ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2021, том 95, № 7, с. 1089–1094

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЯВЛЕНИЙ

УДК 544.723

АДСОРБЦИЯ И КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ НА ПОВЕРХНОСТИ ГАЛЛУАЗИТА

© 2021 г. Л. Ф. Атякшева[a,*], Т. И. Ибрагимзаде[a], И. А. Касьянов[a], А. Ю. Фастов[b], С. А. Фастов[c]

[a] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия*

[b] *ООО "Молекулярные технологии и новые материалы", Москва, Россия*

[c] *ООО "Нанотехнологии и инновации", Москва, Россия*

**e-mail: Atyaksheva@phys.chem.msu.ru*

Поступила в редакцию 24.09.2020 г.
После доработки 24.09.2020 г.
Принята к публикации 09.11.2020 г.

Показано, что величина адсорбции и тип изотерм адсорбции, а также каталитическая активность и термостабильность щелочной фосфатазы на поверхности галлуазита зависят от текстуры алюмосиликатных нанотрубок. Максимальные величины предельной адсорбции получены на образцах с наименьшей удельной поверхностью (28 и 50 $м^2/г$) и составляют соответственно 18 и 23 мг/г или 0.69 и 0.54 $мг/м^2$. Установлено, что адсорбционные слои щелочной фосфатазы на поверхности галлуазита более стабильны, чем фермент в растворе; эффективные константы скорости инактивации при температуре 59°C для гетерогенных образцов изменяются в пределах $0–2.3 \times 10^{-4}$ $с^{-1}$, а в растворе в оптимуме pH стабильности фермента – 12.5×10^{-4} $с^{-1}$; каталитическая активность адсорбционных слоев щелочной фосфатазы составляет не более 1% активности нативного фермента.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, галлуазит, изотермы адсорбции, каталитическая активность, термостабильность

DOI: 10.31857/S0044453721070050

Природный глинистый минерал галлуазит состоит из слоев оксидов алюминия и кремния, закрученных в трубки, причем слой кремнезема находится на внешней стороне трубки, а слой оксида алюминия – на внутренней [1]. Галлуазит является высокоэффективным адсорбентом благодаря уникальной трубчатой структуре и способности иметь различные заряды на внутренней и наружной поверхности нанотрубок. Первыми ферментами, иммобилизованными на галлуазите, были α-амилаза и уреаза [2]. В последние 10 лет иммобилизацией на галлуазитах получены активные и стабильные биокатализаторы на основе хлороперoксидазы [3], лакказы [4], липазы [5, 6], α-амилазы [7], пероксидазы [8]. На щелочной фосфатазе, интеркалированной в нанотрубки проведена реакция биоминерализации [9].

Цель данной работы – исследовать адсорбцию щелочной фосфатазы на образцах галлуазита, различающихся параметрами пористой структуры, и сравнить каталитические свойства и термостабильность фермента в растворе и на поверхности образцов галлуазита.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследована адсорбция щелочной фосфатазы слизистой кишечника быка. Щелочная фосфатаза – димерный фермент, относительная молекулярная масса протомера 69000, pI 5.7. Использован лиофилизированный препарат (SIGMA) с содержанием белка 25%.

Адсорбционные измерения. Адсорбцию проводили из водных растворов фермента в интервале концентраций 50–800 мкг/мл. К 50 мг адсорбента добавляли 5 мл раствора фермента и оставляли в холодильнике на 5 суток. Величину адсорбции рассчитывали по разности концентраций фермента в исходном и конечном растворах. После окончания адсорбции образцы промывали несколько раз водой для удаления остатков фермента, добавляли по 5 мл воды и оставляли в холодильнике на 5 суток для проверки обратимости адсорбции. Величина десорбции фермента не превышала 2%, т.е. в исследованных условиях адсорбция щелочной фосфатазы практически необратима.

