

УДК 544.478.3

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ
ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ ДИОКСИДЕ ТИТАНА
ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА**

**PHYSICO-CHEMICAL STUDY OF BIOCATALYST ON THE BASIS
OF THE HORSERADISH PEROXIDASE IMMOBILIZED
ON THE MODIFIED TITANE DIOXIDE**

©**Тихонов Б. Б.**

канд. хим. наук

Тверской государственной технической университет
г. Тверь, Россия, tiboris@yandex.ru

©**Tikhonov B.**

Ph.D., Tver State Technical University
Tver, Russia, tiboris@yandex.ru

©**Стадольникова П. Ю.**

Тверской государственной технической университет
г. Тверь, Россия, science@science.tver.ru

©**Stadolnikova P.**

Tver State Technical University
Tver, Russia, science@science.tver.ru

©**Сидоров А. И.**

канд. хим. наук

Тверской государственной технической университет
г. Тверь, Россия, science@science.tver.ru

©**Sidorov A.**

Ph.D., Tver State Technical University
Tver, Russia, science@science.tver.ru

©**Сулман Э. М.**

д-р хим. наук,

Тверской государственной технической университет
г. Тверь, Россия, sulman@online.ru

©**Sulman E.**

Dr. habil., Tver State Technical University
Tver, Russia, sulman@online.ru

Аннотация. В работе приведены данные по синтезу и исследованию физико-химических свойств многокомпонентного биокатализатора на основе пероксидазы хрена, иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана (TiO₂). Для модификации диоксида титана использовались соляная кислота, хитозан, аминопропилтриэтоксисилан и глутаровый диальдегид. Пероксидаза хрена получена экстракцией из корня хрена (*Armoracia rusticana*) с последующим центрифугированием и отделением фильтрата. Иммобилизация фермента проводилась методом последовательного нанесения с промежуточной промывкой дистиллированной водой от неспецифически связанных реагентов. С целью подтверждения наличия функциональных группировок, вносимых с модифицирующими агентами, образцы частиц модифицированного диоксида титана и биокатализатора исследовались с помощью

инфракрасной Фурье–спектроскопии. Результаты исследования биокатализатора методом инфракрасной Фурье–спектроскопии иллюстрируют наличие необходимых для прочной ковалентной сшивки функциональных групп, что подтверждает эффективность выбранного метода модификации неорганического носителя. Результаты исследования биокатализатора методом низкотемпературной адсорбции азота показали, что выбранный метод модификации неорганического носителя повышает реакционную способность поверхности носителя и способствует максимальной доступности активных центров иммобилизованных ферментов. В статье впервые экспериментально подтверждена структура многокомпонентного биокатализатора на основе пероксидазы хрена, иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана (TiO_2). Все гипотезы и выводы, изложенные в статье, основаны на данных научно–технической литературы, посвященных методам иммобилизации ферментов, методам модификации неорганических носителей, основным закономерностям инфракрасной Фурье–спектроскопии и низкотемпературной адсорбции азота.

Abstract. In this work, the synthesis and study of the physics–chemical catalytic properties of the multicomponent biocatalyst based on the horseradish peroxidase immobilized on the modified titanium dioxide (TiO_2) were carried out. Hydrochloric acid, chitosan, aminopropyltriethoxysilane and glutaric dialdehyde were used in order to modify the titanium dioxide. The horseradish peroxidase was obtained by extraction of the horseradish root (*Armoracia rusticana*) with the following centrifugation and separation of the filtrate. Immobilization of enzyme was performed by sequential application method with intermediate washing with distilled water from the non-specifically bounded reagents. In order to confirm the presence of the functional groups formed by the modifying agents the samples of the modified titanium dioxide and biocatalyst were analyzed by FTIR–spectroscopy. The results of FTIR–study illustrate the presence of functional; groups required for the covalent bonding. This confirms the effectivity of the method chosen for the modification of inorganic support. The study of the biocatalyst by the method of low–temperature nitrogen physisorption shows that the support modification by the chosen method increases the reactivity of the surface and promotes the maximal accessibility of the active sites of the immobilized enzymes. In this paper, the experimental confirmation of the structure of the multicomponent biocatalyst on the basis of the horseradish peroxidase immobilized on the modified TiO_2 is shown for the first time. All hypotheses and conclusions expressed in this paper are based on scientific and technical literature on methods of immobilization of enzymes, methods of inorganic carriers modifying, the scientific basis of FTIR–spectroscopy and low-temperature nitrogen physisorption.

