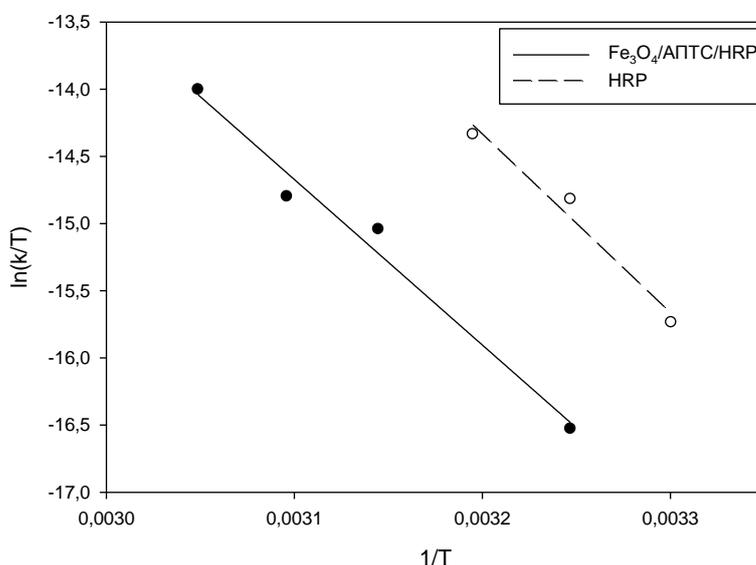


Рисунок 3.35 – Определение параметров температурной зависимости для нативной HRP и HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 ($T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, $c_0^{\text{TMФ}} = 0.5$ мг/мл, $c^{\text{HRP}} = 0.01$ мг/мл, pH 6.5)

В соответствии с рисунками 1 и 2 были определены термодинамические параметры ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger . Для нативной HRP $\Delta S^\ddagger = 36,4$ Дж/моль·К и $\Delta H^\ddagger = 110,5$ кДж/моль. Для HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 $\Delta S^\ddagger = 2,38$ Дж/моль·К и $\Delta H^\ddagger = 102,45$ кДж/моль. Уменьшение ΔS^\ddagger для HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 может быть связано с потерей степеней свободы вследствие иммобилизации, соответственно потерей доступности каталитического центра и снижением активности иммобилизованной HRP.

3.3 Гипотеза о механизме протекания процесса окисления 2,3,6-триметилфенола

Для описания кинетики реакции окисления ТМФ используют одноэлектронный механизм окисления субстратов (рисунок 3.36) [20; 116 – 119].

