

ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МАГНЕТИТА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ АМИЛАЗЫ

Е. А. Копыш

Белорусский государственный университет, г. Минск;

liza_kopusch@mail.ru;

науч. рук. – Е. Г. Петрова, ст. преп.

В данной работе были получены магнитные наночастицы (МНЧ) составов Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 , $\text{Zn}_{0,3}\text{Fe}_{2,7}\text{O}_4$ методом соосаждения. Также все 3 вида МНЧ были покрыты полиэтиленгликолем (ПЭГ) для стабилизации амилазы, т.к. многие ферменты при адсорбции на наноматериалах, имеющих в своем составе ПЭГ, не просто не теряют активности, а становятся более стабильными по сравнению с не иммобилизованными.

Далее в рамках приведенного исследования были получены значения констант скоростей процесса инактивации амилазы при различных температурах (70°C, 75°C, 77°C и 80°C) в присутствии и в отсутствии функционализированных наночастиц. Затем, исходя из полученных данных, были рассчитаны значения энергий активации процесса термоинактивации амилазы и амилазы в комплексе с наночастицами (НЧ) различного состава ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ПЭГ}$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ПЭГ}$, $\text{Zn}_{0,3}\text{Fe}_{2,7}\text{O}_4@\text{ПЭГ}$).

Ключевые слова: амилаза; магнитные наночастицы; термостабильность; термопротекторное действие.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы одной из наиболее перспективных и динамично развивающихся областей знаний стали нанотехнологии. Развитие нанотехнологий обеспечивается междисциплинарным характером исследований, широким взаимопроникновением идей и разработок из различных областей знаний. Применение наноматериалов в промышленности, медицине и фармакологии является приоритетным направлением, позволяющим решать самые актуальные проблемы в данных областях.

Магнитные наночастицы представляют значительный интерес для науки, промышленности и медицины, что связано с возможностью дистанционного управления ими при наложении внешнего магнитного поля. В настоящее время наиболее широко в биомедицине применяются частицы наноразмерного магнетита. Это обусловлено их низкой токсичностью для организма в сравнении с другими НЧ, стабильностью магнитных характеристик, а также большим разнообразием способов получения [1]. При использовании МНЧ также важны относительно

высокие значения удельной намагниченности, которую можно повышать не только варьируя размеры и структуру частиц, но и изменяя состав - например, замещая часть ионов железа другими металлами. Поэтому в данной работе сравниваются между собой классический магнетит, магнетит, допированный цинком и феррит кобальта.

Амилаза – один из основных ферментов, используемых в промышленности. Она имеет потенциальное применение во многих промышленных процессах, таких как пищевая, ферментационная и фармацевтическая промышленность.

В рамках настоящего исследования были определены константы скоростей и энергии активации для процесса термоинактивации амилазы и амилазы в комплексе с магнитными наночастицами различного состава ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ПЭИ}$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{ПЭИ}$, $\text{Zn}_{0,3}\text{Fe}_{2,7}\text{O}_4@\text{ПЭИ}$) при разных температурах (70°C, 75°C, 77°C, 80°C). Следует также отметить, что в литературе не имеется достаточного количества сведений о влиянии магнитных наночастиц на термостабильность амилазы, что актуализирует ее определение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данной работе МНЧ были получены методом соосаждения. Суть метода заключается в совместном осаждении компонентов продукта из раствора в виде нерастворимых солей, оксидов или гидроксидов. К преимуществам метода соосаждения можно отнести простую методику синтеза, высокую воспроизводимость, недорогое оборудование и реактивы, а также возможность варьирования размера и формы получаемых МНЧ за счет изменения скорости перемешивания, наличия или отсутствия магнитного поля, растворителя. Также все 3 вида МНЧ для стабилизации фермента были покрыты ПЭИ.

Для изучения взаимодействия амилазы из *B.flexus* с наночастицами, покрытыми полиэтиленгликолем, исходный препарат фермента в культуральной жидкости разводили в 500 или 1000 раз в 5 моль/л фосфатном буфере соответствующего значения pH. НЧ, покрытые полиэтиленгликолем, в концентрации 32 мкг/мл инкубировали с амилазой в течение 40 мин при комнатной температуре. После чего НЧ со связавшимся ферментом осаждали при 13000 g 20 мин. В супернатанте определяли активность не связавшегося с НЧ фермента. Осадок обрабатывали 0,1 моль/л NaФБ. Происходила диссоциация комплекса НЧ-амилаза на НЧ + амилаза, компоненты которого разделяли центрифугированием. По активности освободившейся амилазы

оценивали эффективность её связывания с наноразмерным ионообменником – НЧ $Zn_{0,3}Fe_{2,7}O_4@ПЭИ$, $CoFe_2O_4@ПЭИ$ и $Fe_3O_4@ПЭИ$.

