



## Статья

## Каталазоподобная активность НЧ металлов – биогибридов ферментов

Ноэлия Лосада-Гарсия , Альба Родригес-Отеро, Клара Ортега-Ньето, Ариан Азарми и Хосе М. Паломо \*

Институт катализа и нефти (ICP), CSIC, C/Marie Curie 2, 28049 Мадрид, Испания \* Адрес для переписки: josempalomo@icp.csic.es

**Аннотация:** В работе описан эффективный синтез бионаногибридов в виде искусственных металлоферментов (Cu, Pd, Ag, Mn), основанный на использовании фермента в качестве каркаса. Здесь мы оценили влияние изменения металла, pH среды и количества фермента на синтез этих искусственных металлоферментов, при котором происходят изменения вида металла и размера наночастиц. Эти нанозимы были применены при деградации пероксида водорода для их оценки в качестве имитаторов активности каталазы, лучшим из которых является Mn@CALB-H<sub>2</sub>O, который представляет наноструктуры MnO<sub>2</sub> с трехкратной повышенной активностью по сравнению с видами Cu<sub>2</sub>O, CuNPs@CALB. -P и свободная каталаза.

**Ключевые слова:** бионаногибриды металлов; нанозимы; каталазоподобная активность; пероксид водорода

## 1. Введение

Перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) является побочным продуктом, вырабатываемым внутри клеток живых организмов и оказывающим на них губительное воздействие [1–4]. Каталазы — это ферменты, используемые клетками для удаления избытка цитоплазматической перекиси водорода путем преобразования ее в воду и молекулярный кислород. Однако если концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> увеличивается из-за болезни, радиационного воздействия, а также некоторых химических веществ и лекарств, которые превышают мощность каталазы, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> начинает накапливаться и вызывать повреждение клеток [5–8]. С другой стороны, на активность фермента каталазы могут влиять различные условия окружающей среды, такие как ионная сила, pH и температура (T), или присутствие соединений, ингибирующих фермент.

Бурное развитие нанотехнологий в последние десятилетия привело к созданию многочисленных каталитически активных наноматериалов [11]. В настоящее время наноматериалы различной природы широко используются в биологии, медицине и биотехнологии. В эту категорию входят наноматериалы с ферменто-миметическими свойствами, такие как металлические и неметаллические наночастицы, их оксиды, магнитные наночастицы, липосомы, а также полимерные и углеродные материалы [12–14]. Способность этих наноматериалов заменять определенные ферменты может открыть новые возможности для приложений на основе ферментов, таких как иммуноанализы, биосенсоры, фармацевтические процессы, онкотерапия, пищевая промышленность, экология и т. д. [15–18]. Это демонстрирует большую важность и коммерческий интерес к использованию наноматериалов в качестве миметиков ферментов. По сравнению с природными ферментами нанозимы с присущей ферментной активностью в последнее время привлекли значительное внимание благодаря простоте их получения, хранения и разделения, а также низкой стоимости [18,19].

Одним из наиболее часто используемых металлов при создании искусственных металлоферментов является медь из-за ее распространенности, низкой стоимости и низкой токсичности. Хотя большая часть описанных в литературе активностей относится к материалам Cu(II), фактически недавно в нашей группе были разработаны Cu(II)-нанозимы с каталазной активностью [20].

В данной работе мы описываем синтез высокостабильных гетерогенных катализаторов наночастиц металлов (Cu, Mn, Pd и Ag) (НЧ металлов – биогибридов ферментов), где НЧ создавались *in situ* из водного раствора соли металла (рис. 1А) [21,22]. Кроме того, мы показали, что эти бионаногибриды разной природы, например, других видов меди и разных металлов, поведения и размеров, обладают способностью полностью имитировать особую ферментативную активность каталазы, даже улучшая ее активность (рис. 1Б).



Образец цитирования: Лосада-Гарсия, Н.;

Родригес-Отеро, А.; Ортега-Ньето, К.;

Азарми, А.; Паломо, Дж. М. Каталазоподобная

активность НЧ металлов – биогибридов

ферментов. Прил. Нано 2022, 3, 149–

159. <https://doi.org/10.3390/applnano3030011>

Академический редактор: Анджело Мария

Тальетти

Поступила: 16 июня 2022 г.

Принято: 12 июля 2022 г.

Опубликовано: 7 августа 2022 г.

Примечание издателя: MDPI сохраняет нейтралитет

в отношении заявлений о юрисдикции в

опубликованных картах и институциональной принадлежности.



Копирайт: © 2022 авторов.

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе.

распространяется на условиях и

условия Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY)

([https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

мы показали, что эти бионаногибриды разной природы, например, другие коппе виды и различные металлы, поведение и размеры обладают способностью полностью имитировать особую ферментативную активность каталазы, даже улучшая ее активность (рис. 1В).

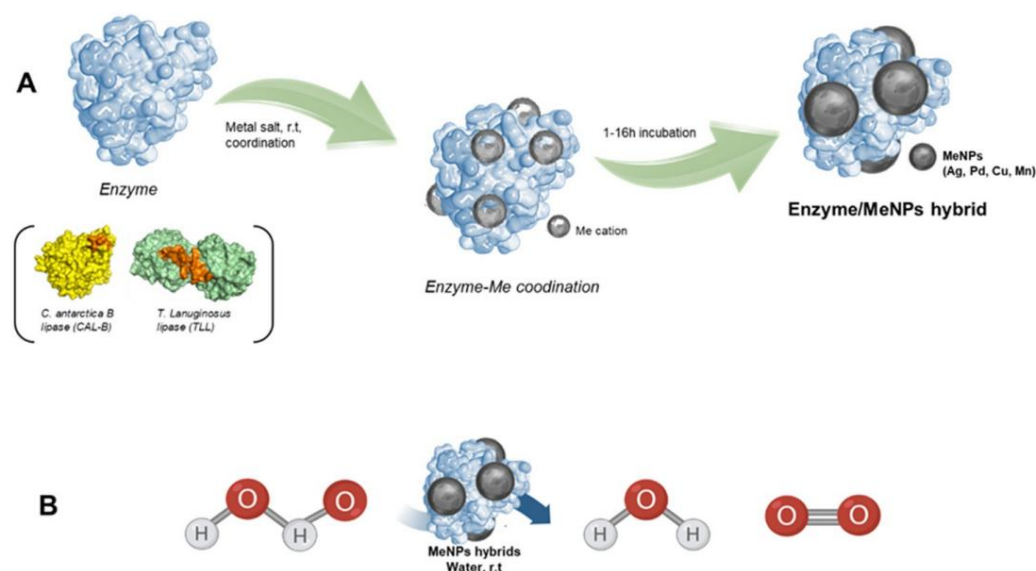


Рисунок 1: (А) Гибридный синтез металлических наночастиц и ферментов; (Б) каталазоподобная активность разных гибридов. Я: металл, НП: наночастицы.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Материалы

