

ОСОБЛИВОСТІ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ *RAPHANUS SATIVUS* L. ІЗ ПРИРОДНИМ ШАРУВАТИМ АЛЮМОСИЛІКАТОМ ЗА ПРИСУТНОСТІ ОКСИДІВ ЗАЛІЗА

О. В. Бойчук¹, Є. С. Плетинець¹, К. Д. Першина^{1,2}, Є. О. Коломієць¹

¹Інститут загальної та неорганічної хімії імені В. І. Вернадського НАН України, просп. Акад. Палладіна, 32/34, Київ 03142, Україна

²Міжвідомче відділення електрохімічної енергетики НАН України, просп. Акад. Вернадського, 38 А, Київ 03142, Україна
e-mail: Pershina@ionc.kiev.ua

Синтезовано та проведено ІЧ- та РФА-аналіз зразків природного бентоніту, бентоніту з магнетитом та бентоніту з магнетитом та ензимним препаратом редьки чорної з різним часом контакту при модифікуванні. ІЧ-дослідженнями встановлено наявність адсорбції молекули ферменту з носієм, яка незначно впливає на зміну її структури. Було виявлено характерні смуги коливань амідних груп білків на 1637 см^{-1} – ν -коливання зв'язків C=O (амід I), 713 см^{-1} – δ -коливання O=C-N у площині (амід IV), які можуть брати участь у сорбційному зв'язуванні ферменту з бентонітом та SiO₂-групи, які характеризуються слабким зв'язком зовнішньої частини білку з утворенням поверхневої структури і яка з часом зникає завдяки дифузії молекули у пори мінералу. РФА-аналізом зафіксовано зміну інтенсивності максимумів монтморілоніту у діапазоні $2\theta = 5-10^\circ$ у зразках після модифікування залізом природного бентоніту та залежність базальної відстані від складу зразка та часу контакту з ферментним препаратом. За результатами досліджень запропоновано схему взаємодії ферменту з модифікованим залізом шаруватим алюмосилікатом.

Ключові слова: бентоніт, магнетит, модифікація, *Raphanus Sativus* L., ІЧ-спектроскопія, РФА-аналіз.

ВСТУП. Природні і модифіковані глинисті мінерали широко використовують у промисловості та для захисту навколишнього середовища, особливо як адсорбенти, молекулярні сита, іонообмінні матеріали та каталізатори [1]. Такі мінерали є ще й вихідним матеріалом для синтезу стовп-

частих глин (PILC) і пористих глинистих гетероструктур (PCH), які використовують як ефективні носії каталітично активних фаз редокс-перетворень [2, 3]. Саме таку активність мають ензими класу оксидоредуктаз, які здатні каталізувати як окислення, так і відновлення різноманітних сполук

за рахунок наявності в них пероксидаз, які є гемовими білками з молекулярною масою в діапазоні від 30 до 150 кіло Дальтон (KD) та специфічною простетичною групою ферипротопорфірин IX, також відомий як залізо (III) протопорфірин IX [4]. Найчастіше органічні та неорганічні речовини на поверхні мінералів та у міжшаровому просторі утворюють певні просторові структури, які мають нові фізико-хімічні властивості та відрізняються властивостями від вихідних реагентів, але успадковують певні властивості та функції вихідних компонентів. Утворення таких структур відбувається або під час гелеутворення гідрозолів, що виникає внаслідок асоціації частинок у водній суспензії (наприклад, через водневі зв'язки між групами, що належать до різних частинок), або внаслідок гідролітичної поліконденсації вихідних сполук у водно-органічних середовищах [2–4]. При використанні гідролітичних методів в алюмосилікатах на першому етапі – гідролізі металоксидних компонентів – утворюється зв'язок М-ОН, який є нестійким і реагує з органічними компонентами. На другому етапі лабільна група М-ОН конденсується з іншими М-ОН або М-OR (коли вихідним продуктом золь-гель-процесу були органічні сполуки з ОН-групами) груп для утворення М-О-М-зв'язків і виведення води або спиртів. Таким чином утворюється тривимірна ґратка. Як правило, отриманий проміжний продукт не повністю конденсується на поверхні [5–7] й до його складу входять вода або ОН-групи. Отже, отримані продукти можна класифікувати як гідратовані оксиди. При використанні шаруватих алюмосилікатів зв'язування органічної компоненти здійснюється

у міжшаровому просторі з приєднанням метоксильних груп до октаедричного шару. Зміна хімічної природи органічної складової впливає на параметри міжшарового простору вихідної структури [8]. Але досліджень впливу неорганічної складової, яку було попередньо інтеркальовано у міжшаровий простір алюмосилікату, на утворення таких структур майже не проводили, особливо оксидів заліза, які присутні у всіх зразках природних алюмосилікатів [9–10]. Тому метою цієї роботи було встановлення впливу суміші FeO та Fe₂O₃ на зміну поверхневої структури, фазового складу та міжшарового простору орґано-мінеральної гібридної структури на основі модифікованого залізом природного бентоніту та рослинного ферментного препарату з *Raphanus Sativus* L.