Определение концентрации щелочной фосфатазы. Содержание активного фермента определяли по скорости гидролиза динатриевой соли *п*-нитрофенилфосфата в 0.05 М карбонатном буфере

Таблица 1. Текстурные параметры исследованных образцов галлуазита

Образец	$S_{БЭТ}$, $м^2/г$	$S_{микро}$, $м^2/г$	$V_{пор}$, $см^3/г$	D_1, нм	D_2, нм
Галлуазит-1	28	2	0.14	3.5	50
Галлуазит-2	50	7	0.15	3.5	12
Галлуазит-3	250	80	0.18	3.5	25
Галлуазит-4	215	25	0.19	3.5	50

Таблица 2. Предельные адсорбции щелочной фосфатазы и площадки, приходящиеся на молекулу фермента на поверхности галлуазита

Образец	$S_{БЭТ} - S_{микро}$, $м^2/г$*	Предельная адсорбция		$S_{молекулы}$, $нм^2$
		мг/г	$мг/м^2$	
Галлуазит-1	26	18	0.69	330
Галлуазит-2	43	23 (12**)	0.54	430
Галлуазит-3	170	14 (6**)	0.08	2800
Галлуазит-4	190	8	0.04	5500

* $S_{БЭТ} - S_{микро}$ – поверхность, теоретически доступная для адсорбции.

** расчет по начальному участку изотермы адсорбции.

(pH 8.5). Использовали насыщающие концентрации субстрата (3.5 мМ). Ферментативную реакцию проводили в стеклянной кювете (l = 1 см). Скорость накопления окрашенного продукта реакции – n-нитрофенола – определяли фотометрированием при λ = 400 нм. Предварительно строили калибровочные зависимости.

Определение параметров уравнения Михаэлиса–Ментен. Константа Михаэлиса ($K_М$) и максимальная скорость (V), характеризующие каталитические свойства ферментов, определяли для щелочной фосфатазы в растворе и на поверхности образцов галлуазита в реакции гидролиза синтетического субстрата (динатриевая соль n-нитрофенилфосфата, SIGMA). Ферментативную реакцию проводили в фосфатном буфере (pH 7.5), интервал концентраций субстрата 0.15–1 мМ. Для обработки экспериментальных данных использовали линейное уравнение Лайнуивера–Берка.

Термоинактивация щелочной фосфатазы. Растворы фермента в фосфатном буфере (pH 7.5, оптимум pH стабильности фермента) и гетерогенные образцы подвергали термообработке при 59°C. Время термообработки варьировали от 15 мин до 2 ч. Полученные зависимости активности фермента от времени термообработки обрабатывали в координатах кинетического уравнения первого порядка и определяли эффективные константы скорости термоинактивации.

Физико-химические методы исследования. Определение параметров пористой структуры галлуазита проводили на сорбтометре ASAP 2010 (Micromeritics, США). Предварительно образцы вакуумировали при 50°C в течение 10 ч.

Электронные микрофотографии образцов галлуазита получали на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6000 NeoScope.

Адсорбенты. Исследовали 4 образца галлуазита (производитель ООО “МТиНМ”, Россия), текстурные параметры которых приведены в табл. 1.

Значения D_1 и D_2 – положения максимумов на кривых распределения объемов пор по их размерам (рис. 1). Считается, что первый максимум соответствует порам внутренней поверхности галлуазита, включая и межслоевые пространства, а второй максимум – среднему размеру внутренних диаметров нанотрубок [10]. Приведенные на рис. 2 электронные микрофотографии свидетельствуют о различной морфологии исследованных образцов галлуазита. Образец 1 состоит в основном из трубчатых структур, тогда как в других образцах помимо трубчатых структур присутствуют сферические и пластинчатые структуры, а также их агломераты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 3 приведены изотермы адсорбции щелочной фосфатазы на образцах галлуазита. При адсорбции на образцах 1 и 4 получены изотермы L-типа, а на образцах 2 и 3 – двухступенчатые изотермы. Все изотермы адсорбции обработаны в линейных координатах уравнения Ленгмюра и рассчитаны предельные величины адсорбции фермента. В случае образцов галлуазит-2 и галлуазит-3 определены два значения предельной адсорбции. Полученные величины приведены в табл. 2.