раствор липазы В из *Candida antarctica* (CALB) и Catzyme® 25 л (каталаза из *Aspergillus niger*) были приобретены у Novozymes (Копенгаген, Дания). Медь (II)

Раствор липазы В из *Candida antarctica* (CALB) и Catzyme® 25 л (каталаза из пентагидрата сульфата  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , N,N-диметилформамида (ДМФ) и водорода *Aspergillus niger*) были приобретены у Novozymes (Копенгаген, Дания). Пероксид меди (II) (33% об./об.) был получен от PanReac (Барселона, Испания). Бикарбонат натрия, натрий пентагидрат сульфата  $[\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}]$ , N,N-диметилформамид (ДМФ), а также гидрофосфат, боргидрид натрия, перманганат калия, трис-основание и тетрапероксид натрия (33% по объему) – от PanReac (Барселона, Испания). Бикарбонат натрия, хлорпалладат натрия (II) были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Серебро

Фосфат, борагидрид натрия, перманганат калия, основание Трис, тетранитрат натрия и сольват были приобретены

хлорпалладат (II) были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Серебро ни- 2.2. Используемые

методы характеристики

Проведена оптико-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-ОЭС).

2.2. Приборы OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США). Дифракция рентгеновского излучения

характеристик (XRD) были получены с использованием дифрактометра для анализа текстуры D8 Advance (Bruker,

Оптическая эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-ОЭС) была проведена на

Билерике, Массачусетс, США) с  $\text{Cu K}\alpha$ -излучением. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и

формировали на приборе OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Изображения рентгеновской ПЭМ-

микроскопии высокого разрешения (HRTEM) были получены на микроскопе 2100F.

Дифракция рентгеновского излучения (XRD) были получены с использованием дифрактометра для анализа текстуры D8 Advance Diffrac- (JEOL,

тометр (Брукер, Билерик, Массачусетс, США) для исследования. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и

формировали на приборе OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Изображения рентгеновской ПЭМ-

микроскопии высокого разрешения (HRTEM) были получены на микроскопе 2100F.

Дифракция рентгеновского излучения (XRD) были получены с использованием дифрактометра для анализа текстуры D8 Advance Diffrac- (JEOL,

тометр (Брукер, Билерик, Массачусетс, США) для исследования. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и

формировали на приборе OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Изображения рентгеновской ПЭМ-

микроскопии высокого разрешения (HRTEM) были получены на микроскопе 2100F.

Дифракция рентгеновского излучения (XRD) были получены с использованием дифрактометра для анализа текстуры D8 Advance Diffrac- (JEOL,

тометр (Брукер, Билерик, Массачусетс, США) для исследования. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и

формировали на приборе OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Изображения рентгеновской ПЭМ-

микроскопии высокого разрешения (HRTEM) были получены на микроскопе 2100F.

Дифракция рентгеновского излучения (XRD) были получены с использованием дифрактометра для анализа текстуры D8 Advance Diffrac- (JEOL,

тометр (Брукер, Билерик, Массачусетс, США) для исследования. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и

формировали на приборе OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Изображения рентгеновской ПЭМ-

микроскопии высокого разрешения (HRTEM) были получены на микроскопе 2100F.

Дифракция рентгеновского излучения (XRD) были получены с использованием дифрактометра для анализа текстуры D8 Advance Diffrac- (JEOL,

тометр (Брукер, Билерик, Массачусетс, США) для исследования. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и

формировали на приборе OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Изображения рентгеновской ПЭМ-

микроскопии высокого разрешения (HRTEM) были получены на микроскопе 2100F.

Дифракция рентгеновского излучения (XRD) были получены с использованием дифрактометра для анализа текстуры D8 Advance Diffrac- (JEOL,

тометр (Брукер, Билерик, Массачусетс, США) для исследования. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и

формировали на приборе OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Изображения рентгеновской ПЭМ-

микроскопии высокого разрешения (HRTEM) были получены на микроскопе 2100F.

было получено твердое вещество. Гибрид получил название CuNPs@CALB-P. Другой вариант протокола заключался в отказе от стадии лиофилизации и сохранении катализатора в виде жидкой суспензии. Это называлось CuNPs@CALB-P-NL.

Другие гибриды были синтезированы по ранее установленным протоколам в различных условиях pH, сушки и восстановления (таблица S1), которые были проверены в нашей работе [23]. Эти бионаногибриды получили названия CuNPs@CALB-P\*, CuNPs@CALB-B и CuNPs@CALB-B\*.

#### 2.4. Синтез бионаногибридов MnNPs@CALB 2.4.1.

##### Способ 1

Всего 3 мл коммерческого раствора CALB (10 мг/мл) добавляли к 100 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0, в стеклянной бутылке емкостью 250 мл, содержащей небольшую магнитную стержневую мешалку. Затем к раствору белка добавляли 70 мг  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (0,7 мг/мл) и выдерживали 16 ч. Через 16 ч к мутному раствору (в двух порциях по 3 мл) добавляли 6 мл водного раствора  $\text{NaBH}_4$  (300 мг) (1,2 М) в качестве восстановителя. Смесь кипятили в течение 30 мин. После инкубации смесь центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (10 мл на пробирку типа «falcon» емкостью 15 мл). Образовавшийся осадок ресуспендировали в 15 мл дистиллированной воды. Снова центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Процесс повторился еще дважды. Наконец, надосадочную жидкость удаляли и осадок каждого сокола ресуспендировали в 2 мл дистиллированной воды; все растворы собирали в круглодонную колбу, замораживали жидким азотом и лиофилизировали в течение 16 ч. После этого было получено 47 мг MnNPs @CALB-P .

Другим вариантом протокола было отсутствие этапа восстановления с использованием натрий-фосфатного буфера 25 mM при pH 8,5. После этого было получено 58 мг MnNPs @CALB-P-NR .

##### 2.4.2. Способ 2

$\text{KMnO}_4$  (500 мг) растворяли в 10 мл ДМФА или дистиллированной воды. Этот раствор добавляли к 40 мл раствора дистиллированной воды, содержащего 2 мл CALB (10 мг/мл). Конечный раствор выдерживали при слабом перемешивании магнитной мешалкой в течение 24 часов при комнатной температуре (КТ). После этого полученную суспензию разделяли центрифугированием (10 000 об/мин; 4 °C; 15 мин). Восстановленный осадок промывали один раз 10 мл дистиллированной воды, содержащей 20% (по объему) соответствующего соразтворителя, и дважды дистиллированной водой (2 × 10 мл). После этого суспензию непосредственно лиофилизировали с получением катализатора в виде порошка для последующего использования. После этого ок. Было получено по 350 мг каждого бионаногибрида, названного MnNPs@CALB-H<sub>2</sub>O и MnNPs@CALB-DMF соответственно.

