

## ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БИОНАНОСТРУКТУР ГЛЮКОАМИЛАЗА-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si

© 2014 Д. А. Жукалин, Е. Л. Макарова, М. И. Черных, Л. А. Битюцкая, Т. А. Ковалева

Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, 394006 Воронеж, Россия  
e-mail: d.zhukalin@mail.ru

Поступила в редакцию 10.07.2014 г.

**Аннотация.** Рассмотрена роль электростатического взаимодействия коротких углеродных нанотрубок и глобулярного белка при формировании бионеорганического гибрида глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si. Показано, что образование гибридов сопровождается скачкообразным ростом размеров агрегатов, селективной агрегацией глюкоамилазы на УНТ, расширением функциональных свойств — каталитической активности, в широком диапазоне температур до 100 °С.

**Ключевые слова:** углеродные нанотрубки, гибрид, бионеорганическая структура, заряд, глюкоамилаза, кремний, оксид кремния, иммобилизация, каталитическая активность, термостабильность.

### ВВЕДЕНИЕ

Важным направлением в нанотехнологиях является создание гибридных материалов и структур на их основе. Биогридные материалы актуальны для сенсорики, медицины, фармакологии, микросистемной техники, органической и молекулярной электроники и др. [1, 2]. При получении гибридных материалов с заданными свойствами важно знать механизмы взаимодействия между разнородными компонентами. Возможны различные виды взаимодействия — ван-дер-ваальсово, электростатическое, магнитное, ковалентное и другие. Наиболее изученным в настоящее время является электростатическое взаимодействие [3]. Благодаря своим уникальным свойствам в качестве неорганического компонента привлекательны углеродные нанотрубки (УНТ). Однако химическая инертность УНТ требует дополнительных методов активации. Наиболее распространенными являются такие энергоемкие методы, как отжиги при высокой температуре и функционализация фтором [4]. При фторировании радикально меняется электронная структура, морфология и теряются важные свойства исходных УНТ [5]. Размерные эффекты УНТ с ограничением по длине и диаметру открывают возможности для новых, более мягких механизмов взаимодействия с материалами различной природы [6—9]. В работе [10] показано значительное влияние зарядовых свойств УНТ на фрактальную агре-

гацию углеродных нанотрубок различной длины. В ограниченных по длине закрытых трубках в интерфейсе шапка/остов УНТ возникают заряды, порождающие локальные сильные электрические поля ( $\sim 10^8$  В/м) [6, 10].

В качестве биологических компонентов привлекательны глобулярные белки (энзимы, ферменты), имеющие наноразмеры и обладающие поверхностным зарядом. Ранее в работе [11] нами определены предпосылки для создания биосенсора. Выявлена чувствительность зарядовых свойств иммобилизованных ферментов глюкоамилазы к изменению pH. Настоящая работа посвящена исследованию условий формирования гибридных наноструктур глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si и изучению их функциональных свойств — каталитической активности.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исходных компонентов при формировании гибридных бионаноструктур глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si использовались углеродные нанотрубки (УНТ), фермент глюкоамилаза, полупроводниковые структуры SiO<sub>2</sub>-Si.

При характеристике УНТ важную роль играет их длина, которая была одним из критериев выбора компонентов. Ранее в нашей работе [10] было показано значительное увеличение реакционной способности коротких нанотрубок по сравнению

с длинными, обусловленное зарядовыми свойствами УНТ. Для эксперимента рассматривались углеродные нанотрубки полученные методом CVD: Nanosyl-7000 (NANOCYL S.A., Бельгия) с длиной  $\sim 3$  мкм; MWCNT (Bayer, Германия) с длиной  $\sim 2$  мкм и короткие УНТ ( $\sim 0.5$  мкм), полученные электродуговым методом. Коллоидные взвеси УНТ получали предварительным диспергированием ультразвуковым диспергатором УЗД2-0.63/22 (Россия) 15 минут при 60 Вт в дистиллированной воде; добавлением ПАВ додецилсульфата натрия; центрифугированием при скорости 12000 об/мин в течение 10 мин. Для полученных взвесей УНТ контролировалось поверхностное натяжение по методу висящей капли на приборе ОСА 15ЕС (DataPhysics, Германия). Обнаружена чувствительность величины поверхностного натяжения  $\sigma$  для нанотрубок различных длин. Для коротких трубок ( $\sim 0.5$  мкм), полученных электродуговым синтезом,  $\sigma = 71.91$  мН/м, в то время как для длинных трубок ( $\sim 3$  мкм) производства Бельгии  $\sigma = 72.36$  мН/м. В дальнейшем в эксперименте использовались короткие углеродные трубки с длиной до 0.5 мкм.