Изучение влияния прогрева на активность нативной амилазы проводили по [2,3] при температурах 70°C, 75°C, 77°C и 80 °C. Амилазу инкубировали 40 мин при комнатной температуре с НЧ в концентрации 32 мкг/мл. Затем образцы помещали в термостат, держали при заданной температуре, отбирали через 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 мин и помещали в ледяную баню. Затем в этих пробах определяли активность амилазы. По полученным данным строили графики зависимости относительной активности фермента (A_i/A_0) $\times 100$ % от времени (t), где A_0 является начальной, а A_i - текущей активностью фермента. Контролем служила активность фермента до начала термообработки. Далее строили графики зависимости $\ln A_{отн}$ от времени. $A_{отн}$ - относительная активности фермента (A_i/A_0) $\times 100$ %. По графикам определяли константы скоростей для каждой стадии. k_1 - константа скорости 1 стадии реакции инактивации, k_2 - константа скорости 2 стадии реакции инактивации.

РАСЧЕТНАЯ ЧАСТЬ

Результаты представлены как средняя арифметическая ($\bar{X}$) $\pm$ стандартная ошибка средней (S_x) не менее, чем в трёх независимых измерениях. Обработку и представление результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016.

Энергии активации амилазы, а также амилазы в комплексе с наночастицами различного состава, были рассчитаны по уравнению:

$$E_a = -R \cdot \tan \alpha,$$

где R – универсальная газовая постоянная, равная 8,314 Дж/К·моль; $\tan \alpha$ – тангенс угла наклона аррениусовской зависимости.

Ошибка аппроксимации для различных образцов на разных стадиях процесса составила от 0,4% до 12,9%, что свидетельствует о хорошо подобранной модели уравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы сравнить термопротекторное действие магнитных наночастиц различного состава на амилазу, были рассчитаны константы скоростей процесса инактивации амилазы при различных температурах в составе

комплексов с данными наночастицами. Затем, исходя из этих данных, были рассчитаны энергии активации процесса термоинактивации.

На рисунке 1 представлен пример зависимости термоинактивации от температуры и продолжительности воздействия (в данном случае – для амилазы).

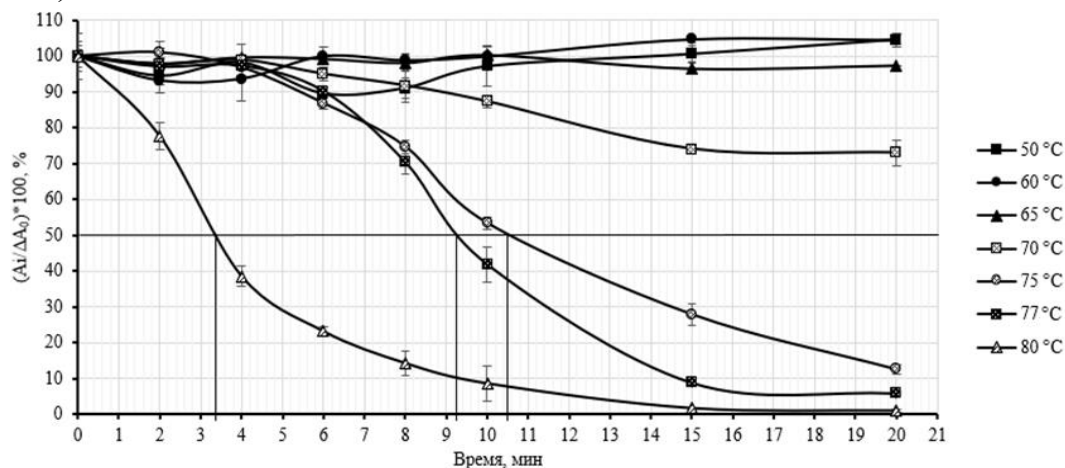


Рис. 1. Зависимость термоинактивации α -амилазы *Bacillus flexus* от температуры и продолжительности воздействия

Для возможности дальнейших расчетов исходя из зависимостей данного вида были построены зависимости в логарифмических координатах (относительная активность фермента – время). Пример такой зависимости для амилазы приведен на рисунке 2.