Изотермы адсорбции ферментов на образцах галлуазита ранее получены для липазы [5, 6], лизоцима [6] и пероксидазы [8], однако авторы этих публикаций изотермы никак не обрабатывали.

Из приведенных на рис. 3 и в табл. 2 данных следует, что максимальные адсорбции получены на образцах, обладающих меньшей удельной поверхностью. Причем, если в расчете на единицу массы адсорбция различается в 2–3 раза, то в расчете на единицу поверхности – практически на порядок. На порядок различаются и рассчитанные из предельной адсорбции площадки, приходящиеся на одну молекулу фермента на поверхности этих образцов (табл. 2). По-видимому, наличие значительных количеств микропор в образцах 2 и 3 препятствует закреплению молекул белка на поверхности. Полученные нами пре-

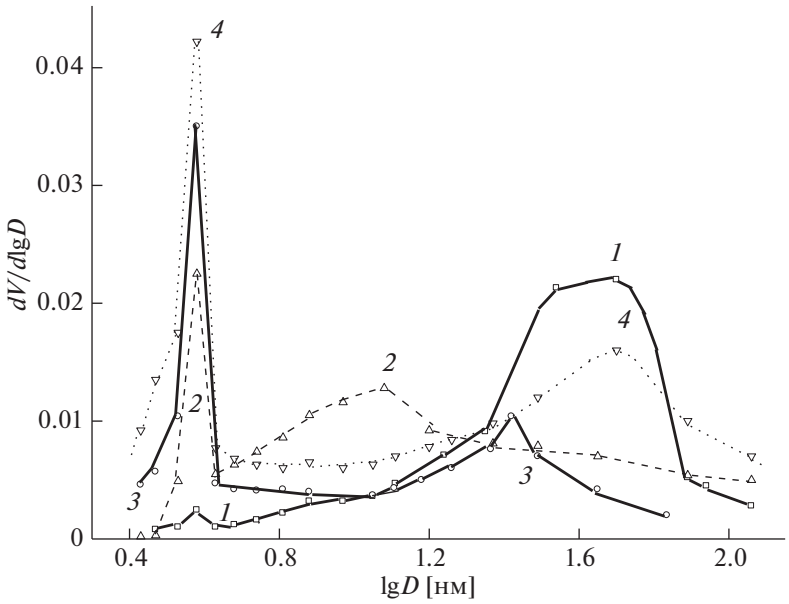

Рис. 1. Кривые распределения объемов пор образцов галлуазита по их размерам. Номер кривой соответствует номеру образца.

дельные адсорбции можно сравнить с величинами адсорбции α-амилазы и уреазы на галлуазите ($S_{БЭТ}$ = 60 м^2/г и внутренний диаметр 20 нм [2]). Величины адсорбции составили 15 и 11.7 мг/г соответственно для уреазы и α-амилазы. В расчете на единицу поверхности – 0.25 и 0.20 мг/м^2, что вполне укладывается в найденную нами тенденцию уменьшения адсорбции с увеличением удельной поверхности. К сожалению, в других работах по адсорбции ферментов на галлуазитах [3–9] нет сведений о текстурных характеристиках образцов.

В табл. 3 приведены параметры уравнения Михаэлиса–Ментен, характеризующие каталитические свойства фермента в растворе и на поверхности исследованных образцов галлуазита.

Проведенное исследование показало, что щелочная фосфатаза на поверхности галлуазита сохраняет не более 1% по сравнению с активностью в растворе (см. табл. 3). По литературным данным лакказа на поверхности галлуазита сохраняла ~20% активности [4], липаза – до 80% [5]. Константа Михаэлиса в случае гетерогенных образцов возрастает в несколько раз по сравнению с полученной для фермента в растворе, что характерно для иммобилизованных ферментов. В литературе приведены параметры уравнения Михаэлиса–Ментен для хлороперoксидазы, иммобилизованной на галлуазите в реакции хлорирования монохлордимедона [3]. Аналогичные параметры для нативного фермента не сообщаются.

