



На правах рукописи

**Сульман Александрина Михайловна**

**Гетерогенные биокатализаторы на основе  
глюкозооксидазы, иммобилизованной на  
магнитоотделяемые мезопористые оксиды**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**на соискание ученой степени**  
**кандидата химических наук**

Москва 2020

Работа выполнена на кафедре биотехнологии, химии и стандартизации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Тверской государственной технической университет"

Научный руководитель: Матвеева Валентина Геннадьевна  
доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической университет»

Официальные оппоненты: Понаморева Ольга Николаевна  
доктор химических наук, заведующая кафедрой биотехнологии естественнонаучного института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет»

Шнайдер Ксения Леонидовна  
кандидат химических наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ивановский государственный химико-технологический университет"

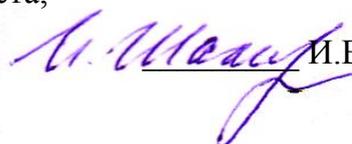
Защита состоится 30 марта 2021 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева по адресу: г. Москва, Миусская пл., д. 9, ауд. 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат технических наук, доцент

 И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Имобилизованные ферменты широко применяются в синтезе различных сложных лекарственных средств и их промежуточных соединений в мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов. Они используются в рекультивации загрязненной воды, воздуха и почвы путем эффективного удаления стойких органических загрязнителей, в диагностике заболеваний и в коррекции различных генетических синдромов, возникающих из-за отсутствия метаболических ферментов. Имобилизованным ферментом, используемым в промышленных масштабах, является глюкозооксидаза (GOx, К.Ф. 1.1.3.4, семейство оксигеназ, подкласс оксидоредуктаз). GOx используется в биосенсорах глюкозы для измерений в реальном времени и *in-situ* в пищевой промышленности и медицине. Создание носителей для иммобилизации GOx позволяет разрабатывать биосенсоры глюкозы с улучшенной прочностью, чувствительностью, расширенными диапазонами и пределами обнаружения. Другим важным применением иммобилизованной GOx является использование ее в качестве биокатализатора для получения D-глюконовой кислоты, которая сама и ее соли используются в качестве лекарственных средств, витаминов и пищевых добавок. Химические, биохимические, механические и кинетические свойства иммобилизованных ферментов в значительной степени определяются физико-химическими свойствами носителей, используемых для иммобилизации ферментов, что делает их управляющими факторами в синтезе биокатализаторов. Тип носителя играет ключевую роль в свойствах иммобилизованных ферментов. Поверхность носителя должна иметь хорошую геометрическую комплементарность к форме фермента и достаточную поверхностную плотность функциональных групп. Вспомогательные функциональные группы для иммобилизации ферментов должны быть активными, стабильными и создавать минимальные стерические затруднения во время каталитической реакции. Для пористых носителей высокая площадь поверхности критически влияет на способность связывать ферменты, при малых размерах пор диффузионные ограничения могут отрицательно сказаться на активности катализатора. Таким образом, размеры пор должны контролироваться для оптимизации иммобилизации фермента и последующего доступа к нему субстрата. Большое значение для иммобилизации ферментов имеет синтез магнитоотделяемых носителей, которые обеспечивают легкую магнитную сепарацию биокатализатора от реакционного раствора, экономию энергии, а также получение более дешевых и чистых целевых продуктов.

**Цель и задачи работы.** Целью работы является обоснование и проведение синтеза магнитоотделяемых мезопористых оксидов для иммобилизации глюкозооксидазы с последующей экспериментальной оценкой влияния природы носителя на активность фермента.

Для достижения данной цели были решены следующие задачи:

- теоретическое обоснование методов иммобилизации глюкозооксидазы на неорганические носители;
- подбор условий синтеза мезопористого оксида циркония;
- подбор условий *in-situ* кристаллизации наночастиц  $Fe_3O_4$  в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония;
- выбор оптимальных условий введения модифицирующих и сшивающих агентов для иммобилизации глюкозооксидазы;

- синтез биокатализаторов путем иммобилизации глюкозооксидазы на исходные и магнитоотделяемые оксиды;
- определение структурных, поверхностных, магнитных и других физико-химических характеристик синтезированных носителей и биокатализаторов на их основе;
- изучение зависимости активности синтезированных биокатализаторов от температуры, рН и количества субстрата;
- проведение экспериментального скрининга активности и стабильности синтезированных биокатализаторов в окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты;
- расчет кинетических параметров процесса ферментативного окисления D-глюкозы;
- выявление корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их активности в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