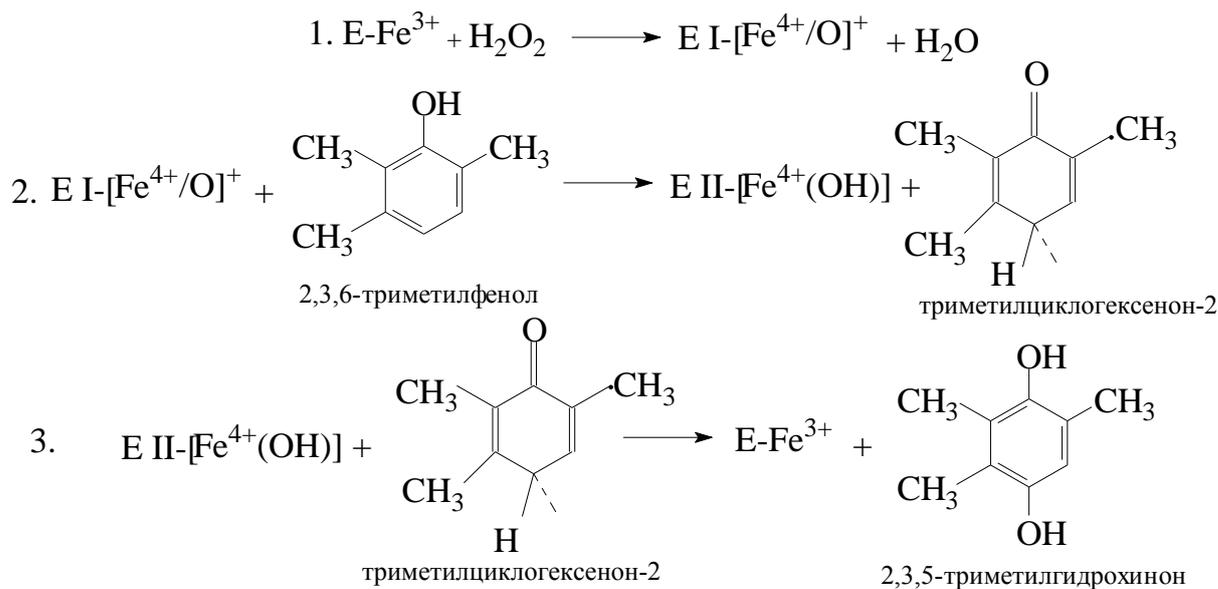


Рисунок 3.36 – Механизм реакции окисления триметилфенола до триметилгидрохинона пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена

На первом этапе каталитического окисления ТМФ является образование комплекса между железом фермента (активным центром) и пероксидом водорода. После иммобилизации фермента на неорганическую подложку происходит уменьшение доступности активных центров [119] (рисунок 3.37) HRP, что приводит к снижению энтропии активации ΔS^\ddagger по сравнению с нативной пероксидазой (расчеты ΔS^\ddagger для нативного и иммобилизованного фермента представлены выше).

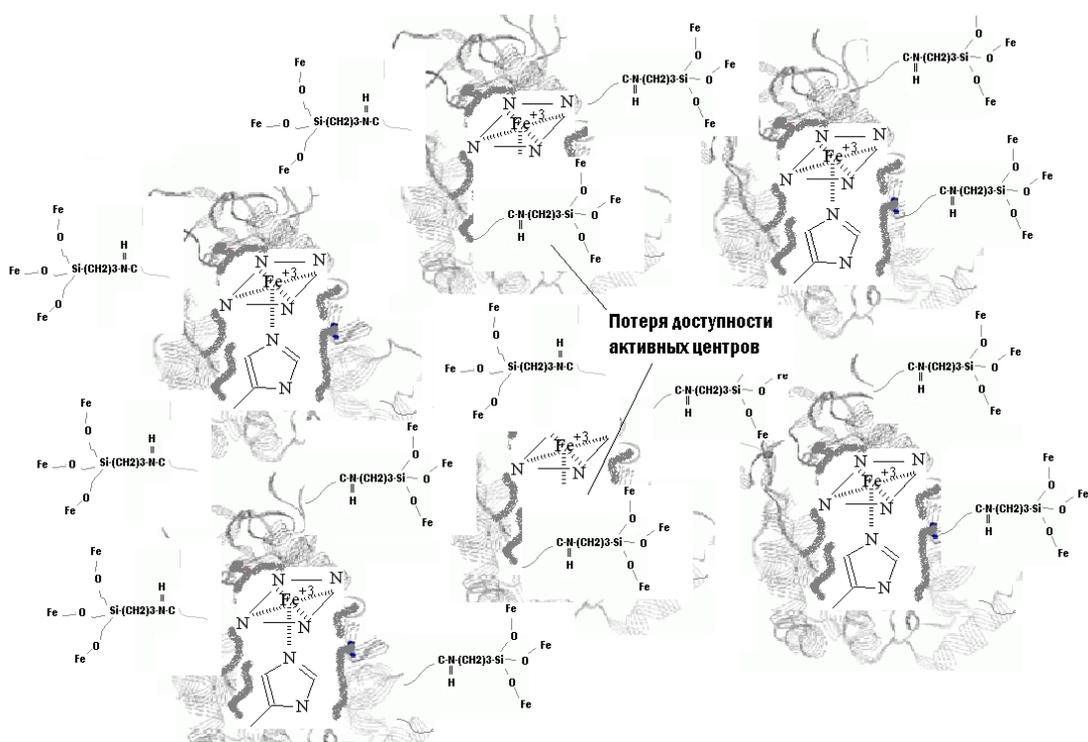


Рисунок 3.37 – Перекрытие доступных активных центров вследствие иммобилизации HRP на неорганический носитель

На втором этапе происходит атака субстрата пероксидом водорода, активированным HRP. Таким образом, образуется ферментсубстратный комплекс, включающий в себя активную гидроксильную группу и резонансную структуру триметилциклогексанона. Заключительном этапом процесса окисления ТМФ является взаимодействие между активной формой триметилцклогексанона и гидроксильной группой, входящей в состав активированной формы фермента. В результате такого процесса окисления происходит восстановление нативной формы фермента и образование конечного продукта – ТМГХ. Исследования, проведенные Dawson J., свидетельствуют о том, что лимитирующей стадией реакции является именно атака фермента на фенольный субстрат [120].