В качестве биологического компонента использовался коммерческий препарат глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* ( $\alpha$ -1.4:1.6 глюкан-4.6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3), очищенный методами ионообменной и гель-хроматографии. Гомогенность препарата контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Компьютерная модель глюкоамилазы была построена в программе Maestro9.1 с использованием международной базы данных рентгеноструктурного анализа биологических объектов (<http://www.rcsb.org/>, <http://www.schrodinger.com/>). Проведены оценки линейных размеров и зарядовых свойств изучаемого фермента. Глюкоамилаза представляет собой слабо-анизотропную глобулу размером приблизительно  $6.5 \times 6$  нм с поверхностным неравномерно-распределенном отрицательным зарядом в щелочной среде (рис. 1).

Величину заряда глобул возможно регулировать с помощью pH среды. Учитывая зарядовые свойства глюкоамилазы и коротких УНТ, мы считаем, что базовым механизмом формирования гибрида глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si служит электростатическое взаимодействие.

Процесс закрепления ферментов на поверхности УНТ и на других твердых поверхностях в микробиологии определяется термином — иммобилизация.

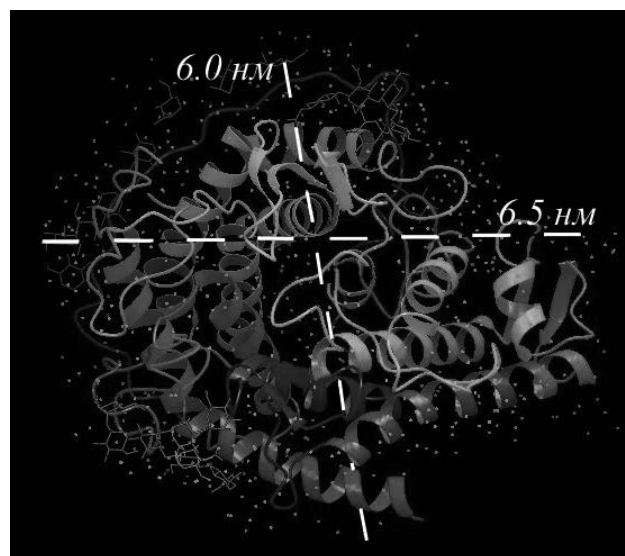


Рис. 1. Компьютерная модель глобулы глюкоамилазы с линейными размерами

Гомогенная и гетерогенная агрегация в водных растворах нативной и иммобилизованной глюкоамилазы контролировалась прибором Photocor Complex методом динамического рассеивания света (DLS).

Для иммобилизации нативного фермента — глюкоамилазы использовали подложки SiO<sub>2</sub>-Si без УНТ с толщиной оксида порядка 10 нм, которые в течение суток выдерживали в 20 мл ацетатного буфера при pH 4.7, затем добавляли глюкоамилазу в концентрации  $10^{-6}$  м/л и инкубировали в течение 24 часов при комнатной температуре. После завершения процесса иммобилизации препарат несколько раз промывали дистиллированной водой для удаления неадсорбированного белка. Контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 280 нм. Пластинки подсушивали при 30 °С.

Адсорбционную иммобилизацию глюкоамилазы с УНТ проводили в 2 этапа: первый этап — нанесение взвеси УНТ капельным методом [12]; второй этап — аналогичен иммобилизации нативного фермента.