Интересные результаты получены при проведении ферментативной реакции последовательно на одном и том же образце. Как видно из рис. 4, образцы, сохранившие минимальную активность (галлуазит-1 и галлуазит-4) не теряют активности при проведении шести последовательных циклов на одном и том же образце. Два других образца, сохранивших активность в большей степени, постепенно теряли активность, если каталитическую реакцию проводили последовательно на одном и том же образце. Различается и термостабильность гетерогенных биокатализаторов. Кинетические зависимости термоинактивации щелочной фосфатазы при 59°С в буферном растворе (7.5) и фермента на поверхности исследованных образцов галлуазита приведены на рис. 5. Рассчитанные из экспериментальных данных эффективные константы скорости термоинактива-

Таблица 3. Параметры уравнения Михаэлиса–Ментен ($K_М$ и V) и эффективные константы скорости инактивации фермента ($k_{эфф}$) при 59°С в буферном растворе (pH 7.5) и на поверхности образцов галлуазита

Фермент	$K_М$, мМ	V_{max}, мкмоль/(мин мг белка)	$k_{эфф} \times 10^4$, с$^{-1}$
В растворе, pH 7.5	0.1	146	12.3
На галлуазите-1	0.3	0.4 (~0.3%*)	стабилен**
На галлуазите-2	0.8	1.4 (~1%*)	1.2
На галлуазите-3	0.7	1.2 (~0.8%*)	2.3
На галлуазите-4	0.6	0.2 (~0.1%*)	стабилен**

* доля активности по сравнению с активностью в растворе.
** не теряют активности после 2 ч термообработки при 59°С.