ЕКСПЕРИМЕНТ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ. Як носії для іммобілізації ферментного препарату використовували природний бентоніт, модифікований магнетитом (родовище Дашуківка, Україна). Оцінку питомої поверхні бентоніту проводили методом БЕТ на приладі «СОРБІ-М» шляхом порівняння обсягів газу-адсорбата, сорбуючого досліджуваним зразком і стандартним зразком матеріалу (Al₂O₃) з відомою питомою поверхнею. Вимірювання питомої поверхні проводили за 4-х-точковим методом БЕТ. Як газ-адсорбат у цій модифікації використовували газоподібний азот (Табл.1). Модифікацію природного бентоніту проводили наступним шляхом: до 10 мл водного розчину FeCl₃ з концентрацією 1М/дм³ додавали наважку бентоніту масою 10 г. Отриману суспензію перемішували протягом 30 хв для отримання стійкої суспензії. Далі до неї додавали 25% водний

розчин NH_3 по краплям до рН 9. Отриманий модифікат відмивали дистильованою водою до значення рН 8 та висушували за

кімнатної температури упродовж 7 діб до досягнення природної вологості модифікованого бентоніту.

Таблиця 1

Склад, природна вологість, структура, площа питомої поверхні та значення рН водної суспензії природного бентоніту

Table 1.

Composition, natural humidity, structure, specific surface area and pH value of an aqueous suspension of natural bentonite.

Склад, мас. %	рН суспензій	Структура	$S_{\text{уд}}$, $\text{м}^2/\text{г}$
SiO_2 – 58.3; Al_2O_3 – 12.8; Fe_2O_3 – 6.8; CaO – 1.45; MgO – 1.6; $\text{Na}_2\text{O}+\text{K}_2\text{O}$ – 0.5; Вологість – 9.3	8	Шарувата Розмір одиничної структури 50–110 нм	$37 \pm$

Ферментний препарат отримували шляхом змішування 3 г рослинної маси з 25 г скляних гранул (розмір 0,25 мм), 7 мл фосфатного буфера рН 6,86 і розтиранням протягом 5 хв. Значення рН для виділення ферментного препарату вибирали відповідно до рН максимальної активності пероксидази хрону рН 5–8 [4]. Виділення препарату проводили в центрифугі «СМ-50» на швидкості 7 000 об / хв протягом 10 хв. Прозору надосадову рідину використовували як джерело ферментного препарату. Імобілізацію проводили методом поглинання ферментного препарату з 20% розчину у фосфатному буфері при рН 6,86. Модифікований залізом бентоніт масою 10 г заливали розчином ферментної суміші об'ємом 100 мл за температури 25 °С і витримували протягом 2 год на повітрі. Для вивчення впливу часу контакту препарату з носієм було виготовлено інші зразки, які витримували 48 год на повітрі.

Отриманий матеріал (неорганічний носій – ферментний препарат) відокремлювали від вихідного розчину фільтруванням з подальшою сушкою на повітрі протягом 48 год. Зразки матеріалу зберігали без доступу повітря в поліетиленових контейнерах.

ІЧ-спектри отримували зі зразків, з яких було видалено вологу протягом тривалого висушування (декілька діб) за температури 60 °С. Усі спектри записували за допомогою спектрометра Nicolet Nexus 470. ІЧ-спектри порушеного повного внутрішнього відбиття (attenuated total reflection, ATR) записували для перетертих порошкоподібних зразків за допомогою приставки ППВВ Smart Orbit (виробництво фірми Thermo Scientific), оптичний елемент – діамант, кут падаючого променя $\theta=45^\circ$. Діапазон – 4000–400 см^{-1} , кількість сканів – 128, роздільна здатність – 4 см^{-1} . Фон записували відносно оптичного елемента без зразка.

Фазовий склад зразків встановлювали рентгенофазовим аналізом (РФА) на дифрактометрі «ДРОН-4-07» із $\text{CuK}\alpha$ -випромінюванням в інтервалі $2\theta = 5-60^\circ$ із кроком знімання $0,05^\circ$ та експозицією 3с. Похибка вимірювання – до 1 %. Для розшифрування фазового складу використовували базу даних Міжнародного комітету порошкових дифракційних даних (ICDD) та комп'ютерну програму Match, розроблену Dr. K. Brandenburg & Dr. H. Putz GbR (Germany). Базальні відстані зразків бентоніту розраховували за формулою Брегга – Вульфа:

$$2d\sin\theta = n\lambda; \text{ звідси:}$$

$$d = \frac{n\lambda}{2\sin\theta}$$

λ – 1,54178 (лампа випромінювання $\text{Cu K}\alpha$);
 n – 1 (кількість зразків під час одного зняття);
 θ – бреггівські кути відбивання.