#### 2.5. Синтез бионаногибридов MeNPs@CATb

$\text{AgNO}_3$  (20 мг) или  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  (10 мг) растворяли в 5 мл раствора дистиллированной воды , содержащего 7,5 мг бычьей каталазы (CATb). Раствор выдерживали при слабом магнитном перемешивании в течение 24 часов при комнатной температуре. После этого полученную суспензию разделяли центрифугированием (8000 об/мин; 4 °C; 15 мин). Восстановленный осадок трижды промывали по 10 мл дистиллированной воды. После этого суспензию непосредственно лиофилизировали. Бионаногибриды получили названия AgNPs@CATb и PdNPs@CATb.

Характеризацию бионаногибридов различных металлов проводили методами XRD, ICP-OES, TEM, HR-TEM и SEM-анализ.

#### 2.6. Каталазоподобная активность бионаногибридов

металлов. Раствор перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (33% (мас./мас)) готовили добавлением 52 мкл перекиси водорода к 9,8 мл 100 mM или 5 mM фосфатного буфера (pH 6,0, pH 7,0 и pH 8,0), 5 mM трис-базовый буфер pH 9, 5 mM MES-буфер pH 5 или дистиллированную воду для получения конечной концентрации 50 mM. pH раствора регулировали с помощью HCl или 1 M NaOH. Для начала реакции к 3 или 10 мл добавляли различные количества гибридов MeNP (2 мг или 4,5 мг) или 50 мкл Catzyme® 25 L (31 мг/мл). 50 mM раствора

в РТ. За реакцией следили путем измерения разложения пероксида водорода, регистрируя уменьшение поглощения спектрофотометрически при 240 нм в кварцевых кюветах с длиной пути 1 см путем добавления 2 мл этого раствора в разное время. Эксперименты проводились в трех повторностях.

Чтобы определить активность каталазы для каждого катализатора, значение Abs/мин рассчитывали с использованием линейного участка кривой (Abs). Удельную активность (Ед/мг) рассчитывали по следующему уравнению:

$$U \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} = \frac{\text{Abs} / \text{мин} \cdot V \cdot \epsilon \cdot \text{мг катализатор}}{1000} \quad (1)$$

где использованный молярный коэффициент экстинкции ( $\epsilon$ ) составлял  $43,6 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , и mgcatalyst относится к см-1 мг фермента или гибридного металла.

### 3. Результаты

#### 3.1. Синтез и характеристика биогрибидов MeNPs@Enzyme. Синтез

Биогрибидов MeNPs@Enzyme проводили в водной среде с использованием коммерческого раствора липазы B *Candida antarctica* (CAL-B) или бычьей каталазы (CATb). Этот фермент предварительно растворяли в дистиллированной воде, а соль металла предварительно растворяли в соразвителе (20% (об./об)) или добавляли непосредственно к водному раствору при комнатной температуре и при осторожном перемешивании. Через 30 мин исходный прозрачный раствор превращался в слегка мутную суспензию, которая полностью мутнела через 16–24 ч инкубации. Твердое вещество было легко получено после центрифугирования, которое сначала промывалось тем же реакционным растворителем, а затем дистиллированной водой и, наконец, замораживалось в жидком азоте и лиофилизировалось, давая гибриды MeNPs@CALB. В некоторых случаях было необходимо добавить этап восстановления с использованием NaBH<sub>4</sub> после инкубации, поскольку, хотя фермент CALB, используемый в качестве каркаса, индуцирует восстановление металлов, в металлах с низким потенциалом восстановления, таких как переходные металлы, такие как Cu, Fe, Mn, Zn, Co и т. д., необходим дополнительный этап восстановления для получения видов из состояний с более низкой валентностью.

Во-первых, биогрибиды CuNPs@CALB были проанализированы с помощью XRD, продемонстрировав различия между видами в зависимости от гибридов (рис. 2A). Когда бионаногрибиды содержали 0,6 мг/мл фермента, были получены CuNPs@CALB-P и CuNPs@CALB-B. В этих катализаторах можно было увидеть практически уникальные виды меди Cu<sub>2</sub>O (хорошо соответствует номеру карты JCPDS 05-0667) или Cu(0) (хорошо соответствует номеру карты JCPDS 04-0836) соответственно.

Однако когда количество фермента было меньше (0,3 мг/мл), гибриды, синтезированные по этим протоколам, CuNPs@CALB-P\* и CuNPs@CALB-B\*, содержали обе разновидности меди, Cu<sub>2</sub>O и Cu(0). В случае CuNPs@CALB-P\* в нем содержалось 40% Cu(0) (рис. 2A), а в случае CuNPs@CALB-B\* — 30% частиц Cu(I). Эти различия могут быть связаны с действием фермента на стадии восстановления, поскольку белковая среда замедляет процесс восстановления. Анализ ПЭМ продемонстрировал образование наночастиц с разным размером диаметра (рисунки 2 и S1) в диапазоне от 6 до 15 нм (таблица S1), самые маленькие из которых находятся в CuNPs@CALB-B (рисунок S1D).

Еще одной модификацией протокола синтеза стало исключение этапа лиофилизации, что привело к получению CuNPs@CALB-P-NL. Анализируя рентгенограмму, можно было наблюдать незамерзание структуры фермента; виды этого бионаногрибида представляют собой смесь разновидностей меди [Cu<sub>2</sub>O и Cu(0) (75:25)]. ПЭМ-анализ показал, что размер диаметра наночастиц был таким же, как и у CuNPs@CALB-P, а именно 10 нм (таблица S1).

Количество Cu в твердом веществе определяли с помощью ICP-OES-анализа. Проценты содержания меди в различных гибридах CuNPs@CALB составляло от 45% до 93% (таблица S1).