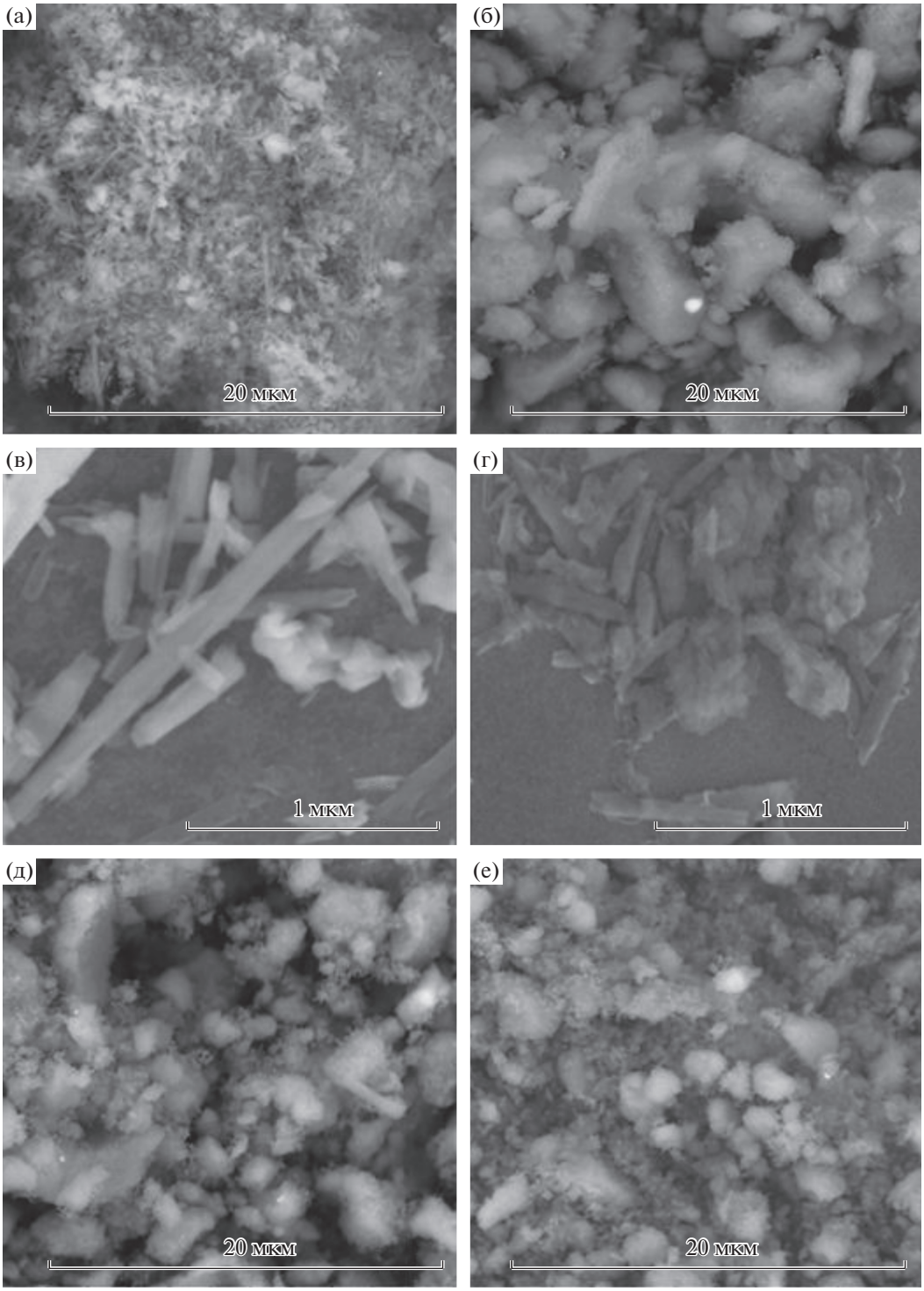

Рис. 2. Электронные микрофотографии образцов: галлуазит-1 (а, в); галлуазит-2 (б, г); галлуазит-3 (д) и галлуазит-4 (е).

ции приведены в табл. 3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фосфатаза на поверхности галлуазита более стабильна при воздействии повышенных температур. В буферном растворе в оптимуме pH стабильности (pH 7.5) при 59°C фермент теряет половину активности менее, чем за 15 мин, а фосфатаза на поверхности образцов 1 и 4 не теряет первоначальной активности, по крайней мере, в течение 2 ч. Фермент на поверхности образца галлуазит-2 не теряет активности после 15 мин выдержки при 59°C, а на галлуазит-3 потеря активности начинается с первых минут термо-