**Научная новизна работы.** Синтезирован мезопористый оксид циркония методом реплики, и впервые в качестве жесткого шаблона использовался мезопористый оксид кремния с размером пор  $\approx 6$  нм. Подобраны оптимальные условия *in-situ* кристаллизации наночастиц  $Fe_3O_4$  в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония и синтезированы магнитоотделяемые носители. Впервые осуществлена иммобилизация глюкозооксидазы на синтезированные магнитоотделяемые мезопористые оксиды. Впервые проведено детальное изучение структуры исходных и магнитоотделяемых мезопористых оксидов кремния, алюминия, циркония и биокатализаторов на их основе с использованием современных физико-химических методов. Проведено тестирование синтезированных биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы и показана их высокая активность в широком (для ферментов) диапазоне рН и температуры. Для магнитоотделяемых оксидов кремния, алюминия, циркония впервые изучено влияние кислотных центров Льюиса и Бренстеда на активность фермента. Выявлены корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их активности в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

**Практическая значимость работы.** Разработка гетерогенных биокатализаторов на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемые мезопористые оксиды, имеет большое практическое значение, прежде всего для процесса окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в промышленных масштабах. D-глюконовая кислота является пищевой добавкой как разрыхлитель и регулятор кислотности пищевых продуктов. В фарминдустрии D-глюконовая кислота используется для синтеза витаминов и лекарственных средств. Исключительная возможность повторного использования биокатализаторов после легкой магнитной сепарации в сочетании с высокой активностью в широком диапазоне рН и температуры делает эти катализаторы перспективными для практического применения. Предложенные в работе подходы к синтезу магнитоотделяемых мезопористых оксидов и их детальное изучение могут быть использованы при создании других промышленно значимых биокатализаторов.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты работы представлены на конференциях: 8-ая Международная научно-практическая конференция "Биотехнология: наука и практика" (2020), IV Всероссийская научно-практическая конференция "Саморазвивающаяся среда технического вуза: научные

исследования и экспериментальные разработки" (2019), 5-й Международный конгресс по катализу для биоперерабатывающих заводов (2019), 19-ая Международная научная геоконференция (SGEM 2019), IX Международная конференция, посвященная 150-летию Российского химического общества имени Д.И. Менделеева (2019), 23-ий Международный конгресс химиков и технологов (CHISA 2018), 21-ая Конференция по интеграции процессов, моделированию и оптимизации для энергосбережения и сокращения загрязнений (PRES 2018), 18-ая Международная научная геоконференция (SGEM 2018), VIII Международная конференция Российского химического общества имени Д.И. Менделеева (2017).

**Личный вклад автора.** Выполнена постановка цели и соответствующих задач исследования, сделан аналитический обзор литературы. Автором были подобраны условия *in-situ* кристаллизации наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония. Автором были выбраны оптимальные условия введения модифицирующих и сшивающих агентов и получены биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на исходные и магнитоотделяемые оксиды кремния, алюминия и циркония. Проведен экспериментальный скрининг активности и стабильности синтезированных биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Автором обсуждены физико-химические характеристики синтезированных носителей и биокатализаторов на их основе для определения структурных, поверхностных, магнитных и других свойств.

**Публикации по теме диссертации.** По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ в изданиях, входящих международные реферативные базы данных Web of Science и Scopus, в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ и прочих изданиях, а также подготовлена заявка на патент Российской Федерации №2020119280.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Текст изложен на 144 страницах, включает 60 рисунков и 15 таблиц. Список литературы содержит 234 наименования.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, изложены цель, научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

**В первой главе** проанализированы типы неорганических носителей для иммобилизации ферментов и показаны преимущества использования мезопористых и магнитных материалов. Дана характеристика глюкозооксидазы и представлены способы ее иммобилизации на различные носители. Ферментативное окисление D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии иммобилизованной глюкозооксидазы имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами: реакция протекает с высокой селективностью в мягких условиях и не является энергоемкой. Анализ литературы показал, что для иммобилизации глюкозооксидазы ранее не использовались мезопористые оксиды, поры которых содержат наночастицы магнетита. Именно такие материалы способны создать благоприятные условия для конформации молекулы фермента и обеспечить легкое магнитное отделение биокатализатора от реакционной среды.

**Во второй главе** изложены материальная часть, объекты и методы исследования. Представлены методики синтеза оксида циркония и магнитных наночастиц в мезопорах оксидах кремния, алюминия и циркония. Приведена методика получения биокатализаторов путем иммобилизации глюкозооксидазы на неорганические мезопористые носители, в том числе магнитоотделяемые. Описана методика и оборудование окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты молекулярным кислородом в присутствии биокатализаторов. Описаны физико-химические методы анализа биокатализаторов: метод низкотемпературной адсорбции азота, рентгенофотоэлектронная спектроскопия (РФЭС), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), метод вибрационного магнитометра, ИК-Фурье спектроскопия, рентгеновская дифракция, сканирующая энергодисперсионная спектроскопия (СПЭМ ЭДС).