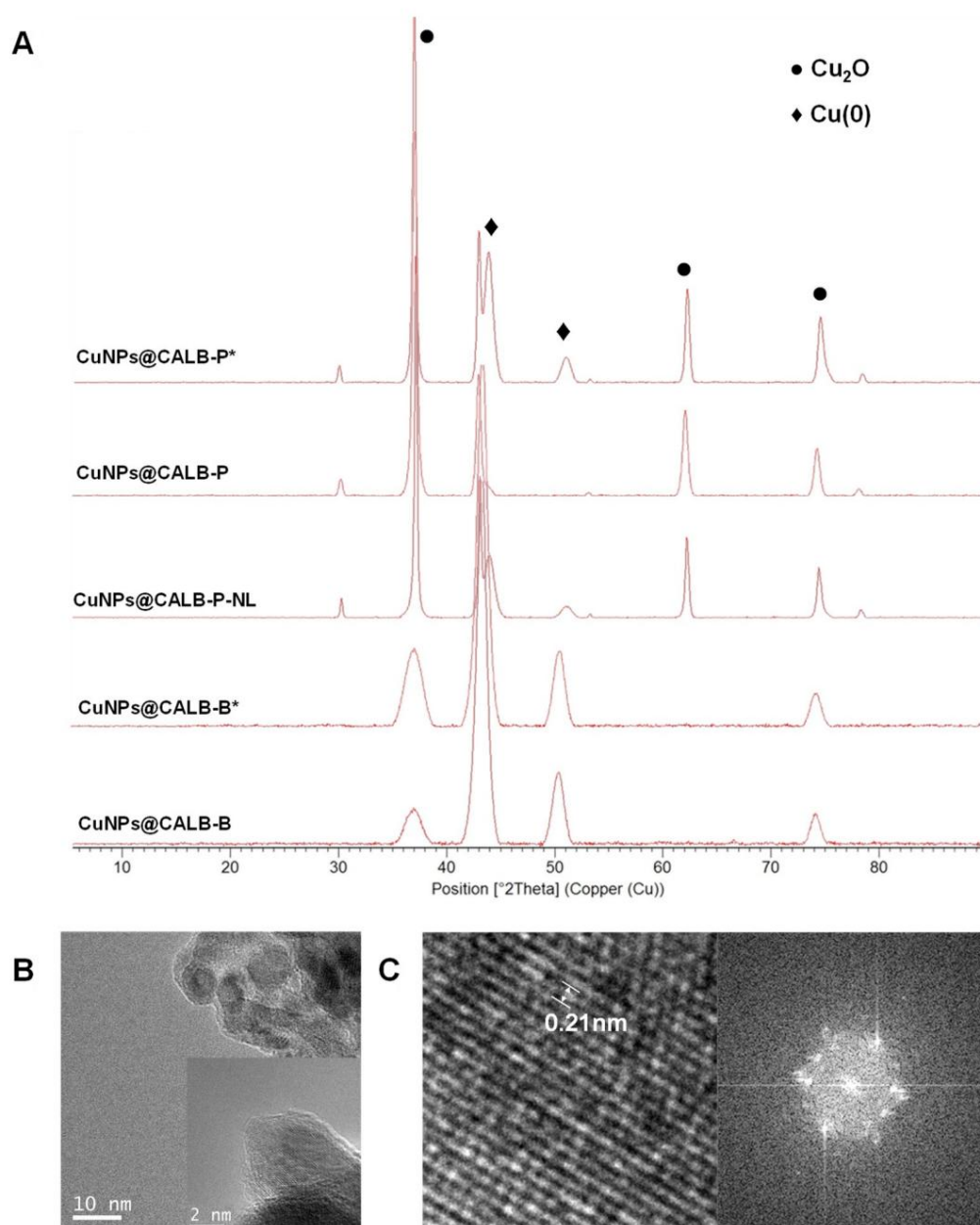


Рисунок 2 (А) Рентгеновский дифрактограмм гибридов CuNPs@CALB-P\* и CuNPs@CALB-P; (Б) изображение TEM и HRTEM (вставка) CuNPs@CALB-P; (С) ВПФ-анализ CuNPs@CALB-P.

Другой модификацией этого протокола является использование калий-фосфатного буфера. Это приводит к образованию CuNPs@CALB-P-NR. Анализ рентгенограммы, в данном случае на основе данных в работе [24], показывает, что структура идентична, тем же видом биригандов, а именно  $Mn_3(PO_4)_2 \cdot 2H_2O$  (рис. 3А) [24]. СЭМ-анализ CuNPs@CALB-P-NR показал аналогичные мезопористые структуры (рис. 3В,С). Это показывает, что шаг сокращения не имел никаких последствий (таблица S1).

Количество Cu в твердом веществе определяли с помощью ICP-OES-анализа. Процент содержания меди в различных гибридах CuNPs@CALB составляло от 45% до 93% (таблица S1).

Впоследствии использовали соль марганца (соль  $MnSO_4$ ) в натрий-фосфатном буфере. При этом получали  $MnNPs@CALB-P$  или  $MnNPs@CALB-P-NR$  соответственно. Рентгенограмма в обоих случаях показала одни и те же виды марганца, а именно  $Mn_3(PO_4)_2 \cdot 2H_2O$  (рис. 3А) [24]. СЭМ-анализ показал аналогичные мезопористые структуры (рис. 3В,С). Это показывает, что шаг сокращения не имел никаких последствий.