У спектрі бентоніт залізо – фермент (Рис. 1 а, б, табл. 2) було ідентифіковано най-

більш характерні для бентоніту смуги поглинання, які зумовлені коливаннями Si-O-зв'язків (максимуми на 441 та 1118 cm^{-1}), 514 – коливання Si-O-Al-зв'язків; коливання OH-груп мають максимуми смуг поглинання в межах 3750–3400 та при 987 cm^{-1} . Також було виявлено характерні смуги коливань амідних груп білків на 1637 cm^{-1} – ν -коливання зв'язків C=O (амід I), 713 cm^{-1} – δ -коливання O=C-N у площині (амід IV) можуть брати участь у сорбційному зв'язуванні ферменту з бентонітом. Також SiO₂-групи частіше беруть участь у процесах адсорбції з утворенням слабких зв'язків із зовнішньою частиною білка, яка з часом зникає завдяки дифузії молекули білка у пори. Ця адсорбція викликає тільки зміни у вторинній структури молекули білка та його термічну стабільність [11]. Також у цьому випадку існує велика ймовірність утворення крос-лінкерного зшивання молекули ензиму з поверхнею, що є характерною для адсорбційних поверхневих структур [12].

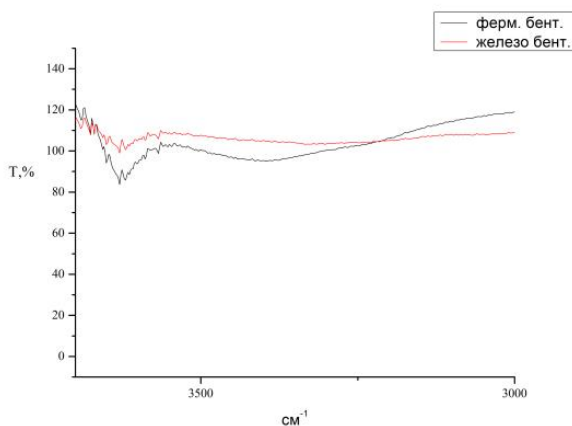


Рис. 1а. ІК-спектри природного бентоніту з ферментом та природного бентоніту із залізом (Fe) у діапазоні (3700–3000 cm^{-1})

Fig. 1a IR-spectrum of the natural bentonite with enzymes' preparation and natural bentonite with iron oxides.

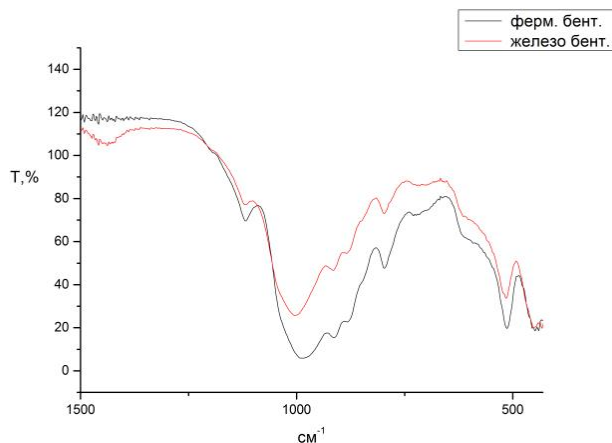


Рис. 1б. ІК-спектри природного бентоніту з ферментом та природного бентоніту із залізом (Fe) у діапазоні (1500–430 cm^{-1})

Fig. 1b IR-spectrum of the natural bentonite with enzymes' preparation and natural bentonite with iron oxides.

Таблиця 2

Характеристичні довжини хвиль ІЧ-спектрів іммобілізованого ферменту на бентоніт-залізовмісний носій

Table 2.

Characteristic wavelengths of IR spectra of immobilized enzyme on bentonite-iron carrier.

Частота коливань (см ⁻¹)		Тип коливань	Атомні групи [55]
3700	3621	ν	-ОН (структурн.)
3400	3396	ν	H ₂ O (адс.)
1627–1683	1637	δ	C=O
1100	1118	ν	Si-O-Si
	987	δ	-ОН
970	912	ν	P-O
850–1100	877	ν	молекули тетраедрів, що складаються з атомів O ₂ з атомами Si всередині
730–760	796	ν	SiO ₂ групи
613–700	713	δ	O=C-N у площині (амід IV)
525	514	δ	Змішані Si-O-Al і Mg-O
470	430	δ	Fe(III)-O в окт. позиції

Порівняння даних РФА-зразків природного бентоніту, бентоніту, модифікованого залізом та зразків модифікованого залізом бентоніту з органічною складовою (ферментного рослинного препарату) (Рис. 2) встановило збільшення інтенсивності окремих фаз магнетиту та зменшення максимумів інтенсивності монтморілоніту в малокутовому діапазоні (Θ – 7,11÷7,45) відносно чистого бентоніту для всіх зразків, але максимальне зменшення спостерігали в модифікованому залізом бентоніті (з 6500 до 900), подальша модифікація цього бентоніту ферментним препаратом при-

звела до збільшення інтенсивності цього піку у разі витримки 2 години – збільшення інтенсивності з 900 до 2000, за 48 год – з 900 до 1600. Це свідчить, що оксиди заліза можуть утворювати конгломерати із залишками денатурованого під дією гідролізу білка, що узгоджується з даними робіт [2–4].