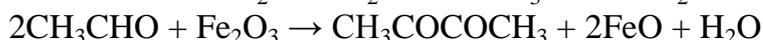
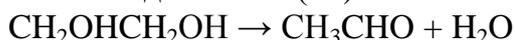
**В третьей главе** представлены анализ и трактовка полученных результатов синтеза, физико-химического анализа магнитоотделяемых мезопористых оксидов, биокатализаторов на основе иммобилизованной GOx и по окислению D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

Магнитоотделяемые носители получали *in-situ* кристаллизацией наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (магнетита) в мезопорах исходного оксида кремния, алюминия и циркония, осуществляя последовательные химические превращения:

- разложение нитрата железа (III)



- частичное восстановление оксида железа (III) этиленгликолем



Для синтеза магнитоотделяемых носителей Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> использовались коммерческие мезопористые SiO<sub>2</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с порами ≈6 нм, в которых формировались магнитные наночастицы (МНЧ). Для синтеза исходного мезопористого ZrO<sub>2</sub> использовался метод реплики, где в качестве жесткого шаблона применялся мезопористый SiO<sub>2</sub>, который импрегнировали кристаллогидратом ZrOCl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, прокаливали при температурах 300 °С, 400 °С и 600 °С и затем выщелачивали. МНЧ были сформированы в порах ZrO<sub>2</sub> с использованием процедур, аналогичных для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Таким образом, были получены образцы исходных оксидов циркония ZrO<sub>2</sub>-300, ZrO<sub>2</sub>-400 и ZrO<sub>2</sub>-600 и магнитоотделяемые носители наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600, соответственно.

По результатам низкотемпературной адсорбции азота на исходных оксидах и носителях МНЧ построены изотермы адсорбции-десорбции (представлены на рис. 1 на примере образцов ZrO<sub>2</sub>-600 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600), которые относятся к IV-ому типу (по классификации IUPAC), характерному для мезопористых материалов. Используя полученные экспериментальные данные, были рассчитаны величины удельной поверхности (таблица 1) и определены параметры пористости. Удельная поверхность исходных оксидов уменьшается при формировании МНЧ для пары ZrO<sub>2</sub>-600/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 незначительно (на 5%), а для пары SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> – в максимальной степени (на 34%). Распределение пор по размерам для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> показывает широкий максимум при 6 нм, который близок к максимуму исходного оксида кремния. Эти данные показывают, что МНЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> располагаются в стыках пор, блокируя при этом только маленькие поры. В случае Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

распределение пор по размерам с максимумом при 4,5 нм также практически не изменяется после образования наночастиц магнетита в порах оксида алюминия.

Таблица 1 – Удельная поверхность исходных оксидов и носителей МНЧ

Носитель	SiO <sub>2</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ZrO <sub>2</sub> - 300	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - ZrO <sub>2</sub> - 300	ZrO <sub>2</sub> - 400	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - ZrO <sub>2</sub> - 400	ZrO <sub>2</sub> - 600	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - ZrO <sub>2</sub> -600
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	458	304	133	106	202	172	150	124	121	115