В качестве функционального свойства бионамоструктуры изучалась каталитическая активность. Использовался глюкозооксидазный метод с помощью набора реактивов для измерения концентрации глюкозы в биологических жидкостях («OLVEX DIAGNOSTICUM», Россия). Концентрацию белка в иммобилизованном образце определяли модифицированным методом Лоури, инкубацию иммобилизованного фермента с субстратом в растворе

осуществляли при перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 30 минут.

Проводился сравнительный анализ каталитической активности свободной глюкоамилазы и иммобилизованной на УНТ, как для раствора, так и для структур глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si.

Визуализацию иммобилизованной поверхности контролировали на атомно-силовом микроскопе SOLVER P47 производства компании NT-MDT в контактном режиме, с использованием кремниевых зондов серии CSG11S (NT-MDT) жесткостью порядка 0.03 и 0.1 Н/м с радиусом закругления 10 нм.

Математическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью интегрированного пакета статистической обработки данных «Statgraphics». Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали с использованием стандартного t-критерия Стьюдента при уровне значимости  $p < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ОБСУЖДЕНИЕ

Агрегация является базовым процессом формирования гибридных структур. Изменение размеров агрегатов при растворении, допировании УНТ свидетельствует о формировании структур нового типа. Анализ DLS выявил скачкообразный рост размера агрегатов при формировании гибридов глюкоамилаза-УНТ. В нативном растворе глюкоамилазы размер агрегатов составляет 73 нм (11.8%) и 7 мкм (88.2%), что свидетельствует о переходе глюкоамилазы в четвертичную структуру. При добавлении УНТ в раствор глюкоамилазы с крахмальным субстратом наблюдается эффект интенсивного взаимодействия глюкоамилазы с УНТ. Размеры агрегатов Глюкоамилаза-УНТ резко возрастают: 170 нм (18.2%); 1.28 мкм (29.9%); 38 мкм (51.9%), что является одним из доказательств образования гибридных структур.

Данные DLS анализа коррелируют с результатами атомно-силовой микроскопии иммобилизованной поверхности структуры глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si. На рис. 2 представлены АСМ топограммы при различных разрешениях.

Наблюдается селективная агрегация глюкоамилазы, как на углеродных нанотрубках, так и в их ареале на расстоянии нескольких нанометров. Исходные нанотрубки характеризуются диаметром 20—40 нм. При иммобилизации УНТ глюкоамилазой диаметр получаемых структур увеличивается до 40—60 нм. Это подтверждает и является вторым доказательством образования гибридных структур.

Локализация иммобилизации глюкоамилазы на трубках и в их ареале подтверждает гипотезу об электростатическом взаимодействии глюкоамилазы с УНТ.

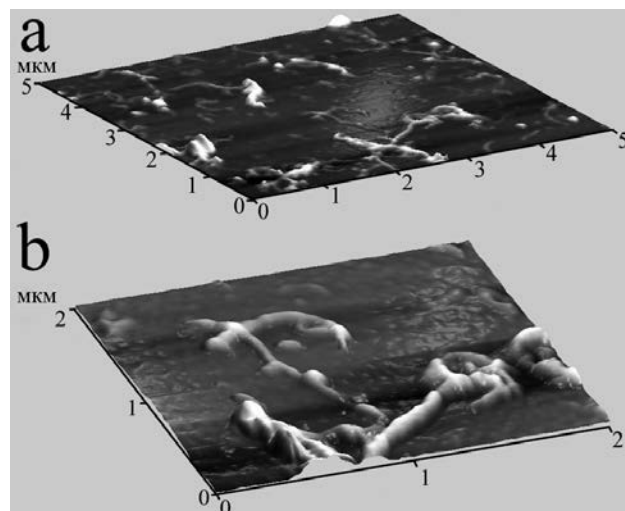


Рис. 2. АСМ топограммы иммобилизованной поверхности структур глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si при разрешении 5 × 5 мкм (а) и 2 × 2 мкм (б)

Контроль функциональных свойств полученных гибридных структур — каталитической активности, проводился в сравнении с нативными структурами. Важнейшими параметрами, влияющими на каталитическую активность, являются температура и рН среды. Температурная зависимость каталитической активности исследовалась в термостатируемых условиях в интервале температур от 20 до 100 °С (рис. 3).