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Синтезирован магниторазделяемый биокатализатор на основе пероксидазы, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 .
2. Осуществлен синтез магнитных наночастиц Fe_3O_4 . Полученные полиольным способом наночастицы обладают достаточно высокой намагниченностью и образуют упорядоченные кластеры.
3. По данным ИК спектроскопии сделан вывод о том, что фермент образует ковалентные связи с поверхностью носителей (SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_3O_4): 1) с модифицированными поверхностями SiO_2 , Al_2O_3 образуется азометиновая связь $\text{N}=\text{CH}$ (1634 см^{-1}); 2) с модифицированной хитозаном поверхностью Fe_3O_4 образуется пептидная связь CO-NH (1559 см^{-1}). Вследствие чего, биокатализаторы приобретают высокую стабильность.
4. Получено оптимальное соотношение состава биокаталитических систем на основе пероксидазы, иммобилизованной на традиционные носители SiO_2 , Al_2O_3 , а также на магнитные наночастицы Fe_3O_4 . Оптимальная концентрация компонентов биокатализатора на основе пероксидазы, иммобилизованной на поверхности SiO_2 : 0.25 г/л раствора ПСС; 0.15 г/л раствора хитозана; 0.2 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл пероксидазы. Оптимальная концентрация компонентов биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на поверхности Al_2O_3 : 0.5 г/л раствора ПСС; 0.2 г/л раствора хитозана; 0.3 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл пероксидазы. Оптимальная концентрация компонентов биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на Fe_3O_4 : 2 мкл/мл АПТС, 0.15 мг/мл пероксидазы.
5. Доказано, что биокатализатор имеет мезопористую структуру, что способствует лучшему закреплению фермента на носителе.
6. Впервые проведено биокаталитическое окисление ТМФ. Экспериментально подобраны оптимальные условия процесса окисления

2,3,6-триметилфенола в присутствии иммобилизованной пероксидазы: температура 40 °С, рН 6.5, концентрация ТМФ 1.5 ммоль/л.

7. Исследована кинетика биокаталитической реакции с участием пероксида водорода при различных концентрациях ТМФ. Найдены параметры уравнения Михаэлиса – Ментен. Для HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы: $K_m = 2.81$ ммоль/л, $V_{max} = 0.043$ ммоль/л·мин. Для HRP, иммобилизованной на SiO₂: $K_m = 5.02$ ммоль/л, $V_{max} = 0.009$ ммоль/л·мин. Для HRP, иммобилизованной на Al₂O₃: $K_m = 9.19$ ммоль/л, $V_{max} = 0.009$ ммоль/л·мин.

8. Предложена гипотеза механизма протекания реакции в присутствии иммобилизованной на неорганические носители пероксидазы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bonrath W., Eggersdorfer M., Netscher T. Catalysis in the industrial preparation of vitamins and nutraceuticals // *Catalysis Today*. 2007. 121. P. 45–57
2. Li Y., Liu W., Wu M., Yi Z., Zhang J. Oxidation of 2,3,5-trimethylphenol to 2,3,5-trimethylbenzoquinone with aqueous hydrogen peroxide in the presence of spinel CuCo_2O_4 // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2007. 261. P. 73–78
3. Н.Н.Трухан Исследование реакций селективного окисления органических соединений пероксидами в присутствии титан- и ванадий-содержащих мезопористых силикатных материалов: Дис. канд. хим. наук. Новосибирск: ИК СО РАН. 2003
4. Холдеева О.А. Селективное жидкофазное окисление молекулярным кислородом и пероксидом водорода в присутствии катализаторов «ион металла в неорганической матрице»: Дис. док. хим. наук. - Новосибирск: ИК СО РАН. 2006
5. Kholdeeva O. A., Ivanchikova I.D., Guidotti M., Ravasio N., Sgobba M., Barmatova M. V. How to reach 100% selectivity in H_2O_2 -based oxidation of 2,3,6-trimethylphenol to trimethyl-p-benzoquinone over Ti-Si-catalysts // *Catalysis Today*. 2009. № 141. P. 330-336
6. Способ получения 2,3,6-триметилбензохинона и катализатор для его осуществления: пат. 2164510 Рос. Федерация. № 2000105325/04 заявл.03.03.2000; опубл. 27.03.2001
7. Trukhan N.N., Romannikov V.N., Paukshtis E.A, Shmakov A.N., Kholdeeva O.A. Oxidation of 2,3,6-Trimethylphenol over Ti- and V-Containing Mesoporous Mesophase Catalysts: Structure–Activity/Selectivity Correlation // *Journal of Catalysis*. 2001. № 202. P. 110 - 117