Подальша ідентифікація даних РФА та розрахунки базальних відстаней у міжшаровому просторі (таблиця 3–6) підтвердили вплив надлишків оксидів заліза на входження ферментного препарату у міжшаровий простір шаруватого алюмосилікату (монтморілоніту) (рис. 3, табл. 3–6).

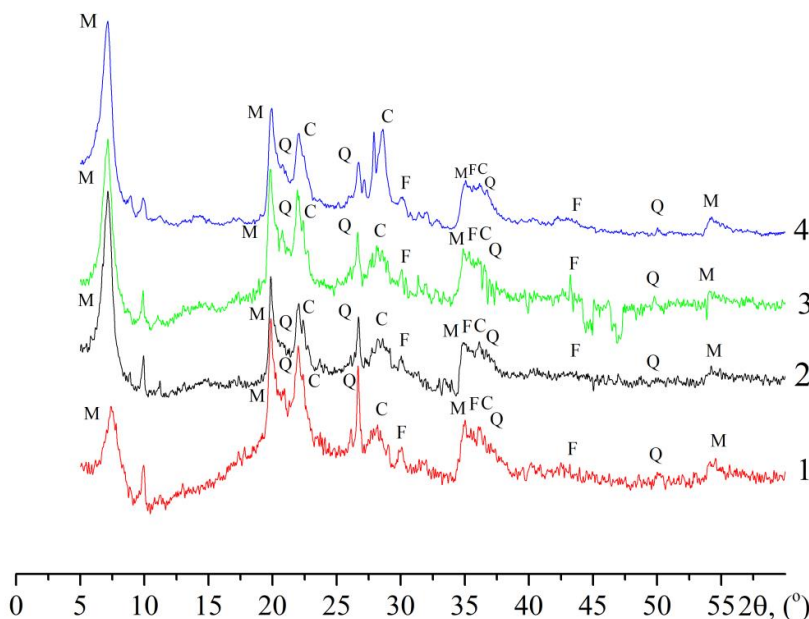


Рис. 2. РФА бентоніту у діапазоні $2\theta = 5-60^\circ$: 1 – бентоніту з магнетитом без органічної складової; 2 – бентоніту з магнетитом та органічною складовою після виготовлення (2 год.); 3 – бентоніту з магнетитом та органічною складовою після виготовлення (48 год.); 4 – природного бентоніту. Умовні позначення: М – монтморилоніт; Q – SiO_2 (кварц); C – SiO_2 (кристобаліт); F – Fe_3O_4 (магнетит)

Fig. 2. XRD of bentonite in the range $2\theta = 5-60^\circ$: 1 – bentonite with magnetite without an organic component; 2 – bentonite with magnetite and an organic component after production (2 hours); 3 – bentonite with magnetite and an organic component after production (48 hours); 4 – natural bentonite. Conventional designations: M – montmorillonite; Q – SiO_2 (quartz); C – SiO_2 (cristobalite); F – Fe_3O_4 (magnetite).

Порівняння базальних відстаней у зразках встановило наступну залежність $12,43 \text{ \AA}$ бентоніт+ Fe_3O_4 +enz (48 год) > $12,38 \text{ \AA}$ природний бентоніт > $12,31 \text{ \AA}$ бентоніт+ Fe_3O_4 +enz (2 години) > $11,91 \text{ \AA}$ бентоніт+ Fe_3O_4 , що свідчить про велику ймовірність входження сполук заліза у міжшаровий простір за рахунок гідролізу магнетиту з утворенням зв'язків $\text{Fe}-(\text{OH})_n$ та нестійких сполук, які здатні конденсуватися у наночастинки Fe_3O_4 у тривимірну ґратку [6, 7, 13]. Наявність такої структури призводить до зменшення базальної відстані та міжшарового простору алюмосилікату. Введення ензиму збільшує цю відстань на 3 % (що