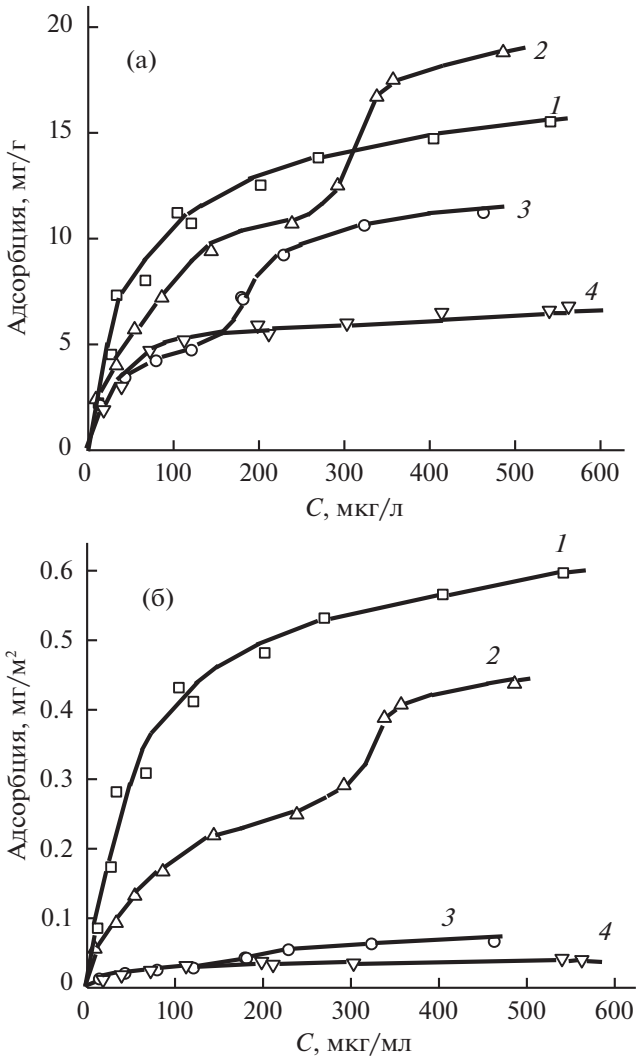

Рис. 3. Изотермы адсорбции щелочной фосфатазы на образцах галлуазита в расчете на единицу массы (а) и единицу поверхности (б). Номер зависимости соответствует номеру образца.

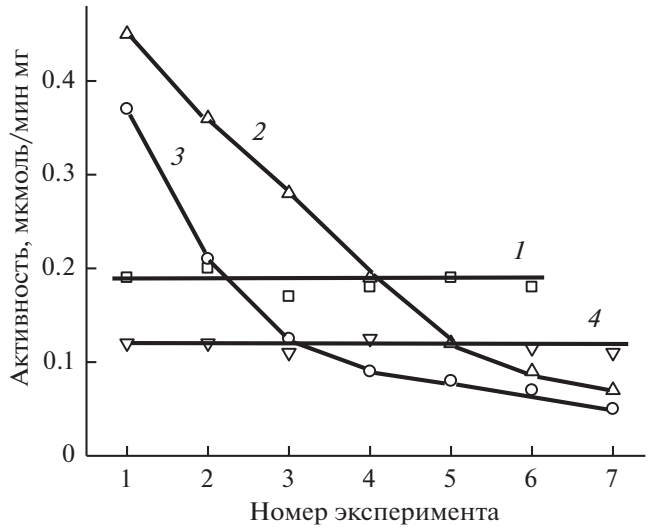

Рис. 4. Каталитическая активность щелочной фосфатазы на поверхности галлуазита при последовательном проведении эксперимента. Номер зависимости соответствует номеру образца.

обработки. Константа скорости инактивации щелочной фосфатазы в растворе в 5–10 раз выше, чем на образцах 3 и 2 (соответственно 12.3×10^{-4}, 2.3×10^{-4} и 1.2×10^{-4} $с^{-1}$). Термостабильность адсорбционных слоев ферментов – одно из преимуществ гетерогенных биокатализаторов. Это свойство отмечено ранее и для ферментов, иммобилизованных на поверхности галлуазита [3, 5, 6].

Таким образом, максимальные величины адсорбции щелочной фосфатазы (в расчете на единицу массы и на единицу поверхности) получены на образцах галлуазита с небольшой величиной удельной поверхности (28 и 50 $м^2$/г). Установлено, что десорбция ферментов с поверхности галлуазитов составляет не более 2%, а каталитическая активность – не более 1% по сравнению с активностью нативного фермента. Щелочная фосфатаза на поверхности всех исследованных образцов галлуазита более устойчива к воздействию повышенных температур, чем в растворе. По другим свойствам образцы можно разделить на две группы и выделить общие свойства адсорбционных слоев щелочной фосфатазы для каждой группы.

К первой группе отнесены образцы, у которых внутренние диаметры нанотрубок максимальные, – галлуазит-1 ($S_{БЭТ}$ = 28 $м^2$/г, $D_{мах}$ = 50 нм) и галлуазит-4 ($S_{БЭТ}$ = 215 $м^2$/г, $D_{мах}$ = 50 нм). Для этих образцов характерны изотермы адсорбции L-типа и постоянство активности фермента при многократном проведении реакции на одном и том же образце, а также сохранение каталитической активности фермента на поверхности образцов после обработки при 59°С в течение 3 ч.