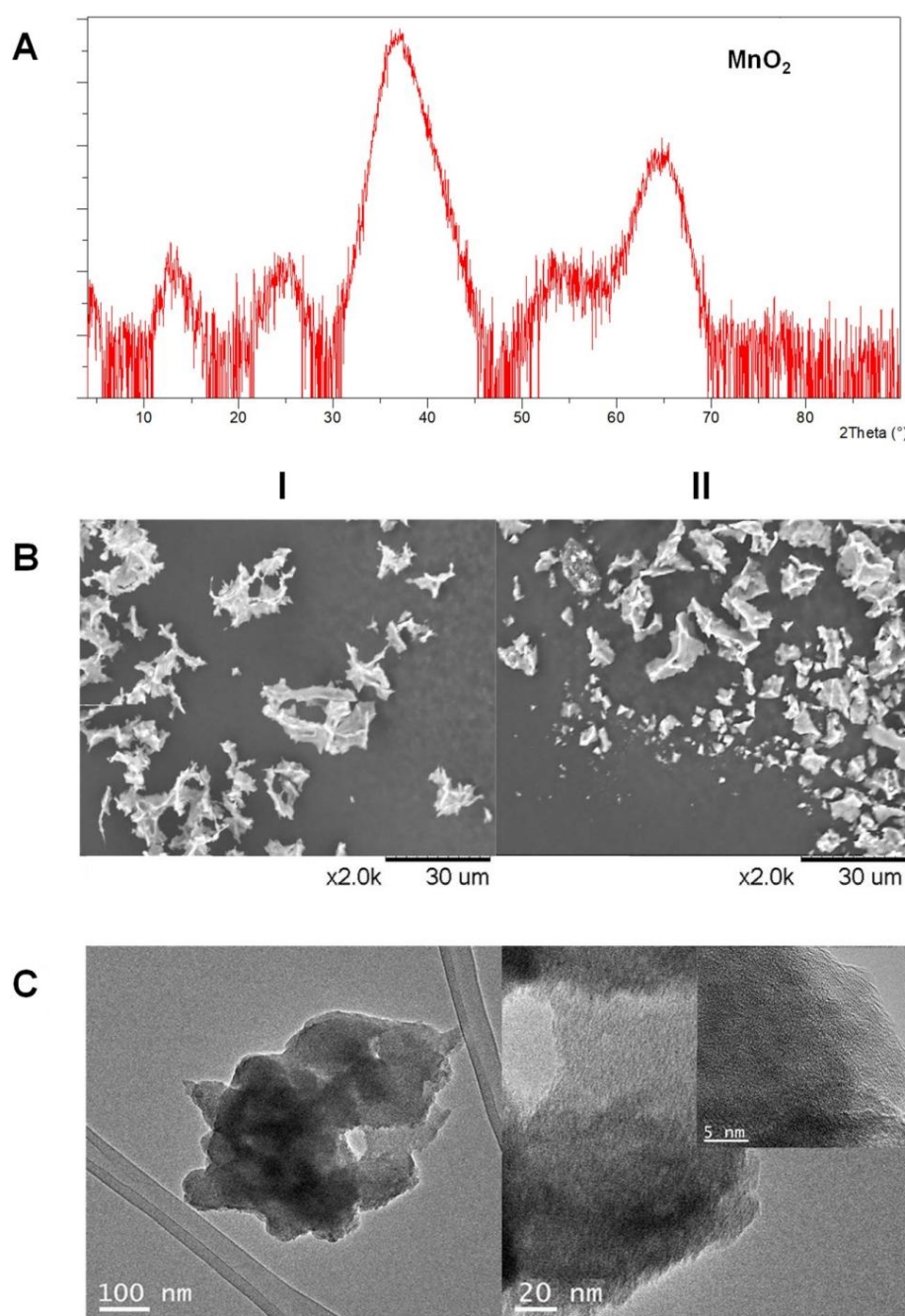


Рисунок 4. Характеристики гибридов  $\text{MnO}_2\text{@SABH-220}$  и  $\text{MnO}_2\text{@SABH-DMF}$ : (А) рентгеновский спектр; (В) СЭМ-изображения; (С) ПЭМ-изображения. (А) Рентгеновский спектр гибрида  $\text{MnO}_2\text{@SABH-220}$ ; (В) СЭМ-изображения гибрида  $\text{MnO}_2\text{@SABH-220}$ ; (С) ПЭМ-изображения гибрида  $\text{MnO}_2\text{@SABH-220}$ .

С другой стороны,  $\text{PdNPs@CATb}$  был синтезирован с использованием бычьей каталазы в качестве основы. Количество Mn в твердом веществе в каждом случае составляло около 25%, что определялось методом ICP-OES-анализ (таблица S1). Рентгеновский спектр подтвердил существование наночастиц хлорида палладия. (Рисунок 5B(I)) [26]. СЭМ-анализ продемонстрировал мезопористые структуры, а ПЭМ-изображения показали сферические наночастицы со средним диаметром 10 нм. Помимо смены металла, еще один вариант внедрения системы показал образование небольших сферических наночастиц со средним диаметром 10 нм. (Рисунок 5B(II, III) и S2). Количество Pd составило 27%, что определено методом ICP-OES-анализа. (Таблица S1).  $\text{PdCl}_4$  использовали для получения  $\text{AgNPs@CATb}$  и  $\text{PdNPs@CATb}$  соответственно тивно.

Для синтеза гибрида  $\text{AgNPs@CATb}$  образовались различные виды Ag, а именно  $\text{Ag}(0)$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}$  и  $\text{AgO}$ , как видно в спектре XRD (рис. 5(AI)). СЭМ анализ продемонстрировал агрегат с мезопористой аморфной сверхструктурой, а изображения ПЭМ показали наночастицы размером от 10 до 20 нм из-за образовавшихся разных видов (рис. 5 (AII, III) и S2). Количество Ag составило 34%, определено с помощью ICP-OES-анализ (таблица S1).

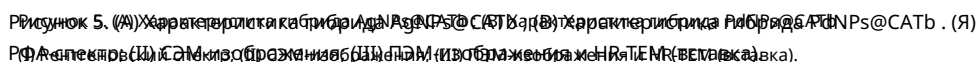


Рисунок 5. (А) Характеристика катионной AgNP-70@CATb и (В) характеристика AgNP-70@CATb@PdNPs@CATb. (Я) Рентгеновский дифрактограмм изображения AgNP-70 и (Б) дифрактограмм изображения PdNPs@CATb (вставка).

[illegible]

В случае катализатора, синтезированного при pH 10,0, можно наблюдать, что активность CuNPs@CALB-B\* в котором содержание окислительных частиц выше, было всего в два раза выше.

Время как CuNPs@CALB-B, содержащие преимущественно Cu(0), демонстрируют вдвое меньшую активность, чем CuNPs@CALB-B. Во-первых, гибриды Cu были оценены на предмет разложения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в дистиллированной воде (рис. 6А).

CuNPs@CALB-B\*. Полученные результаты наглядно показали, что разложение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в целом все медленнее катализаторы продемонстрировали катализную активность, при этом перекись водорода была более эффективной в отношении частиц Cu(I). CuNPs@CALB-P оказалась наиболее эффективным биокатализатором с удельной активностью 2,5 Ед/мг. С другой стороны, другие тесты проводились в буферных растворах с низким или высоким pH, было связано с наличием уникальной разновидности меди, а именно Cu<sub>2</sub>O. Сравнивая эту ионную силу (5 мм и 100 мм) в диапазоне pH от 6,0 до 8,0 (рис. 6В,С). В этих случаях,

В результате с остальными медными катализаторами CuNPs@CALB-P\* показал в 5,5 раз меньшую активность - наблюдалось общее снижение активности всех катализаторов, даже при очень низком буфере. В случае катализатора, синтезированного при pH 10,0, можно наблюдать увеличение активности. В частности, при низкой ионной силе, когда pH был выше, они представили

CuNPs @CALB-B\*, который имел большее присутствие окисленных частиц, имел лишь в два раза более высокую катализную активность, хотя в случае CuNPs@CALB-P при любом pH она представляла собой раз ниже, в то время как CuNPs@CALB-B, которые содержали в основном Cu(0), демонстрировали половину активности, активность как минимум в шесть раз ниже, чем в дистиллированной воде. Когда среда имела высокий ионный CuNPs @CALB-B\*. Полученные результаты наглядно продемонстрировали, что по силе разложения результаты были хуже для всех случаев.