перевищує похибку вимірювання) $12,31 \text{ \AA}$, але ця відстань значно менша за розміри молекули пероксидази, яка може мати мінімальний розмір $28,45 \text{ \AA}$. Тобто, в міжшаровий простір можуть входити або продукти денатурації ферменту, або продукти гідролізу заліза. З урахуванням здатності природних алюмосилікатів до розширення ґратки за присутності води (набухання), незначна зміна базальної відстані є можливою саме за рахунок накопичення певної кількості молекул води, які утворюються в результаті взаємодії ферменту з поверхнею алюмосилікату, де за присутності води можливий гідроліз металоксидних

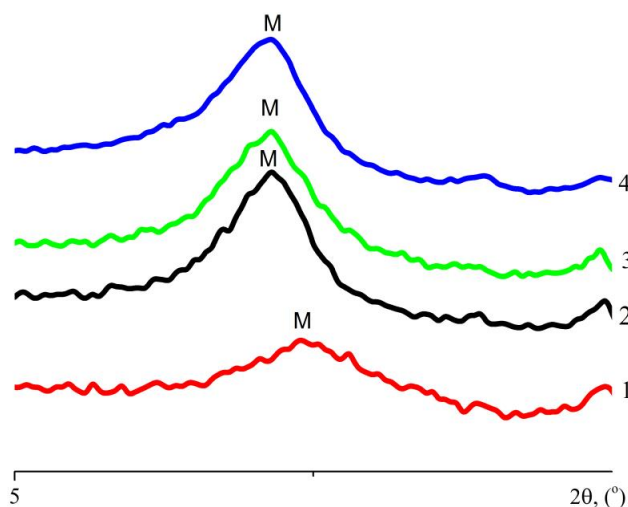


Рис. 3. РФА-рефлекси монтморилоніту у малокутовому діапазоні: 1 – бентоніту з магнетитом без органічної складової; 2 – бентоніту з магнетитом та органічною складовою після виготовлення (2 год.); 3 – бентоніту з магнетитом та органічною складовою після виготовлення (48 год.); 4 – природного бентоніту

Fig. 3. XRD-reflections of montmorillonite in the small-angle range: 1 – bentonite with magnetite without an organic component; 2 – bentonite with magnetite and an organic component after production (2 hours); 3 – bentonite with magnetite and an organic component after production (48 hours); 4 – natural bentonite.

компонентів з утворенням зв'язку $-Fe-OH$, який є нестійким і реагує з органічними компонентами. За даними авторів [14], ферменти, як і білки, виявляють сильну спорідненість з поверхнею шаруватих мінералів. Процес зв'язування ферменту з поверхнею має декілька етапів: 1 – транспортування ферменту до поверхні (межі розподілу фаз); 2 – осадження на поверхні, 3 – розгортання ферменту, 4 – відрив ферменту від поверхні, 5 – транспортування від поверхні, 6 – перебудова адсорбованого ферменту. Але якщо мінерал та білок мають однакові центральні атоми у адсорбційних комплексах (залізо в гемі ферменту та залізо у міжшаровому просторі у формі гідроксокомплексу), то можлива стійка агрегація білка на поверхні з подальшим розгортанням

ферменту на поверхні шару алюмосилікату. Припущення про розгортання ферменту та утворення агрегатів із магнетитом корелює з часом контакту з білком [13, 15, 16].

Таким чином, іммобілізація ферменту у разі бентоніту, модифікованого залізом, буде мати наступні етапи: 1 – транспортування ферменту до поверхні (межі розподілу фаз); 2 – деформація ферменту під дією поверхні в результаті реакції поліконденсації з утворенням додаткових молекул води; 3 – входження молекул води у міжшаровий простір; 4 – гідроліз частинок магнетиту; 5 – вилучення гідроксиду заліза з міжшарового простору за рахунок утворення агрегатів з молекулою ферменту, який має споріднений адсорбційний центр (рис. 4).