Ключевые слова: биокатализаторы, оксидоредуктазы, пероксидаза хрена, диоксид титана, иммобилизация.

Keywords: biocatalysts, oxidoreductases, horseradish peroxidase, titanium dioxide, immobilization.

Разработка и исследование свойств биокатализаторов окисления органических соединений на основе иммобилизованных ферментов является актуальной задачей современной химической технологии. Ранее коллективом авторов был проведен синтез и исследование каталитических свойств многокомпонентного биокатализатора на основе пероксидазы хрена (*Armoracia rusticana*), иммобилизованной на модифицированном соляной кислотой, хитозаном, аминопропилтриэтоксисиланом и глутаровым диальдегидом диоксиде титана (TiO_2) [1, с. 86]. В данной работе были исследованы физико–химические свойства синтезированного данным методом биокатализатора высокоэффективными методами

физико-химического анализа (инфракрасной Фурье-спектроскопии диффузионного отражения и низкотемпературной адсорбции азота), позволяющие сделать выводы о строении биокатализатора и эффективности его ковалентной сшивки его компонентов.

Материалы и методики

В работе использовали следующие реактивы и материалы: диоксид титана (TiO_2 , ООО «ЛДХим»); соляная кислота (HCl , ЗАО «Купавнареактив»); хитозан низкой вязкости (Fluka); аминопропилтриэтоксисилан (АПТЭС, Sigma-Aldrich); этанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, ЗАО «Купавнареактив»); глутаровый диальдегид (GA, 25%, Acros Organics); калий фосфорнокислый 1-замещенный (KH_2PO_4 , «Невареактив»); гидроксид натрия (NaOH , «Реахим»); сердцевина корня хрена обыкновенного (*Armoracia Rusticana*).

Для приготовления фосфатного буферного раствора с $\text{pH}=7,0$ в мерную колбу вместимостью 1 л вносили 500 мл 0,1 М раствора KH_2PO_4 (13,6 г/л) и 291 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия и доводили до метки дистиллированной водой. Раствор хранился в течение месяца. Для приготовления 0,2%-ного раствора хитозана 0,2 г хитозана вносили в химический стакан и растворяли в 5 мл 0,1 н. раствора HCl при легком нагревании и постоянном перемешивании, после чего полученный гель переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Для приготовления 5% раствора АПТЭС 5 мл АПТЭС вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки 96%-ным этанолом. Для приготовления 2% раствора глутарового диальдегида 8 мл 25%-ного глутарового диальдегида вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Для выделения пероксидазы из сердцевины корня хрена (*Armoracia rusticana*) свежую сердцевину корня хрена измельчали, после чего экстрагировали навеску дезинтегрированного корня хрена фосфатном буфере с $\text{pH} = 7,0$ (4 г на 30 мл буферного раствора) в течение 1 часа при непрерывном перемешивании. Затем полученную смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 минут, после чего центрифугат фильтровали на микропористом фильтре. Полученный экстракт обладал пероксидазной активностью. До проведения экспериментов экстракт смешивался с экстрактом глюкозооксидазы и хранился в холодильнике при температуре 3 ± 1 °С.

Иммобилизацию пероксидазы хрена и глюкозооксидазы проводили следующим образом. Навеску диоксида титана последовательно выдерживали при постоянном перемешивании в 0,1 н. растворе соляной кислоты (1 час), растворе хитозана (1 час), растворе АПТЭС (1 час), глутаровом диальдегиде (24 часа) и ферментативном экстракте (1 час) с промежуточной промывкой дистиллированной водой и фильтрованием на фильтре Шотта. После иммобилизации биокатализатор высушивали на воздухе до постоянной массы и хранили в холодильнике при температуре 3 ± 1 °С до использования.