8. Sorokin A. B., Tuel A. Heterogeneous oxidation of aromatic compounds catalyzed by metallophthalocyanine functionalized silicas // *New J. Chem.* 1999. № 23. P. 473-476
9. Sorokin A., Tuel A. Metallophthalocyanine functionalized silicas: catalysts for the selective oxidation of aromatic compounds // *Catal. Today.* 2000. № 57. P. 45-59
10. Способ получения замещенных хинонов, катализатор для его осуществления и способ получения катализатора: пат. 2196764 Рос. Федерация. № 2001108039/04, заявл. 26.03.2001; опубл. 20.01.2003.
11. Kholdeeva O.A., Ivanchikova I. D., Guidotti M., Ravasio N. Highly efficient production of 2,3,5-trimethyl-1,4-benzoquinone using aqueous H₂O₂ and grafted Ti(IV)/SiO₂ catalyst // *Green Chemistry.* 2007. № 9. P. 731-733
12. Холдеева О.А., Трухан Н.Н. Мезопористые титан-силикаты как катализаторы процессов жидкофазного селективного окисления органических соединений // *Успехи химии.* 2006. Т. 75. № 5. С. 460-483
13. Kholdeeva O. A., Ivanchikova I. D., Guidotti M., Ravasio N., Sgobba M., Barmatova M.V. How to reach 100% selectivity in H₂O₂-based oxidation of 2,3,6-trimethylphenol to trimethyl-p-benzoquinone over Ti.Si-catalysts // *Catalysis Today.* 2009. 141. 330-336
14. Kholdeeva O. A. et al. Environmentally Benign Oxidation of Alkylphenols to p-Benzoquinones: A Comparative Study of Various Ti-Containing Catalysts // *Topics in Catalysis.* 2014. Т. 57. №. 17-20. С. 1377-1384.
15. Cimen Y., Guan W., Wang C., et al. A mild and efficient oxidation of 2,3,6-trimethylphenol to trimethyl-1,4-benzoquinone in ionic liquids // *Catalysis Communications.* 2008. № 9. С. 1979 – 1981
16. Türk H. Oxidation of 2,3,6-trimethylphenol with potassium peroxymonosulfate catalyzed by iron and cobalt phthalocyanine

- tetrasulfonates in a methanol–water mixture // *Appl Catal A*. 2008. Vol. 340 P.52-58
17. Sun H., Harms K., Sundermeyer J. Aerobic Oxidation of 2,3,6-Trimethylphenol to Trimethyl-1,4-benzoquinone with Copper(II) Chloride as Catalyst in Ionic Liquid and Structure of the Active Species // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. P. 31
18. Андреева, В.А. Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
19. Биотехнология пероксидаз растений и грибов /Ред. А.М. Егоров. Итоги науки и техники. Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1992. Т. 36. 170 с.
20. Рогожин, В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. Спб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
21. Давыдова Г.Ф., Ермаков О.А., Панасенко А.И., Тищенко А.М. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза // *Химия растительного сырья*. 1998. №1. С. 15-18
22. Azevedo A., Martins V.C, Prazeres D.M. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology // *Biotechnology annual review*. 2003. V. 9: 199-247
23. Захарова Г. С., Упоров И. В., Тишков В. И. Пероксидаза из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гемма // *Успехи биологической химии*. 2011. Т. 51. с. 37–64
24. Ryan, Barry J. and Carolan, Neil and Ó'Fágáin, Ciarán Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches // *Trends in Biotechnology*. 2006. 24 (8). P. 355-363
25. Regalado C., Garcia-Almendarez B. E., Duarte-Vazquez M. A. Biotechnological applications of peroxidases // *Phytochemistry Reviews*. 2004. № 3. P. 243–256,
26. Oguchi T., Tawaki S., Uyama H., Kobayashi S. Soluble polyphenol // *Macromolecular Rapid Communication*. 1999. No 20. P. 401 – 405