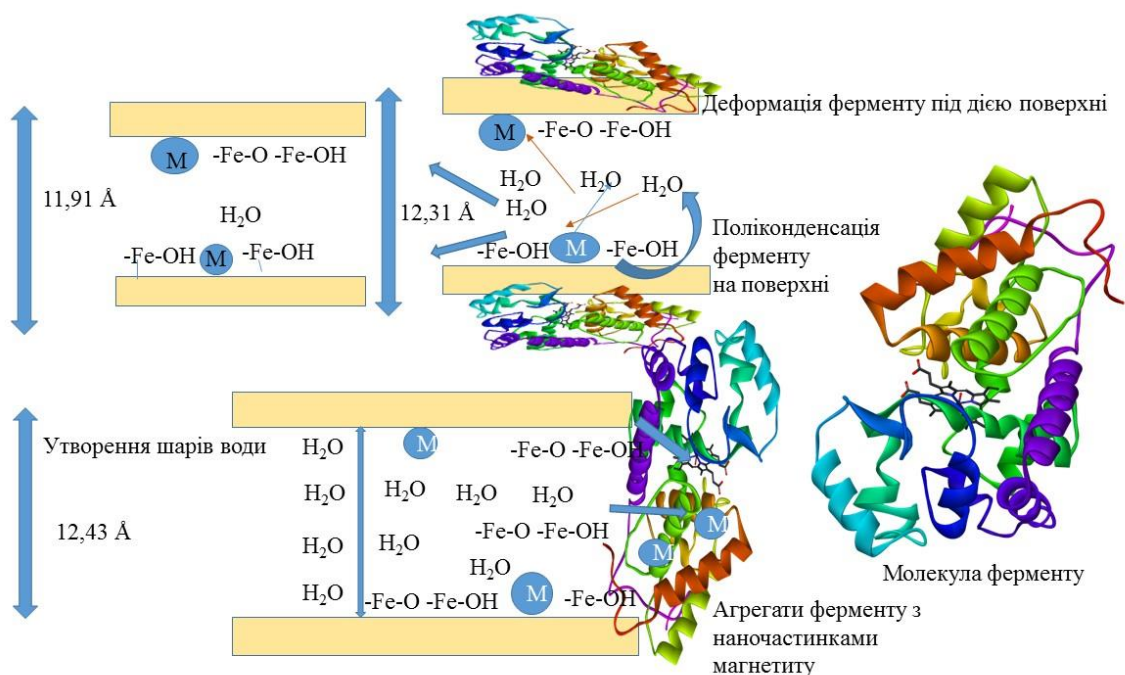


Рис. 4. Схема взаємодії ферменту з модифікованим залізом шаруватим алюмосилікатом
 Fig. 4. Scheme of the interaction of the enzyme with the modified iron layered aluminosilicate.

Таблиця 3

Table 3.

Фазовий склад суміші природного бентоніту

Phase composition of natural bentonite mixture.

Фазовий склад	№ картки ICDD	2θ	d(Å)
Montmorillonite	00-012-0232	7,14	12,38021
Montmorillonite	00-012-0232	19,9	4,461461
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	20,76	4,278543
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	22,03	4,03468
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	26,7	3,338647
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	28,57	3,124234
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	30,16	2,963053
Montmorillonite	00-012-0232	35,35	2,539018
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	35,48	2,530013
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	36,16	2,483981
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	36,69	2,449307
Montmorillonite	00-012-0232	40,59	2,222521
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	43,06	2,100584
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	50,02	1,823399
Montmorillonite	00-012-0232	54,25	1,690796

Таблиця. 4

Фазовий склад суміші бентоніту з магнетитом без органічної складової

Table 4.

Phase composition of a mixture of bentonite with magnetite without an organic component.

Фазовий склад	№ картки ICDD	2θ	d(Å)
Montmorillonite	00-012-0232	7,42	11,91365
Montmorillonite	00-012-0232	19,86	4,470356
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	20,87	4,25624
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	21,99	4,041928
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	26,66	3,343566
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	28,41	3,141464
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	30,1	2,968822
Montmorillonite	00-012-0232	34,98	2,565022
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	35,45	2,532085
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	36,19	2,48199
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	36,53	2,459666
Montmorillonite	00-012-0232	40,38	2,233594
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	43,01	2,10291
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	50,06	1,822035
Montmorillonite	00-012-0232	54,55	1,682204

Таблиця 5

Фазовий склад суміші бентоніту з магнетитом та органічною складовою після виготовлення (2 год.)

Table 5.

Phase composition of the mixture of bentonite with magnetite and an organic component after production (2 hours).

Фазовий склад	№ картки ICDD	2θ	d(Å)
Montmorillonite	00-012-0232	7,18	12,31133
Montmorillonite	00-012-0232	19,87	4,468129
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	20,75	4,280583
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	22,04	4,032872
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	26,72	3,336194
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	28,6	3,121025
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	30,15	2,964013
Montmorillonite	00-012-0232	34,84	2,575008
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	35,47	2,530703
SiO ₂ (Cristobalite)	082-1403	36,14	2,485309
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	36,67	2,450597
Montmorillonite	00-012-0232	40,37	2,234124
Fe ₃ O ₄ (Magnetite)	076-0958	43,05	2,101049
SiO ₂ (Quartz)	087-2096	50,13	1,819655
Montmorillonite	00-012-0232	54,24	1,691084

Таблиця 6

Фазовий склад суміші бентоніту з магнетитом та органічною складовою після виготовлення (48 год.)

Table 6.

Phase composition of the mixture of bentonite with magnetite and an organic component after production (48 hours).