пероксида водорода был более эффективен для частиц Cu(I).

Эти эффекты ингибирования фосфат-ионов при разложении перекиси водорода наночастицами меди можно объяснить, если принять во внимание некую связь фосфатная группа к меди, образуя промежуточные соединения и снижая реакционную способность катализатора. Действительно, это может быть подтверждено результатами, полученными при гибридном использовали медно-фосфатные соединения [23] . В этом случае каталазная активность этого Гибрид был более чем в 20 раз ниже в дистиллированной воде, чем гибриды Cu, присутствующие в этой воде. работа (данные не показаны).

Поэтому для условий наибольшей активности CuNPs@CALB-P (дистиллированная вода) оценивали каталазную активность того же гибрида, но без обработки лиофилизацией. (Рисунок 6D) (CuNPs@CALB-P-NL), где наблюдалось снижение активности в 5,5 раз, что демонстрирует эффект присутствия частиц Cu(0). Наконец, активность CuNPs@CALB-P сравнивали с активностью свободной каталазы (рис. 6D), где активность 90% могла наблюдаться.

После этого мы оценили гибриды MnNPs@CALB в лучших ранее изученных для меди условиях, то есть в дистиллированной воде (рис. 7). Катализаторы MnNPs@CALB-P и MnNPs@CALB-P-NR, которые содержат разновидности фосфата марганца, не обладали активностью.

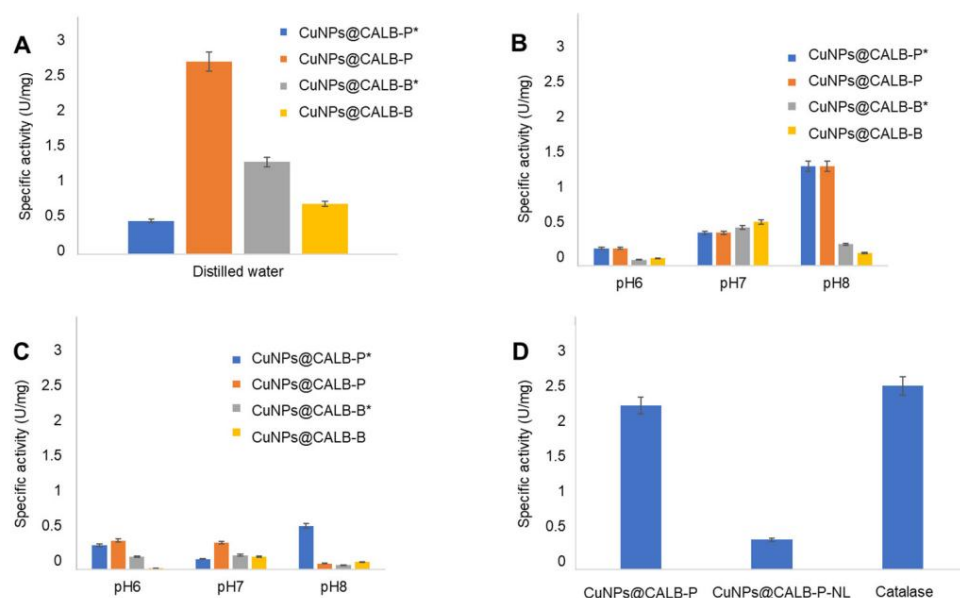


Рисунок 6. Каталазоподобная активность различных гибридов CuNPs@CALB. (А) дистиллированная вода; (Б) натрий фосфатный буфер 5 мМ; (С) натрий фосфатный буфер 100 мМ; (D) CuNPs@CALB-P в дистиллированной воде, сравнение с свободной каталазой CuNPs@CALB-P-NL.

С другой стороны, другие тесты проводились в буферных растворах с низкой или высокой ионной силой (5 мМ и 100 мМ) в диапазоне pH от 6,0 до 8,0 (рис. 6B,C). В этих случаях наблюдалось общее снижение активности всех катализаторов даже при очень низких количествах буфера. В частности, при низкой ионной силе и более высоком pH они проявляли более высокую каталазную активность, хотя в случае CuNPs@CALB-P при любом pH она проявляла активность как минимум в шесть раз ниже, чем в дистиллированной воде. Когда среда имела высокую ионную силу, результаты были хуже во всех случаях.

Этот эффект ингибирования фосфат-ионов при разложении перекиси водорода наночастицами меди можно объяснить, учитывая своего рода связывание фосфатной группы с медью, приводящее к образованию промежуточных частиц и снижению реакционной способности катализатора. Действительно, это может быть подтверждено результатами, полученными при использовании гибрида, содержащего частицы фосфата меди [23]. При этом каталазная активность этого гибрида в дистиллированной воде была более чем в 20 раз ниже, чем у гибридов Cu, представленных в данной работе (данные не приведены).

Поэтому для условий наибольшей активности в CuNPs@CALB-P (дистиллированная вода) оценивали каталазную активность того же гибрида, но без обработки лиофилизацией (рис. 6D) (CuNPs@CALB-P-NL), где наблюдалось снижение активности в 5,5 раз, что свидетельствует о влиянии присутствия частиц Cu(0). Наконец, активность CuNPs@CALB-P сравнили с активностью свободной каталазы (рис. 6D), где Рисунок 7. Каталазоподобная активность гибридов MnNPs@CALB в дистиллированной воде.

можно было наблюдать активность 90%. Рисунок 7. Каталазоподобная активность гибридов MnNPs@CALB в дистиллированной воде. После этого мы оценили гибриды MnNPs@CALB в различных буферных средах. С другой стороны, когда эти наночастицы представляли собой наноструктуры MnO<sub>2</sub>, Mn- и MnNPs@CALB-P-NR, сравнение, эти катализаторы были оценены в двух реактивных средах, таких как 5 мМ трис-основание. MnO<sub>2</sub> в буфере трис (рис. 5A) с высокой ионной силой, в 2,2 раза выше, чем у буфера MnNPs@C с pH 9 и 5 мМ трис-основание, и в 4,5 раза выше, чем в случае MnNPs@CALB-DMF. В этих случаях чистая вода, такая как вода MES-буфера, была в 45 раз ниже для MnNPs@CALB-H<sub>2</sub>O и буфера с более высокой ионной силой, как и в случае MnNPs@CALB-DMF, в 4,5 раза ниже. В случае MnNPs@CALB-DMF, для сравнения, активность обоих катализаторов для MnNPs@CALB-H<sub>2</sub>O была в 45 раз ниже, чем у буфера MES. В случае буфера с более высоким pH, чем у природной каталазы при комнатной температуре в дистиллированной воде (рис. 7). MnNPs@CALB-DMF продемонстрировал аналогичную активность, а для MnNPs@CALB – половину (рис. 5A).