27. Monier M., Ayad D.M., Wei Y., Sarhan A.A. Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010. № 46. P. 324 – 330
28. Александрова Е.Ю., Орлова М.А., Нейман П.Л. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильности к различным воздействиям // *Вестник Московского университета. Сер.2. Химия*. 2006. Т. 47. № 5. с. 350 – 352
29. Hamid M., Khalil-ur-Rehman Potential applications of peroxidases // *Food Chemistry*. 2009. V. 115. Issue 4, 15. P. 1177–1186
30. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. М.: Мир, 1982. Т.1. 392 с.
31. George P. Intermediate compound formation with peroxidase and strong oxidizing agents // *J Biol Chem*. 1953. № 201. P. 413–426
32. Everse J. The structure of heme proteins Compound I and II: some misconceptions // *Free Rad Biol Med*. 1998. № 24. P. 1338–1346
33. Tischer W., Wedekind F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications // *Topics in Current Chemistry*. 1999. Vol. 200. p. 96 – 126
34. Guisán, José M. Immobilization of Enzymes and Cells // *Series: Methods in Biotechnology*. 2006. Vol. 22. P. 449
35. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можяев В.В., Хмельницкий Ю.Л. Биотехнология: Учеб. Пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 7: Иммуобилизованные ферменты. М.: Высшая школа, 1987. 159 с.
36. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004. 296 с.
37. Sahare P., Ayala M., Vazquez-Duhalt R., Agrawal V. Immobilization of peroxidase enzyme onto the porous silicon structure for enhancing its activity and stability [Электронный ресурс] // *Nanoscale Research Letters*. 2014. 9:409 <http://www.nanoscalereslett.com/content/9/1/409>
38. Vasileva N., Godjevargova T., Ivanova D., Gabrovska K. Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer

- membrane in removing of phenol from water // *Int J Biol Macromol.* 2009. № 44. P. 190-194
39. Wang Y., Du J., Li Y. et al. A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2012. № 90. P. 62-67
40. Schmidt T. F., Caseli L., dos Santos D.S. Jr et al. Enzyme activity of horseradish peroxidase immobilized in chitosan matrices in alternated layers // *Materials Science and Engineering C.* 2009. № 29. P.1889 – 1892
41. Романовская И.И., Осейчук О.В., Севастьянов О.В., Давиденко Т.И. Имобилизация пероксидазы в поли-N-винилкапролактамах // *Вестник Одесского национального университета.* 2005. С. 49-53
42. Шерстюк С.Ф., Галаев И.Ю., Савицкий А.П., Кирш Ю.Э., Березин И.В. Поливинилкапролактамы – обратимо осаждаемый термополимер. Соосаждение белков // *Биотехнология.* 1987. № 2. С. 179-182
43. Каманина О.А., Рогова Т.В., Соколова О.А. Гетерогенные биокатализаторы на основе глюкооксидазы, иммобилизованной в золь-гель матрицу, как биораспознающие элементы биосенсоров // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки.* 2013. Вып. 1 с. 215 – 222
44. Myung Jin Shin Novel Sol-Gel Immobilization of Horseradish Peroxidase Employing a Detergentless Micro-Emulsion System // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2007. 12: 640-645
45. Polshettiwar V., Luque R., Fihri A. et al. Magnetically recoverable nanocatalysts // *American Chemical Society Chem. Rev.* 2011. № 111. P. 3036–3075
46. Laurent S., Forge D., Port M. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications // *Chem. Rev.* 2008. № 108. P. 2064–2110