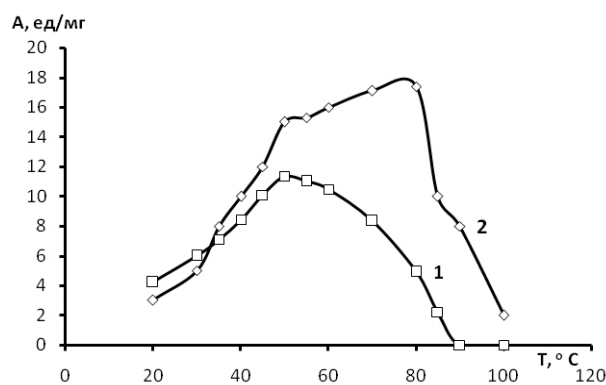
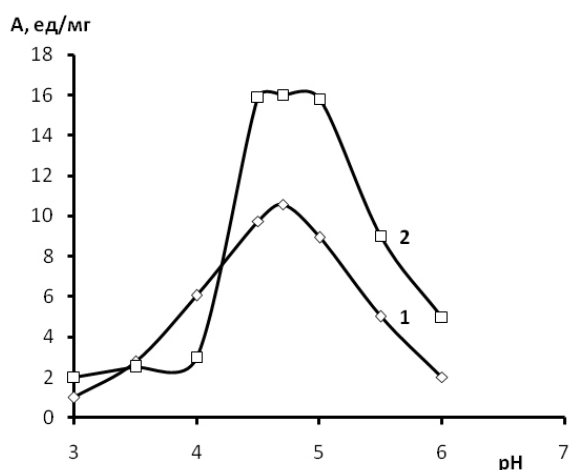


Рис. 3. Зависимость каталитической активности свободной глюкоамилазы (1) и бионеорганического гибрида глюкоамилаза-УНТ (2) от температуры

В гибридных материалах расширяется интервал термоустойчивости. Для свободной глюкоамилазы, выделенной из *Aspergillus awamori*, температурный

диапазон лежит в пределах 45—60 °С с максимальной активностью при 50 °С. Для иммобилизованной глюкоамилазы зона наибольшей активности лежит в интервале температур 50—85 °С с максимумом при 80 °С. При этом увеличиваются абсолютные значения каталитической активности: 11.3 ед/мг для свободного фермента и 17.4 ед/мг для иммобилизованного. Важно, что иммобилизованная глюкоамилаза даже при 90 °С сохраняет 70.5% активности, а при 100 °С — 17.6%, что говорит о термостабильности.

При адсорбционной иммобилизации на УНТ при изменяющемся рН раствора происходит резкое возрастание каталитической активности с образованием плато в диапазоне значений рН от 4.5 до 5.0, соответствующему максимуму каталитической активности ~16 ед/мг. Это свидетельствует о неклассическом изменении каталитической активности в энзимах (рис. 4).



**Рис. 4.** Зависимость каталитической активности свободной глюкоамилазы (1) бионеорганического гибрида глюкоамилаза-УНТ (2) от рН раствора

Присутствие углеродных нанотрубок в гибридной структуре расширяет функциональные возможности фермента глюкоамилазы. Повышается каталитическая активность, которая сохраняется в широком интервале температур. Возникают новые функциональные свойства — устойчивость каталитической активности от рН раствора. Из-

менение и появление новых функциональных свойств можно рассматривать как третье доказательство формирования гибридных структур глюкоамилаза-УНТ.