Для исследования инфракрасных спектров полученных модифицированных титановых частиц и биокатализатора использовался ИК-Фурье спектрофотометр IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония) с приставкой диффузионного отражения. Для анализа были приготовлены 5 образцов различного состава (полученных в соответствии с методикой, описанной выше): $\text{TiO}_2 - \text{HCl}$, $\text{TiO}_2 - \text{HCl} - \text{Хитозан}$, $\text{TiO}_2 - \text{HCl} - \text{Хитозан} - \text{APTES}$, $\text{TiO}_2 - \text{HCl} - \text{Хитозан} - \text{APTES} - \text{GA}$, $\text{TiO}_2 - \text{HCl} - \text{Хитозан} - \text{APTES} - \text{GA} - \text{HRP}$. Каждый образец иллюстрирует определенный этап модификации в процессе получения гетерогенного биокатализатора. Образцы измельчали, полученный порошок помещался в кювету и проводилось исследование спектров в диапазоне $4500-500$ cm^{-1} . Инфракрасный спектр исходного TiO_2 снимался относительно воздуха, для всех остальных спектров в качестве фона использовался исходный спектр TiO_2 с целью более точного анализа взаимодействий компонентов каталитической системы.

Определение поверхностных характеристик модифицированных частиц диоксида титана и биокатализатора (площадь поверхности и распределение пор по размерам) проводилось с помощью анализатора площади поверхности и распределения пор по размерам Beckman Coulter™ SA 3100™ (США) и прибора подготовки образцов Beckman Coulter™ SA-PREP™ (США). Для подготовки образца на SA-PREP™ навеска образца (0,1–3,0 г) помещалась в кварцевую предварительно взвешенную кювету, которая устанавливалась в прибор подготовки образца SA-PREP™, проводилась сушка в течение 60 мин в токе азота особой чистоты (99,999%) при температуре 80 °С, далее проводилась дегазация образца при температуре 100 °С и вакууме (1,00 мм рт. ст.), кювета охлаждалась, взвешивалась и устанавливалась в аналитический порт.

Результаты и их обсуждение

С целью подтверждения наличия функциональных группировок, вносимых с модифицирующими агентами, образцы частиц модифицированного диоксида титана и биокатализатора исследовались с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии (Рисунок 1). Расшифровка основных группировок приведена в Таблице 1.