47. Jadhav S.A., Bongiovanni R. Synthesis and organic functionalization approaches for magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles // *Adv. Mat. Lett.* 2012. № 3(5). P. 356-361
48. Cheng C., Xu F., Gu H. Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes // *New J. Chem.* 2011. № 35. P. 1072–1079
49. Губин С.П., Кокшаров Ю.А., Хомутов Г.Б., Юрков Г.Ю. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // *Успехи химии.* 2005. № 74. 6. с. 539 – 574.
50. Баранов Д. А., Губин С. П. Магнитные наночастицы: достижения и проблемы химического синтеза // *Наносистемы.* 2009. Т.1. №1-2. с. 129 – 147
51. Веролайнен Н.В., Журавлев О.Е., Ворончихина Л.И. Роль поверхностно-активных в синтезе и стабилизации магнитной жидкости на водной основе // *Вестник ТвГУ. Серия «Химия».* 2012. Вып. 14. С. 86 – 97
52. Wilson K.S., Harries L.A., Goff J.D. et al. A generalized method for magnetite nanoparticle steric stabilization utilizing block copolymers containing carboxylic acids // *European Cells and Materials.* 2002. Vol. 3. Suppl. 2. P. 206-209
53. Bee A., Massart R., Neveu S. J. Synthesis of very fine maghemite particles // *J. Magn. Magn. Mater.* 1995. 149:6-9
54. Huang P. M., Wang M. K. Formation chemistry and selected surface properties of iron oxides // *Adv. GeoEcol.* 1997. № 30. P. 241 - 270
55. Liu C., Huang P. M. Atomic force microscopy and surface characteristics of iron oxides formed in citrate solutions // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1999b. № 63. P. 65-72
56. Fauconnier N., Roger J., Pons JN. Adsorption of gluconic and citric acids on maghemite particles in aqueous medium // *Prog Colloid Polym Sci.* 1996. 100:212–6

57. Fauconnier N, Pons JN, Roger J, et al. Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid // *J Colloid Interface Sci.* 1997. 194(2):427–33
58. Denizot, B., Tanguy G., Hindre F. et al. Phosphorylcholine coating of iron oxide nanoparticles // *J. Colloid Interface Sci.* 1999. 209 (1):66
59. Mutin P. H., Guerrero G., Vioux A. Organic-inorganic hybrid materials based on organophosphorus coupling molecules: from metal phosphonates to surface modification of oxides // *C. R. Chim.* 2003. 6. - 1153
60. Yee C., Kataby G., Ulman G. et al. Self-Assembled Monolayers of Alkanesulfonic and -phosphonic Acids on Amorphous Iron Oxide Nanoparticles // *Langmuir.* 1999. № 15. P. 7111
61. Sahoo Y., Pizem H., Fried T. Alkyl Phosphonate/phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles: A Comparison with Fatty Acids // *Langmuir.* 2001. № 17. P. 7907
62. Sun Y., Duan L., Guo Z. An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2005. Vol. 285. Issue 1-2. P. 65-70
63. Mornet S., Portier J., Duguet E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran // *J Magn Magn Mater.* 2005. 293:127-134
64. Lin J., Zhou W., Kumbhar A. Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-Assembly // *Journal of Solid State Chemistry.* 2001. Vol. 159. Issue 1. P. 26–31
65. Преображенская М.Е., Декстраны и декстраназы. *Успехи биологической химии*, т. 16, М., 1975. с. 214
66. Schellenberger E. A., Bogdanov A. J., Hogemann D. et al. Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. // *Mol. Imaging.* 2002. № 1. P. 102

67. Bayramoglu G., Arica M. Y. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads // *Journal of Hazardous Materials*. 2008. № 156. P. 148-155
68. Ma M., Zhang Y., Yu W. et al. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2003. № 212. P. 219 - 226
69. Corgie S.C., Kahawong P., Duan X. et al. Self-Assembled Complexes of Horseradish Peroxidase with Magnetic Nanoparticles Showing Enhanced Peroxidase Activity // *Adv. Funct. Mater.* 2012. № 22. P. 1940–1951
70. Deepthi S.S., Prasad E., Reddy B. V. S. et al. Green Approach towards the Synthesis of Enantio Pure Diols Using Horse Radish Peroxidase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles // *Green and Sustainable Chemistry*. 2014. № 4. P. 15-19
71. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Academia, 2005. 480 с.
72. Минбаев В.У. Шиффовы основания. Алма-Ата: Наука, 1989. 140 с.
73. Веролайнен Н.В., Журавлев О.Е., Ворончихина Л.И. Исследование лимонной кислоты и ее солей в качестве стабилизаторов магнитной жидкости на водной основе // *Вестник ТвГУ. Серия "Химия"*. 2012. Вып. 13. С. 89-98
74. Венгреневич Р.Д., Москалюк А.В., Ярема С.В. Оствальдовское созревание в условиях смешанного типа диффузии // *Физика твердого тела*. 2007. Т. 49. Вып.1. с.13-18
75. Демин А. М., Уймин М. А., Мысик А. А., Ермаков А. Е., Краснов В. П. Поверхностная модификация наночастиц Fe₃O₄ производными аминокислот // XIV молодежная конференция по органической химии. Екатеринбург. 2011. С. 88-91.
76. Шмид Р., Сапунов В.Н. Неформальная кинетика. В поисках путей химических реакций: Пер. с англ. М.: Мир, 1985. 264 с.