Наконец, биогибрид MnNPs@CALB-H<sub>2</sub>O трижды проявлял активность.

таковая для природной каталазы при комнатной температуре в дистиллированной воде Figure 7.

Наконец, два биогрида драгоценных металлов (Ag и Pd) были синтезированы с использованием бычьей каталазы в качестве каркаса (AgNPs@CATb и PdNPs@CATb) для оценки потенциального синергетического эффекта между каталазой и наночастицами металлов. Однако удельная активность обоих катализаторов была очень низкой (более чем в 100 раз ниже, чем у гибрида Mn) (данные не приведены).

Это может быть связано с типом образующихся в каждом случае частиц металлов: PdCl<sub>2</sub> для гибрида Pd и смесью различных оксидов серебра для гибрида Ag.

В литературе существуют разные методики деградации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> как миметика активности каталазы. Некоторые из них используют комплексы благородных металлов, в ряде случаев нанесённые или трубчатые структуры, где необходимо синтезировать системы в агрессивных и токсичных условиях [27–30]. Таким образом, предложенная в нашей работе методология имеет преимущество в плане простоты и устойчивости при создании искусственных металлоферментов, способных разлагать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в водной среде при комнатной температуре.

#### 4. Выводы

В заключение, в этом исследовании мы представили простую, но универсальную стратегию получения искусственных металлоферментов с различной каталазоподобной активностью (MeNPs@Enzyme), основанную на применении фермента, который индуцирует образование *in situ* металлических наночастиц на белке. сеть.

Синтезированы различные бионаногриды разных металлов (Cu, Mn, Pd, Ag) и оценена их способность разлагать перекись водорода при комнатной температуре в водных средах. MnNPs@CALB-H<sub>2</sub>O, образованный наноструктурами MnO<sub>2</sub>, продемонстрировал превосходную миметическую активность, даже в три раза превышающую активность природной каталазы.

Таким образом, эти результаты открывают потенциальное применение этих новых бионаногридов. в сочетании с другими ферментативными системами для биологических и биомедицинских процессов.

Дополнительные материалы. Следующую вспомогательную информацию можно загрузить по адресу: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applnano3030011/s1>, Рисунок S1. (I) изображения ПЭМ; (II) Изображения HR-TEM. (A) CuNPs@CALB-P\*; (B) CuNPs@CALB-P-NL; (C) CuNPs@CALB-B\*; (D) CuNPs@CALB- B. Рисунок S2. Характеристика AgNPs@CATb: (A) СЭМ-изображения; (B) ПЭМ-изображение; Рисунок S3. Характеристика PdNPs@CATb: (A) СЭМ-изображения; (B) ПЭМ-изображение; Рисунок S4. Каталазоподобная активность гибридов MnNPs@CALB в 5 mM TRIS BASE pH 9 (синий) и 5 mM MES pH 5 (оранжевый).

Таблица S1. Синтез гибридов MeNPs@Enzyme.

Вклад авторов: НЛ-Г., AP-О., КО-Н. и А.А. провели эксперименты; JMP разработал и контролировал исследование и эксперименты; и JMP и NL-G. написал рукопись. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Эта работа была поддержана правительством Испании: Испанским национальным исследовательским советом (CSIC) (PTI-Health CSIC SGL2103036).

Заявление о доступности данных: Не применимо.

Благодарности: Авторы благодарят Рамиро Мартинеса из Novozymes.

Конфликты интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Рекомендации

1. Ву, З.; Лю, М.; Лю, З.; Тиан, Ю. Визуализация в реальном времени и одновременная количественная оценка митохондриального H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и АТФ в нейронах с помощью одного двухфотонного зонда, основанного на флуоресценции и времени жизни. *Варенье. хим. Соц.* 2020, 142, 7532–7541. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
2. Песня, Х.; Бай, С.; Курица, Ван, Р.; Син, Ю.; Льв, Ц.; Ю, Ф. Оценка повреждений перекисью водорода в режиме реального времени на моделях мышей с легочным фиброзом с помощью митохондриально-ориентированного флуоресцентного зонда ближнего инфракрасного диапазона. *ACS, сен.* 2021 г., 6, 1228–1239. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
3. Филип, К.; Альбу, Э. (ред.) Активные формы кислорода (АФК) в живых клетках; IntechOpen: Лондон, Великобритания, 2018 г.
4. Бай, З.; Ли, Г.; Лян, Дж.; Су, Дж.; Чжан, Ю.; Чен, Х.; Хуанг, Ю.; Суй, В.; Чжао, Ю. Неферментативный электрохимический биосенсор на основе наногридов PtNP/RGO-CS-Fc для обнаружения перекиси водорода в живых клетках. *Биосенс. Биоэлектрон.* 2016, 82, 185–194. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
5. Рашид, RT; Мансур, HS; Абдулла, Т.А.; Южакова Т.; Аль-Джаммал, Н.; Салман, AD; Аль-Шейхли, PP; Ле, ПК; Домокос, Э.; Абдулла Т.А. Синтез, характеристика наночастиц V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и определение активности миметика каталазы новым колориметрическим методом. *Дж. Терм. Анальный. Калорим.* 2021, 145, 297–307. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