Фазовий склад	№ картки ICDD	2θ	d(Å)
Монтморилоніт	00-012-0232	7,11	12,43238
Монтморилоніт	00-012-0232	19,78	4,488255
SiO ₂ (Кварц)	087-2096	20,72	4,286713
SiO ₂ (Кристобаліт)	082-1403	21,91	4,056505
SiO ₂ (Кварц)	087-2096	26,59	3,352209
SiO ₂ (Кристобаліт)	082-1403	28,6	3,121025
Fe ₃ O ₄ (Магнетит)	076-0958	30,15	2,964013
Монтморилоніт	00-012-0232	34,83	2,575724
Fe ₃ O ₄ (Магнетит)	076-0958	35,47	2,530703
SiO ₂ (Кристобаліт)	082-1403	36,14	2,485309
SiO ₂ (Кварц)	087-2096	36,67	2,450597
Монтморилоніт	00-012-0232	40,37	2,234124
Fe ₃ O ₄ (Магнетит)	076-0958	43,04	2,101514
SiO ₂ (Кварц)	087-2096	50,13	1,819655
Монтморилоніт	00-012-0232	54	1,698031

ВИСНОВКИ. ІЧ- та РФА-аналіз бентоніту, модифікованого магнетитом та ензимом, встановив залежність іммобілізації ферменту від наявності оксидів заліза. ІЧ-дослідженнями доведено, що зв'язування ферменту з носієм має адсорбційний характер без утворення стійких хімічних взаємодій. Такий вид зв'язування незначно впливає на зміну структури молекули ферменту. Було виявлено характерні смуги коливань амідних груп білків на 1637 см⁻¹ – ν-коливання зв'язків C=O (амід I), 713 см⁻¹ – δ-коливання O=C-N у площині (амід IV), які можуть брати участь у сорбційному зв'язуванні ферменту з бентонітом, та SiO₂-групи, які характеризуються слабким зв'язком зовнішньої частини білку з утворенням

поверхневої структури, яка з часом зникає завдяки дифузії молекули у пори мінералу. Порівняння базальних відстаней у зразках встановило наступну залежність: 12,43 Å бентоніт+ Fe₃O₄+enz (48 год) > 12,38; Å природний бентоніт > 12,31; Å бентоніт+ Fe₃O₄+enz (2 години) > 11,91; Å бентоніт+ Fe₃O₄, що свідчить про велику ймовірність входження сполук заліза у міжшаровий простір за рахунок гідролізу магнетиту з утворенням зв'язків Fe-(OH)_n та нестійких сполук. За результатами досліджень запропоновано схему взаємодії ферменту з модифікованим залізом шаруватим алюмосилікатом: 1 – транспортування ферменту до поверхні (межі розподілу фаз); 2 – деформація ферменту під дією поверхні в

результаті реакції полікондесзації з утворенням молекул води; 3 – входження молекул води у міжшаровий простір; 4 – гідроліз частинок магнетиту; 5 – вилучення гідроксиду заліза з міжшарового простору за рахунок утворення агрегатів із молекулою ферменту, який має споріднений адсорбційний центр.



Роботу виконано в рамках національного проєкту 316НТ «Розроблення матеріалів і процесів для вилучення цінних і токсичних компонентів із рідин біогенного та техногенного походження».

CHARACTERISTICS OF THE BINDING BETWEEN THE ENZYME PREPARATION *RAPHANUS SATIVUS* L. AND NATURAL LAYERED ALUMOSILICA IN THE PRESENCE OF IRON OXIDES

**O.V. Boychuk¹, Ye.S. Pletynets¹,
K.D. Pershina^{1,2}, E.O. Kolomiets¹**

¹*V.I. Vernadsky Institute of General and Inorganic Chemistry NAS of Ukraine,
32/34 Acad. Palladin Ave., 03142 Kyiv, Ukraine*

²*Joint Department of Electrochemical Energy Systems NAS of Ukraine,*

*38-A Acad. Vernadsky Ave., 03142 Kyiv, Ukraine
e-mail: Pershina@ionc.kiev.ua*

IR and X-ray analyses of bentonite modified with magnetite and enzyme established the dependence of enzyme immobilization on the presence of iron oxides. IR studies have proven that the binding of the enzyme to the carrier is adsorption in nature without stable

chemical interactions. This type of binding does not significantly affect the change in the structure of the enzyme module. Characteristic bands of vibrations of amide groups of proteins were detected at 1637 cm^{-1} (ν -vibrations of C=O bonds (amide I)), 713 cm^{-1} (δ -vibrations of O=C-N in the plane (amide IV)), which can participate in the sorption binding of the enzyme to bentonite and the SiO_2 group, which is characterized by a weak connection of the outer part of protein with the formation of a surface structure, which disappears over time due to the diffusion of molecules into the pores of the mineral. Comparison of the basal distances in the samples established the following dependence: $12.43\text{ \AA}$ bentonite+ Fe_3O_4 +enz (48 h) > $12.38\text{ \AA}$; $12.31\text{ \AA}$ natural bentonite+ Fe_3O_4 +enz (2 hours) > $11.91\text{ \AA}$; $12.31\text{ \AA}$ bentonite+ Fe_3O_4 , which indicates a high probability of iron compounds entering the interlayer space due to the hydrolysis of magnetite with the formation of $\text{Fe}(\text{OH})_n$ bonds and unstable compounds. According to the research results, a scheme of the interaction of the enzyme with modified layered iron aluminosilicate is proposed: 1 – transport of the enzyme to the surface (phase distribution boundaries); 2 – deformation of the enzyme under the action of the surface as a result of a polycondensation reaction with the formation of water molecules; 3 – entry of water molecules into the interlayer space; 4 – hydrolysis of magnetite particles; 5 – extraction of iron hydroxide from the interlayer space due to the formation of aggregates with an enzyme molecule that has a related adsorption center.