77. Анализ поверхности методами Оже- и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии / под ред. Д. Бриггса и М.П. Сиха. М.: Мир, 1987. 598 с.
78. Драго Р. Физические методы в химии. Т. 1. Пер. с англ. М.: Мир, 1981. 424 с.
79. Драго Р. Физические методы в химии. Т. 2. Пер. с англ. М.: Мир, 1981. 456 с.
80. Жерновой А. И., Наумов В. Н., Рудаков Ю. Р. Получение кривой намагничивания дисперсии парамагнитных наночастиц путем нахождения намагниченности и намагничивающего поля методом ЯМР // Научное приборостроение. 2009. Т. 19. № 3. с. 57–61
81. Kuchkina N. V., Morgan D. G., Kostopoulou A. et. al Hydrophobic Periphery Tails of Polyphenylenepyridyl Dendrons Control Nanoparticle Formation and Catalytic Properties // American Chemical Society. 2014. № 26 (19). P. 5654–5663
82. Katumba G., Mwakikunga B. W., Mothibinyane T. R. FTIR and Raman Spectroscopy of Carbon Nanoparticles in SiO₂, ZnO and NiO Matrices // Nanoscale Res Lett. 2008. 3:421–426
83. Борило Л.П., Петровская Т.С., Лютова Е.С., Спивакова Л.Н. Синтез и физико-химические свойства тонкопленочных и дисперсных функциональных силикофосфатных материалов // Известия Томского политехнического университета. 2011. Т.39. №3. с. 43 – 47
84. Нестеренко Н.П., Нестеренко Е.П., Иванов А.В. Модифицирование поверхности кремнезема оксидом алюминия // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. Т. 42. № 2. с. 106 – 108
85. Вяткина О.В. Влияние природы подложки на механизм сорбции пероксидазы редьки черной // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2012. Т. 25 (64). № 4. С. 239 – 247

86. Киселев А.В., Лыгин В.И. Инфракрасные спектры поверхностных соединений и адсорбционных веществ. М.: Наука, 1972. 459 с.
87. Гартман О.Р., Воробьева В.М. Технология и свойства хитозана из рачка гамарус/Фармацевтические науки. №6. 2013. 1188-1192 с.
88. Сильверстейн Р., Вебстер Ф., Кимл Д. Спектрофотометрическая идентификация органических соединений. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 557 с.
89. Ghezelbash Z., Ashouri D., Mousavian S. Surface modified Al₂O₃ in fluorinated polyimide/Al₂O₃ nanocomposites: Synthesis and characterization // Bull. Mater. Sci. 2012. Vol. 35. № 6. P. 925–931
90. Чукин Г.Д. Строение оксида алюминия и катализаторов гидрообессеривания. Механизмы реакций. М.: Типография Паладин, ООО «Принта», 2010. 288 с.
91. Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений. М.: Мир, 1966. 411 с.
92. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. Пер. с англ. М.: Мир, 1965. 219 с.
93. Kergaravat S.V., Pividori M.I., Hernandez S.R. Hernandez Evaluation of seven cosubstrates in the quantification of horseradish peroxidase enzyme by square wave voltammetry // Talanta. 2012. № 88. P. 468– 476
94. Pramparo L., Stuber F., Font J. et al. Immobilisation of horseradish peroxidase on Eupergit C for the enzymatic elimination of phenol // Journal of Hazardous Materials. 2010. № 177. P. 990 – 1000
95. Позднякова Ю. М., Ковалев Н.Н., Чепкасова А.И. Зависимость сорбции протеолитических ферментов от вязкости хитозанов различного происхождения // Известия ТИНРО. 2013. Т. 175. С. 291 – 298
96. Веселова И.А., Кирейко А.В., Шеховцова Т.Н. Повышение каталитической активности и стабильности пероксидазы хрена за счет