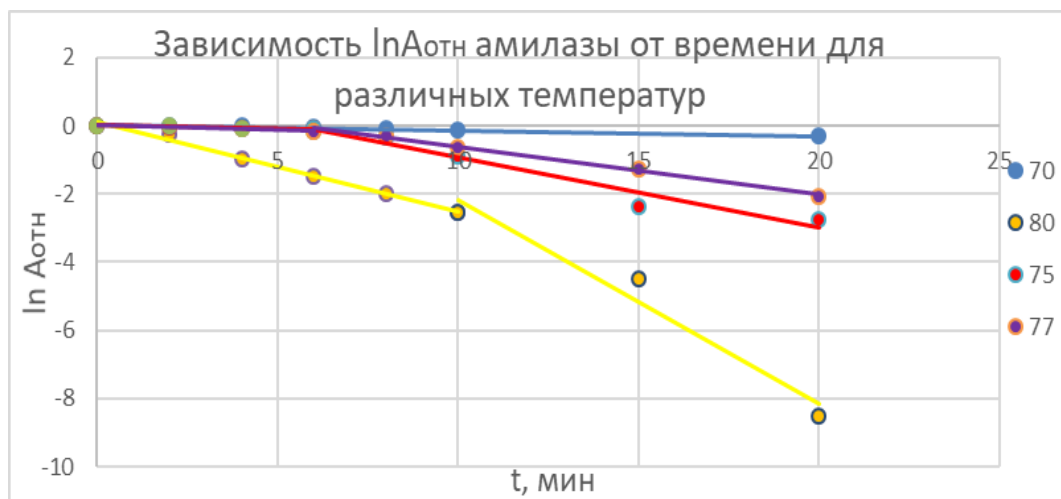


Рис. 2. Зависимость логарифма относительной активности амилазы от времени для различных температур

Результаты расчетов представлены в таблицах 1 и 2 соответственно.

Графики, исходя из которых были рассчитаны константы скорости процесса инактивации, являются линейными, что свидетельствует о протекании процесса термоинактивации амилазы по псевдопервому порядку. На большинстве логарифмических кривых отмечается излом

между двумя линейными участками, соответствующий переходу между двумя стадиями процесса. Подобные зависимости являются типичными для механизма инактивации фермента, протекающей через ряд последовательных превращений первого порядка с активной промежуточной формой [4].

Таблица 1

Результаты расчета констант скоростей процесса инактивации по стадиям для чистой амилазы и амилазы в комплексе с наночастицами различного состава

t, °C	Константы скорости по стадиям	Амилаза	Fe ₃ O ₄ @ПЭИ	CoFe ₂ O ₄ @ПЭИ	Zn _{0,3} Fe _{2,7} O ₄ @ПЭИ
70°C	k ₁ ·10 ³ , мин ⁻¹	2,30±0,10	3,70±0,12	3,80±0,02	3,60±0,19
	k ₂ ·10 ² , мин ⁻¹	1,89±0,09	2,36±0,31	2,04±0,17	2,01±0,09
75°C	k ₁ ·10 ² , мин ⁻¹	1,79±0,08	1,82±0,06	2,14±0,01	0,99±0,05
	k ₂ ·10, мин ⁻¹	2,06±0,09	2,09±0,27	1,16±0,09	1,30±0,06
77°C	k ₁ ·10 ² , мин ⁻¹	2,51±0,11	5,00±0,17	3,92±0,02	0,62±0,03
	k ₂ ·10, мин ⁻¹	1,38±0,06	9,98±1,29	1,18±0,10	1,95±0,09
80°C	k ₁ ·10, мин ⁻¹	2,63±0,12	2,21±0,07	1,97±0,01	2,44±0,13
	k ₂ ·10, мин ⁻¹	5,98±0,27	-	-	-

Таблица 2

Энергии активации для процесса термоинактивации амилазы и комплексов амилазы с наночастицами различного состава по стадиям

Энергии активации по стадиям, кДж/моль	Амилаза	Fe ₃ O ₄ @ПЭИ	CoFe ₂ O ₄ @ПЭИ	Zn _{0,3} Fe _{2,7} O ₄ @ПЭИ
E ₁	331,90±14,94	360,73±11,88	335,06±1,34	101,85±5,39
E ₂	296,31±69,63	350,00±45,50	268,86±22,85	333,25±15,66

Следует отметить, что при 70°C константы скорости k₁ у всех частиц одинаковые и не зависят от состава, значения k₂ – тоже очень близки. При 75°C начинается снижение констант (у Zn-замещенного магнетита – обеих, у феррита кобальта – только k₂) по сравнению с амилазой. При 80°C константы скоростей для всех НЧ меньше, чем у чистой амилазы.

Увеличение энергии активации говорит о том, что процесс инактивации с ростом температуры замедляется в присутствии исследуемых частиц.

Библиографические ссылки

1. Berry, C. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D. Appl. Phys., 2003, Vol. 36, № 13, p. 198–206.
2. Салем А.Э. Влияние наночастиц TiO_2 и Fe_3O_4 на термостабильность аспарат-аминотрансферазы // Труды БГУ, 2014, Т. 9, ч.1, с. 122–128.
3. Ahern T. J. Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, Vol. 84, p. 675-679.
4. Santos, A. Kinetic Modeling of Lactose Hydrolysis by a β -Galactosidase from *Kluyveromyces Fragilis* // Enzyme and Microbial Technology, 1998, Vol. 22, №7, p.558–567.