Keywords: bentonite, magnetite, modification, *Raphanus Sativus* L., IR-spectroscopy, XRD-analysis.

REFERENCES

1. Matusik J., & Kłapyta Z. Characterization of kaolinite intercalation compounds with benzylalkylammonium chlorides using XRD, TGA/DTA and CHNS elemental analysis. *Applied Clay Science*. 2013. **83**: 433–440.
2. Chmielarz L., Kuśtrowski P., Piwowarska Z., Dudek B., Gil B., Michalik M. Montmorillonite, vermiculite and saponite based porous clay heterostructures modified with transition metals as catalysts for the DeNOx process. *Applied Catalysis B*. 2009. **88**: 331–340.
3. Galarneau A., Barodawalla A., Pinnavaia T.J. Porous clay heterostructures formed by gallery templated synthesis. *Nature*. 1995. **374**: 529.
4. Akbar H., Sedzro D. M., Khan M., Bellah S. F., & Billah S.S. Structure, function and applications of a classic enzyme: Horseradish peroxidase. *J. Chem. Environ. Biol. Eng.* 2018. **2**(2): 52–59.
5. Rouster P., Dondelinger M., Galleni M., Nysten B., Jonas A.M., & Glinel K. Layer-by-layer assembly of enzyme-loaded halloysite nanotubes for the fabrication of highly active coatings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. **178**: 508–514.
6. Campos G.P., Albuquerque E.M., Fraga M.A., & Pastore H.O. Continuous Cellobiose Hydrolysis over Lamellar Aluminosilicates—Unveiling [Al]-magadiite Water-Tolerant Acid Sites. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2021. **60**(13): 4794–4805.
7. Thomas A., Tripathi R.K., & Yadu L.K. A laboratory investigation of soil stabilization using enzyme and alkali-activated ground granulated blast-furnace slag. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2018. **43**: 5193–5202.
8. Díaz U., & Corma A. Organic-Inorganic Hybrid Materials: Multi-Functional Solids for Multi-Step Reaction Processes. *Chemistry—A European Journal*. 2018. **24**(16): 3944–3958.
9. Rodrigues I.A., Villalba J.C., Santos M.J., Melquiades F.L., & Anaissi F.J. Smectitic clays enriched with ferric ions for the rapid removal of anionic dyes in aqueous media. *Clay Minerals*. 2020. **55**(1): 12–23.
10. Srodon J., Drits V.A., McCarty D.K., Hsieh J.C., & Eberl D.D. Quantitative X-ray diffraction analysis of clay-bearing rocks from random preparations. *Clays and Clay Minerals*. 2001. **49**(6): 514–528.
11. Pota G., Gallucci N., Cavasso D., Krauss I. R., Vitiello G. Controlling the Adsorption of β -Glucosidase onto Wrinkled SiO₂ Nanoparticles To Boost the Yield of Immobilization of an Efficient Biocatalyst. *Langmuir*. **2023**
12. Sun H., Jin X., Jiang F., & Zhang R. Immobilization of horseradish peroxidase on ZnO nanowires/macroporous SiO₂ composites for the complete decolorization of anthraquinone dyes. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2018. **65**(2): 220–229.
13. Iype T., Thomas J., Mohan S., Johnson K. K., George L. E., Ambattu L. A., ... & Ramchand C. N. A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking. *Analytical biochemistry*. 2017. **519**: 42–50.
14. Datta R., Anand S., Moulick A., Baraniya D., Imran Pathan S., Rejsek K., & Kelkar A. How enzymes are adsorbed on soil solid phase and factors limiting its activity: A Review. *International agrophysics*. 2017. **31**(2).
15. Jiang D., Ni D., Rosenkrans Z. T., Huang P., Yan X., & Cai W. Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 2019. **48**(14): 3683–3704
16. Nazir M.S., Mohamad Kassim M.H., Mohapatra L., Gilani M.A., Raza M.R., & Majeed K. Characteristic properties of nanoclays and characterization of nanoparticulates and nanocomposites. *Nanoclay reinforced polymer composites: Nanocomposites and bionanocomposites*. 2016. 35–55.

Стаття надійшла 12.03.2023.