- включения ее в полиэлектролитный комплекс с хитозаном // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. № 2. Т. 45. С. 143 – 148
97. Schmid Th., Caseli L., D.S. dos Santos jr., O.N. Olivera Jr. Enzyme activity of horseradish peroxidase immobilized in chitosan matrices in alternated layers / Materials Science and Engineering C. 2009. № 29. P. 1889 – 1892
98. Miao Y., Tan S.N. Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Immobilization of Peroxidase in Chitosan Matrix Crosslinked with Glutaraldehyde // Analyst. 2000. № 125. P. 1591-1594
99. NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, Version 3.5 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, 2003) [Электронный ресурс] / Электрон. дан. – [Б.м. 2003]. – Режим доступа: <http://srdata.nist.gov/xps/>
100. Грег С., Синг К. Адсорбция Удельная поверхность и Пористость. М.: Мир, 1984. С. 311
101. Zhang S., Wu W., Xiao X. et al. Preparation and characterization of spindle-like Fe₃O₄ mesoporous nanoparticles // Nanoscale Research Letters. 2011. 6:89
102. Промышленный катализ в лекциях № 3 2006 / под ред. проф. А.С. Носкова. М.: Калвис, 2006. 128 с.
103. Chen C.-C., Do J.-S., Gu Y. Immobilization of HRP in Mesoporous Silica and Its Application for the Construction of Polyaniline Modified Hydrogen Peroxide Biosensor // Sensors. 2009. № 9. P. 4635-4648
104. Оура К., Лифшиц В. Г., Саранин А. А. и др. Введение в физику поверхности / Под ред. В. И. Сергиенко. М.: Наука, 2006. 490 с.
105. Краснов К.С., Воробьев Н.К., Годнев И.Н. и др. Физическая химия. В 2 кн. Кн.2. Электрохимия. Химическая кинетика и катализ. Учеб. для вузов.; Под ред. К.С. Краснова, 3-е изд., испр. М.: Высш.шк., 2001. 319 с.

106. Yu. F., Huang Y., Cole A. J., Yang C. The artificial peroxidase activity of magnetic iron oxide nanoparticles and its application to glucose detection // *Biomaterials*. 2009. № 30. P. 4716 – 4722
107. Березов Т. Т. Биологическая химия: Учебник.– 3-е изд., перераб. и доп./ Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М.: Медицина, 1998. 704 с.
108. Xu Q., Mao C., Liu N.-N., Zhu Jun-Jie, Shen J. Immobilization of horseradish peroxidase on O-carboxymethylated chitosan/sol–gel matrix// *Reactive & Functional Polymers*. 2006. № 66. P. 863–870
109. Пестовский Ю. С. Иммуобилизация пероксидазы хрена в гидрогеле и микрочастицах альгината кальция // *Научный журнал КубГАУ*. 2013. №92(08)
110. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: Медицинское информационное агентство, 2004. 566 с.
111. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии: Учеб. пособие для мед. Вузов. М.: Высш.шк. 1988. 239 с.
112. Рогожин В.В., Перетолчин Д.В. Кинетика оксидазного окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена // *Вестник Южно-Уральского государственного университета*. Серия: Химия. 2010. № 11 (187). с. 61 – 65
113. Yalkowsky S.H., Yan H. *Handbook of aqueous solubility data*. - CRC Press, 2003. - С. 594
114. Ламберова М.Э. Ферментативная кинетика: учебное пособие. В 2 ч. Ч. 1; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. 76 с.
115. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.
116. Savenkova M.I., Newmyer Sh. L., P. R. Ortiz de Montellano, Rescue of His-42 3 Ala Horseradish Peroxidase by a Phe-41 3 His Mutation, *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, No. 40, Issue of October 4, pp. 24598–24603, 1996

117. Henriksen A., Smith A. T., Gajhede M. The Structures of the Horseradish Peroxidase C-Ferulic Acid Complex and the Ternary Complex with Cyanide Suggest How Peroxidases Oxidize Small Phenolic Substrates, *The J. of Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. No. 49. Dec. 3. P. 35005–35011
118. Метелица Д.И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984. 293 с.
119. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы: Пер. с англ./Под ред. Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988. 215 с.
120. Dawson J. Probing Structure-Function Relations in Heme-Containing Oxygenases and Peroxidases // *Science*. 1988. Vol. 240. P. 433