6. Нанди А.; Ян, ЖЖ; Яна, СК; Дас, Н. Роль каталазы в окислительном стрессе и возрастных дегенеративных заболеваниях. Оксид. Мед. Клетка. Лонгев. 2019, 13, 123–132. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
7. Али, Ф.; Мансур, Ю.; Хан, Финляндия; Проложенный.; Хан, МКА; Чандрашекхараия, Канзас; Сингх, ЛР; Дар, Т.А. Влияние осмолитов полиолов на структурно-функциональную целостность и склонность к агрегации каталазы: комплексное исследование, основанное на измерениях спектроскопического и молекулярно-динамического моделирования. Межд. Ж. Биол. Макромол. 2022, 209, 198–210. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
8. Нантапонг, Н.; Мурата, Р.; Тракулналеамсай, С.; Катаока, Н.; Якуши, Т.; Мацусита, К. Влияние активных форм кислорода (АФК) и ферментов, поглощающих АФК, супероксиддисмутазы и каталазы, на термотолерантную способность *Corynebacterium glutamicum*. Прил. Микробиол. Биотехнология. 2019, 103, 5355–5366. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
9. Фернандес-Лафуэнте, Р. Стабилизация мультимерных ферментов: стратегии предотвращения диссоциации субъединиц. Ферментный микроб. Технол. 2009, 45, 405–418. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
10. Хромик-Яхефендик, А. Тестирование температурной и рН-стабильности фермента каталазы в присутствии ингибиторов. Период. англ. Нат. наук. 2022, 10, 18–29. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
11. Кормод, Д. П.; Гао, Л.; Ку, Х. Новые биомедицинские применения ферментоподобных каталитических наноматериалов. Тенденции Биотехнологии. 2018, 36, 15–29. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
12. Цзяо, М.; Ли, З.; Ли, Х.; Чжан, З.; Юань, К.; Врисекуп, Ф.; Лян, Х.; Лю, Дж. Решение проблемы побочных продуктов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с использованием нанозимного каскада, имитирующего каталазу, для усиления оксидазы гликолевой кислоты. хим. англ. J. 2020, 388, 124249. [\[CrossRef\]](#)
13. Чжан Х.; Ян, К.Л. Формирование и иммобилизация наночастиц золота на полидиметилсилоксане (ПДМС) in situ, демонстрирующие каталазо-миметическая активность. хим. Коммун. 2020, 56, 6416–6419. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
14. Чжан Дж.; Лу, Х.; Тан, Д.; Ву, С.; Хоу, Х.; Лю, Дж.; Ву, П. Фосфоресцентные углеродные точки для высокоэффективной фотосенсибилизации кислорода и в качестве фотоокислительных нанозимов. Приложение ACS. Матер. Интерфейсы 2018, 10, 40808–40814. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
15. Чен, Х.; Зайбер, Дж. Н.; Хотце, М. Выбор ACS по нанотехнологиям в области продовольствия и сельского хозяйства: взгляд на последствия и Приложения. Дж. Агрик. Пищевая хим. 2014, 62, 1209–1212. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
16. Чен, В.; Чен, Дж.; Фэн, Ю.Б.; Хонг, Л.; Чен, QY; Ву, Л.Ф.; Лин, Х.-Х.; Ся, Х.-Х. Пероксидазоподобная активность водорастворимых наночастиц оксида меди и ее аналитическое применение для обнаружения перекиси водорода и глюкозы. Аналитик 2012, 137, 1706–1712. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
17. Лу, Л.; Ван, Х.; Сюн, К.; Яо, Л. Последние достижения в области биологического обнаружения с использованием магнитных наночастиц в качестве полезного инструмента. наук. Китайская хим. 2015, 58, 793–809. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
18. Ван, К.; Вэй, Х.; Чжан, З.; Ван, Э.; Донг, С. Нанозим: новая альтернатива природным ферментам для биосенсорства и иммуноанализа. Тренд Аналитик. хим. 2018, 105, 218–224.
19. Ву, Джей-Джей; Ван, ХУ; Ван, К.; Лу, ЗП; Ли, СР; Чжу, ГГ; Цинь, Л.; Вэй, Х. Наноматериалы с ферментоподобными характеристиками (нанозимы): искусственные ферменты нового поколения (II). хим. Соц. Ред. 2019, 48, 1004–1076. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
20. Лосада-Гарсия, Н.; Хименес-Алесанко, А.; Веласкес-Кампой, А.; Абиан, О.; Паломо, Дж. М. Гибридные нанозимы фермента и наномеди: Модулирование ферментоподобной активности с помощью белковой структуры для биосенсорной и каталитической терапии опухолей. Приложение ACS. Матер. Интерфейсы 2021, 13, 5111–5124. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
21. Паломо, Дж. М. Нанобиогрибры: новая концепция синтеза металлических наночастиц. хим. Коммун. 2019, 55, 9583–9589. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
22. Филиче, М.; Лосада-Гарсия, Н.; Перес-Рискес, К.; Марчелло, М.; Моралес, MDP; Паломо, Дж. М. Биогрибры наночастиц палладия в прикладной химии. Прил. Нано 2020, 2, 1–13. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
23. Лосада-Гарсия, Н.; Родригес-Отеро, А.; Паломо, Дж. М. Индивидуальный синтез гетерогенных нанобиогрибров фермента и меди и их применение в селективном окислении бензола до фенола. Катал. наук. Технол. 2020, 10, 196–206. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
24. Муниемана, Д.К.; Он, Х.; Дин, С.; Инь, Дж.; Си, П.; Сяо, Дж. Синтез гибридных наночастиц фосфата марганца путем биоминерализации на основе коллагена. РСК Адв. 2018, 8, 2708–2713. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
25. Ли, Ю.; Сяо, Л.; Лю, Ф.; Доу, Ю.; Лю, С.; Фан, Ю.; Ченг, Г.; Сонг, В.; Чжоу, Дж. Поддержка структуры ядро-оболочка наночастиц Ag@Pd на слоистой подложке MnO<sub>2</sub> в качестве катализатора окисления толуола. Дж. Нанопарт. Рез. 2019, 21, 28. [\[CrossRef\]](#)
26. Манепалли, РКНР; Мадхав, БТП; Гиридхар, Г.; Шринивасулу, М.; Теджасви, М.; Сиварам, К.; Джаяпрада, П.; Писипати, ВГКМ Характеристика и мезоморфное поведение жидких кристаллов с дисперсными наночастицами PdCl<sub>2</sub>. Лик. Крист. Сегодня 2017, 26, 32–38. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
27. Чайбахш, Н.; Моради-Шойли, З. Ферментативно-миметическая активность шпинельзамещенных наноферритов (MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>): обзор синтеза, Механизм и возможные применения. Матер. наук. англ. С 2019, 99, 1424–1447. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
28. Марр, К.М.; Чен, Б.; Моотц, Э.Дж.; Гедер, Дж.; Приусснер, М.; Мельде, Би Джей; Ванфлит, РР; Мендинц, Иллинойс; Айверсон, Б.Д.; Клауссен, Дж. К. Мембраны из углеродных нанотрубок с высоким соотношением сторон, украшенные ежами из наночастиц Pt, для приведения в движение микроподводных аппаратов за счет разложения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. АСУ Нано 2015, 9, 7791–7803. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
29. Чжан Х.; Дэн, Х.; Цзяо, К.; Лу, Л.; Чжан С. Получение и каталитическая активность при разложении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> биметаллических наночастиц Rh/Au. Матер. Рез. Бык. 2016, 79, 29–35. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
30. Есмурзаева, Н.Н.; Нурахметова З.А.; Татыханова, Г.С.; Селенова, Б.С.; Кудайбергенов С.Е. Каталитическая активность золота и наночастицы серебра, нанесенные на оксид цинка. Супрамол. Катал. 2015, 2, 1–8. [\[Перекрестная ссылка\]](#)