Ко второй группе отнесены образцы с меньшими внутренними диаметрами нанотрубок – галлуазит-2 ($S_{БЭТ}$ = 50 $м^2$/г, $D_{мах}$ = 12 нм) и галлуазит-3 ($S_{БЭТ}$ = 250 $м^2$/г, $D_{мах}$ = 25 нм). Для этих образцов характерны двухступенчатые изотермы адсорбции, падение каталитической активности при многократном проведении ферментативной реакции на одном и том же образце и значительно меньшая термостабильность фермента на поверхности этих образцов по сравнению с образцами галлуазит-1 и галлуазит-4.

Проведенное исследование показало, что особенности адсорбции щелочной фосфатазы (а, возможно, и других ферментов) и свойства адсорбционных слоев ферментов в значительной степени определяются текстурными параметрами образцов галлуазита.

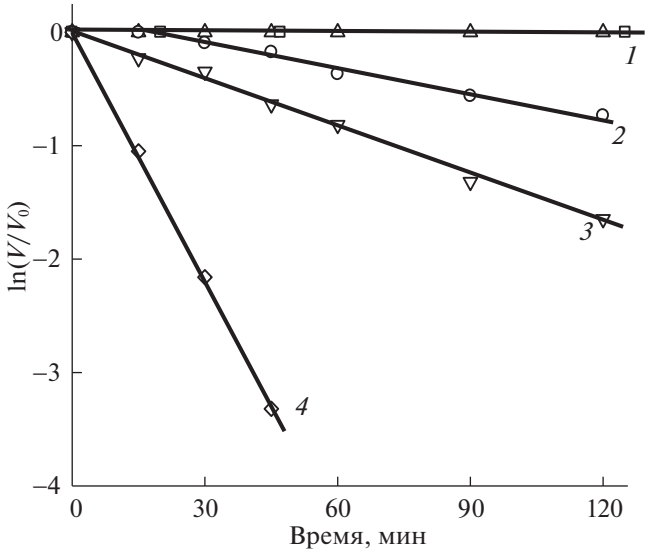

Рис. 5. Кинетические зависимости в координатах уравнения первого порядка для термоинактивации щелочной фосфатазы на поверхности галлуазита-1 и галлуазита-4(*1*), галлуазита-3 (*2*), галлуазита-2(*3*) и в растворе (*4*).

Исследование текстурных и морфологических характеристик образцов галлуазитов выполено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-73-10160).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Joussein E.* // Developments in Clay Science 2016. V. 7. P. 13. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100293-3.00023-6
2. *Zhara. K., Zhanga B., Liua L. et al.* // Catal. Commun. 2010. V. 12. P. 259.
3. *Fan H., Hu M., Li S. et al.* // Appl. Clay Sci. 2018. V. 163. P. 92. https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.07.016
4. *Kadam A.A., Jang J., Jee S.C. et al.* // Carbohydrate Polymers. 2018. V. 194. P. 208. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.046
5. *Wang H., Zhao X., Wang S. et al.* // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1392. P. 20. https://doi.org/10/1016/j.chroma.201503002
6. *Sun J., Yendluri R., Liu K. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. https://doi.org/10.1039/сбср07450b
7. *Pandey G., Munguambe D.M., Tharmavaram M. et al.* // Appl. Clay Sci. 2017. V. 136. P. 184. https://doi.org/10.1016/j.clay.201611034
8. *Zhai R., Zhang B., Wan Y. et al.* // Chem. Eng. J. 2013. V. 214. P. 304. https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.10.073
9. *Pietraszek A., Karewich A., Widnic M. et al.* // Colloids and Surfaces B: Bioiterfaces. 2019. V. 173. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.040
10. *Pasbakhsh P., Churchman G.J., Keeling J.L.* //Appl. Clay Sci. 2013. V. 74. P. 47. https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.06.014