Таким образом, при электростатическом взаимодействии коротких углеродных нанотрубок и агрегированной глюкоамилазы образуется устойчивый бионеорганический гибрид глюкоамилаза-УНТ-SiO<sub>2</sub>-Si с расширенными функциональными свойствами. Образование гибридов сопровождается скачкообразным ростом размеров агрегатов, селективной агрегацией глюкоамилазы на УНТ; расширением функциональных свойств. Полученные результаты являются предпосылкой создания сенсоров.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ruiz-Hitzky E., Ariga K., Lvov Y. M. (Eds.) // Wiley-VCH, Weinheim. 2007. 521 p.
2. Рамбиди Н. Г., Березкин А. В. Физические и химические основы нанотехнологий / М.: Физматлит, 2008. 454 с.
3. D. Walker, B. Kowalczyk, M. Olvera de la Cruz, B. Grzybowski // Nanoscale Journal. 2011. V. 3. P. 1316—1344.
4. Хабаиеску В. Н. // Успехи химии. 2011. Т. 80. № 8. С. 739—760.
5. Ganin A. A., Bityutskaya L. A., Bormontov E. N. // International journal of materials. 2014. V. 1. P. 93—98.
6. Жукалин Д. А., Тучин А. В., Куликов Д. Г. Яценко А. А., Битюцкая Л. А., Лукин А. Н. // Конденсированные среды и межфазные границы. 2014. Т. 16. С. 23—26.
7. Битюцкая Л. А., Головинский П. А., Жукалин Д. А., Алексеева Е. В., Авиллов С. В., Лукин А. Н. // Конденсированные среды и межфазные границы. 2013. Т. 15. С. 59—64.
8. McNally T., Pötschke P. // UK, Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 2011. 820 p.
9. Li L., Yang Y., Yang G., et al. // NanoLett. 2006. V. 6. № 5. P. 1007—1012.
10. Zhukalin D. A., Tuchin A. V., Avilov S. V., Bityutskaya L. A., Bormontov E. N. // Recent Adv. In Biomedical & Chem. Eng. and Mat. Sc. 2014. V. 1. P. 79—81.
11. Ковалева Т. А., Холявка М. Г., Гольтыев М. В., Битюцкая Л. А., Колтаков И. А. // Биотехнология. 2011. № 3. С. 50—56.
12. Тарасевич Ю. Ю., Православнова Д. М. // ЖТФ. 2007. Т. 77. В. 2. С. 17—21.

Жукалин Дмитрий Алексеевич — аспирант кафедры физики полупроводников и микроэлектроники, Воронежский государственный университет; тел.: (951) 5685250, e-mail: d.zhukalin@mail.ru,

Zhukalin Dmitry A. — post graduate student, Department of Physics of Semiconductors and Microelectronics, Voronezh State University; tel. (951) 5685250, e-mail: d.zhukalin@mail.ru

*Макарова Екатерина Леонидовна* — аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 2208586, e-mail: makarova7809@mail.ru

*Черных Максим Игоревич* — аспирант кафедры физики полупроводников и микроэлектроники, Воронежский государственный университет; тел.: (904) 2142304, e-mail: chemaxmass@mail.ru

*Битюцкая Лариса Александровна* — к. х. н., доцент кафедры физики полупроводников и микроэлектроники, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 2208481, e-mail: me144@phys.vsu.ru

*Ковалева Тамара Андреевна* — д. б. н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 2208586, e-mail: tamarakovaleva@inbox.ru

*Makarova Ekaterina L.* — post graduate student, Biotechnology Department, Voronezh State University; tel.: (473) 2208586, e-mail: makarova7809@mail.ru

*Chernykh Maxim I.* — post graduate student, Department of Physics of Semiconductors and Microelectronics, Voronezh State University; tel.: (904) 2142304, e-mail: chemaxmass@mail.ru

*Bityutskaya Larisa A.* — Cand. Sci. (Chem.), Department of Physics of Semiconductors and Microelectronics, Voronezh State University; tel.: (473) 2208481, e-mail: me144@phys.vsu.ru

*Kovaleva Tamara A.* — Dr. Sci. (Biolog.), Professor of Biotechnology Department, Voronezh State University; tel.: (473) 2208586, e-mail: alukin43@mail.ru