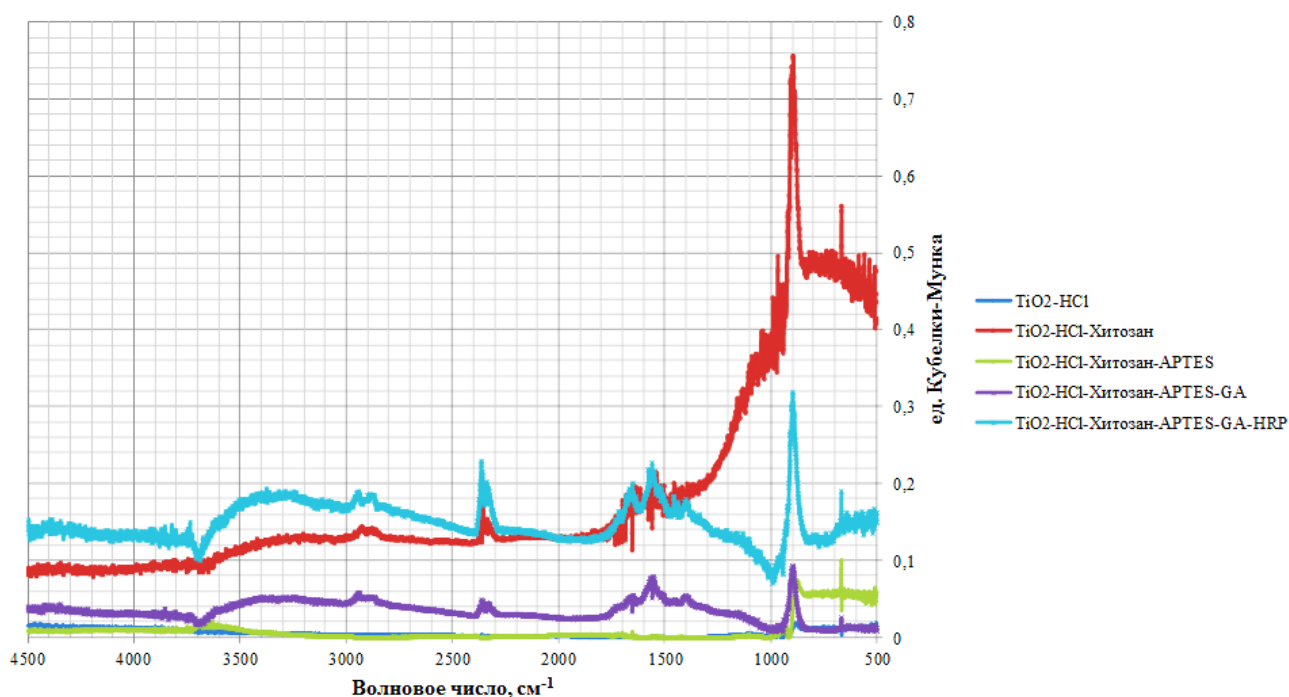


Рисунок 1. Инфракрасный спектр (диапазон 4500–500 см⁻¹) образцов биокатализатора на разных стадиях модификации

Обладающий высокими электростатическими характеристиками ион титана поляризует адсорбированные молекулы воды, что и приводит к появлению ионов оксония. Образование при диссоциативной хемосорбции воды ионов Н⁺ и ОН⁻ указывает на способность к такому взаимодействию координационно насыщенных атомов титана поверхности [2, с. 184]. Таким образом, было подтверждено наличие необходимых функциональных групп. Силановые группировки на поверхности титановых частиц, азотистая связь между хитозановыми и белковыми аминогруппами и альдегидными группами свидетельствуют о прочной ковалентной пришивке между компонентами каталитической системы. Наличие большого количества альдегидных групп свидетельствует об их избытке по сравнению с аминогруппами хитозана, АРТЕS и пероксидазы хрена.

В качестве носителя для ферментов был использован диоксид титана, который обладает небольшой удельной поверхностью 25,9 м²/г и широким распределением пор по размерам. В ходе определения исследования поверхностных характеристик катализаторов методом низкотемпературной адсорбции азота были получены изотермы адсорбции и распределение удельной площади и объема пор в зависимости от их диаметра для образцов, полученных последовательным нанесением компонентов биокатализатора на носитель. Полученные при исследовании изотермы адсорбции относятся к I типу (IUPAC), характерному для непористых поверхностей, для их анализа применяется метод, основанный на сравнении полученных данных с эталоном (t-график). Результаты исследования поверхностных характеристик образцов представлены в Таблице 2 и на Рисунке 2.

Таблица 1.

ОБНАРУЖЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППИРОВКИ ОБРАЗЦОВ

Образец	Характеристические частоты поглощения, см ⁻¹	Расшифровка
TiO ₂	1600–1800 2300–2400	Полосы поглощения указывают на присутствие в структуре иона гидроксония H ₃ O ⁺
	2900–3000 3500–3800	Полосы поглощения указывают на гидроксо-группы OH ⁻
	940–950	Пик поглощения свидетельствует о присутствии в образце адсорбированной воды и OH ⁻ -групп
	500–900	Широкая диффузная полоса поглощения, имеющая несколько максимумов, указывает на колебания октаэдра TiO ₆
TiO ₂ -HCl	890–900	Увеличенная интенсивность пика поглощения свидетельствует о присутствии в образце OH ⁻ групп в большем количестве, чем в исходном образце
TiO ₂ -HCl-Хитозан	925 891	Колебательный (925см ⁻¹) и деформационный (891 см ⁻¹) пики принадлежат пиранозным кольца аминоклюкозных остатков
	1555–1675	Полосы характеризуют наличие NH ₃ ⁺ -группы хитозана
TiO ₂ -HCl-Хитозан-APTES	928	Пик связи — O-Si
TiO ₂ -HCl-Хитозан-APTES-HRP	1500–1700	Интенсивные пики (1630 и 1680 см ⁻¹) указывают на образование азометиновой связи (1680 и 1630 см ⁻¹) альдегидных групп GA и аминоклюкозных остатков хитозана
	1725	Пики свободных альдегидных групп, непрореагировавших с аминоклюкозными группами

Таблица 2.

УДЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДЬ ПОВЕРХНОСТИ И ОБЪЕМ ПОР ОБРАЗЦОВ

Показатель	Образец					
	TiO ₂	TiO ₂ - HCl	TiO ₂ - HCl - Хитозан	TiO ₂ - HCl - Хитозан - APTES	TiO ₂ - HCl - Хитозан - APTES - GA	TiO ₂ - HCl - Хитозан - APTES - GA - HRP
Общий объем пор, мл/г	0,0232	0,0107	0,0115	0,0168	0,0155	0,0171
Площадь поверхности (модель t-Plot), м ² /г	25,846	10,54	10,374	15,916	15,329	17,183

Как видно из Таблицы 2, модификация диоксида титана соляной кислотой приводит к существенному снижению как объема пор, так и удельной площади поверхности, что связано с разрушением макрочастиц диоксида титана на более мелкие. Дальнейшее нанесение на эту систему хитозана не приводит к существенным изменениям поверхностных характеристик образцов, однако снижается доля микропор (диаметр до 6 нм) и увеличивается доля макропор (20–80 нм). Последующее добавление в систему 3-аминопропил–триэтоксисилана приводит к увеличению в 1,5 раза удельной поверхности и общего объема пор, что существенно повышает реакционную способность поверхности носителя (за счет большей поверхности и наличия на ней функциональных групп), а также существенно снижается доля микропор (диаметр до 6 нм) и увеличивается доля макропор (20–80 нм). Нанесение на поверхность глутарового диальдегида и фермента не приводит к значительным изменениям объема пор и удельной площади поверхности, однако снижает долю макропор (20–80 нм) и увеличивает долю микропор (до 6 нм).

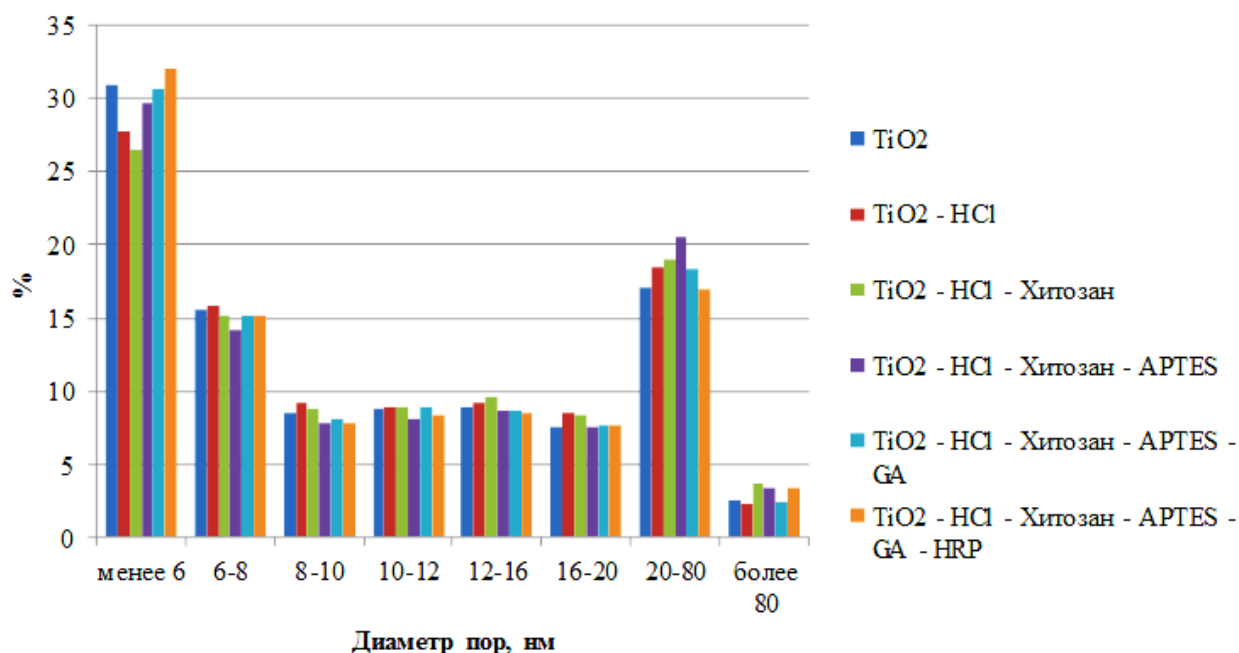


Рисунок 2. Распределение пор в образцах по размерам

Таким образом, результаты исследования биокатализатора методом низкотемпературной адсорбции азота показали, что последовательное нанесение компонентов на диоксид титана приводит к формированию гетерогенного катализатора, в котором в виде отдельных молекул или двумерных кластеров с помощью азометиновой связи и ион–ионного взаимодействия присоединен активный компонент (фермент), при этом не происходит образования объемной структуры («хитозановой поверхности»), что способствует максимальной доступности активных центров иммобилизованных ферментов.

Выводы

Был проведен синтез и исследование каталитических свойств многокомпонентного биокатализатора на основе пероксидазы хрена (*Armoracia rusticana*), иммобилизованной на модифицированном соляной кислотой, хитозаном, аминопропилтриэтоксисиланом и глутаровым диальдегидом диоксиде титана (TiO₂). Результаты исследования биокатализатора методом инфракрасной Фурье–спектроскопии иллюстрируют наличие

необходимых для прочной ковалентной сшивки функциональных групп, что подтверждает эффективность выбранного метода модификации неорганического носителя. Результаты исследования биокатализатора методом низкотемпературной адсорбции азота показали, что выбранный метод модификации неорганического носителя повышает реакционную способность поверхности носителя и способствует максимальной доступности активных центров иммобилизованных ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 15-08-00534).

Список литературы:

1. Тихонов Б. Б., Стадольникова П. Ю., Сидоров А. И., Сульман Э. М., Логачева А. И. Окисление 4-хлорфенола иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана пероксидазой хрена // Бюллетень науки и практики. 2016. №11 (12). С. 80-89. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/tikhonov-stadolnikova> (дата обращения 15.10.2017). DOI: 10.5281/zenodo.166787.
2. Кострикин А. В., Кузнецова Р. В., Косенкова О. В., Меркулова А. Н., Линько И. В. ИК-спектр гидратированного диоксида титана // Университет им. В. И. Вернадского. 2007. №2 (8). С. 181-186.

References:

1. Tikhonov, B., Stadolnikova, P., Sidorov, A., Sulman, E., & Logacheva, A. (2016). Oxidation 4-chlorophenol immobilized on the modified dioxide of the titanium horseradish peroxidase. *Bulletin of Science and Practice*, (11), 80-89. doi:10.5281/zenodo.166787. (in Russian)
2. Kostrikin, A. V., Kuznetsova, R. V., Kosenkova, O. V., Merkulova, A. N., & Linko, I. V. (2007). The IR spectrum of hydrated titanium dioxide. *University of V. I. Vernadsky*, (2). 181-186. (in Russian)

*Работа поступила
в редакцию 23.11.2017 г.*

*Принята к публикации
28.11.2017 г.*

Ссылка для цитирования:

Тихонов Б. Б., Стадольникова П. Ю., Сидоров А. И., Сульман Э. М. Физико-химические исследования биокатализатора на основе иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана пероксидазы хрена // Бюллетень науки и практики. Электрон. журн. 2017. №12 (25). С. 98-104. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/tikhonov-bb> (дата обращения 15.12.2017).

Cite as (APA):

Tikhonov, B., Stadolnikova, P., Sidorov, A., & Sulman, E. (2017). Physico-chemical study of biocatalyst on the basis of the horseradish peroxidase immobilized on the modified titane dioxide. *Bulletin of Science and Practice*, (12), 98-104