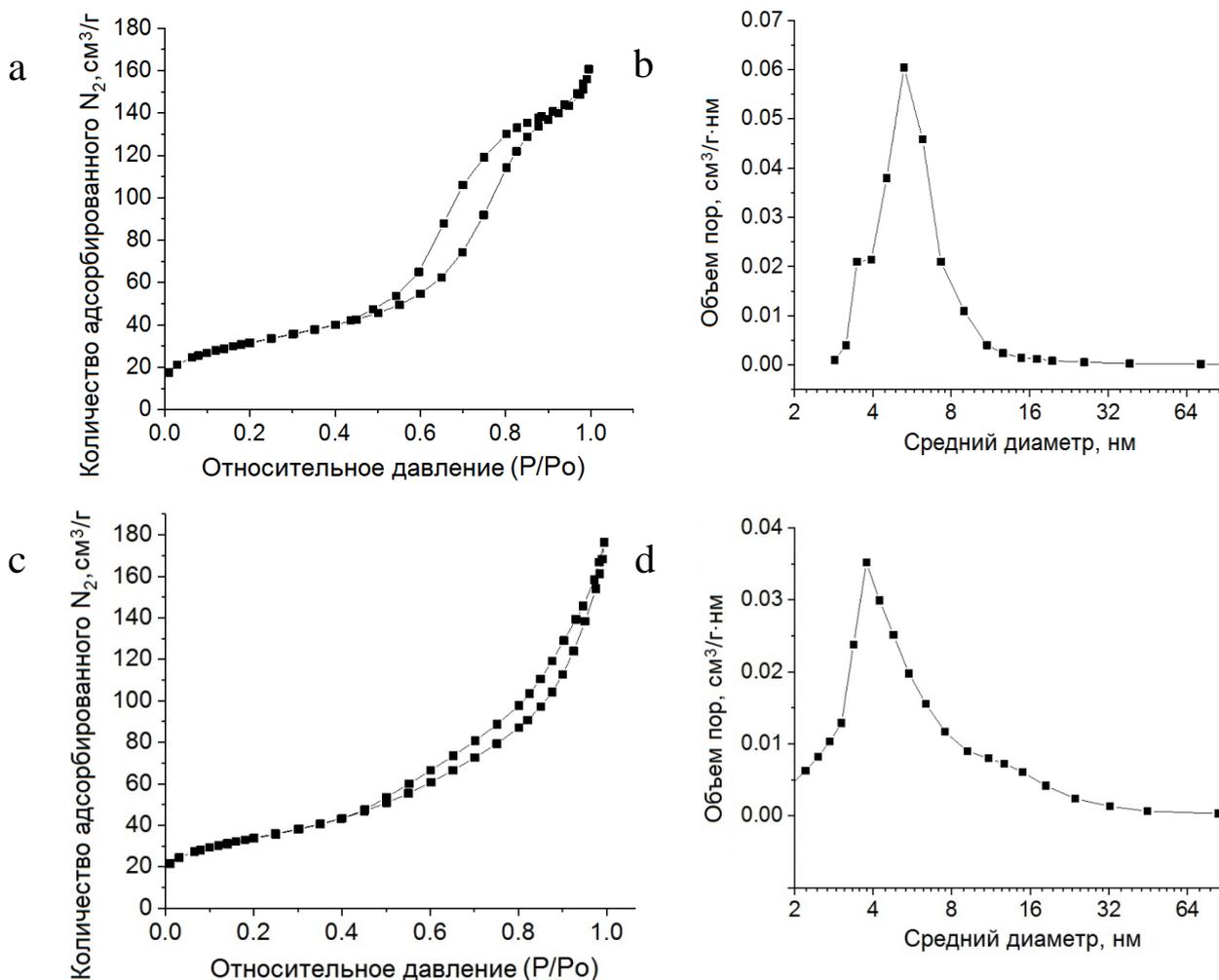


Рисунок 1 – Изотермы адсорбции-десорбции N<sub>2</sub> и распределение пор по размерам для ZrO<sub>2</sub>-600 (a, b) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (c, d)

Установлено, что объем пор носителей МНЧ на основе оксида циркония уменьшается с ростом температуры прокаливания, что может быть связано с изменением кристаллической структуры ZrO<sub>2</sub>, подтвержденным данными рентгеновской дифракции (см. ниже). Для всех носителей пористость и диаметр пор (пример для пары ZrO<sub>2</sub>-600/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 представлен на рис. 1) уменьшаются после включения МНЧ. Примечательно, что диаметры пор исследуемых мезопористых оксидов ниже гидродинамического диаметра GOx (7,6

нм). Вероятно, это приводит к тому, что макромолекулы GOx располагаются не в порах, а на поверхности носителя, что обеспечивает большую подвижность молекулы фермента.

Для точного установления размера и структуры МНЧ использовали ПЭМ и рентгеновскую дифракцию – на рисунке 2 представлены результаты для образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ .

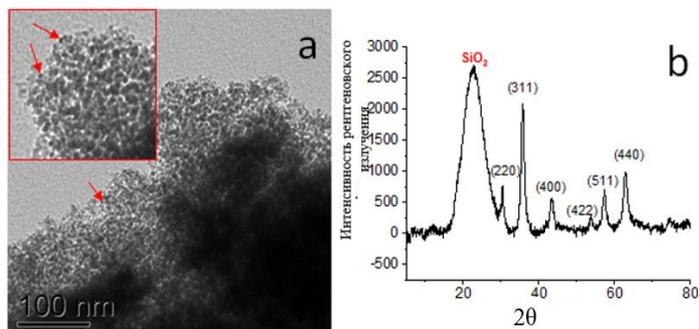


Рисунок 2 – ПЭМ-изображение (а) и рентгенограмма (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ . На вставке в (а) показано изображение с большим увеличением. Красные стрелки указывают на оксиды железа

Изображение ПЭМ четко отображает присутствие МНЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в порах диоксида кремния (образец  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ), однако низкий электронный контраст между оксидом железа и диоксидом кремния не позволяет точно провести измерение размера МНЧ. Для определения кристаллического строения МНЧ были использованы данные рентгеновской дифракции. Рентгенограмма показывает широкий пик около 22, который относится к аморфному оксиду кремния. Кроме того, наблюдается ряд более острых брэгговских пиков, интенсивность и положение которых типичны для шпинели (магнетит,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Средний размер кристаллитов, рассчитанный по уравнению Шеррера для отражения (311), составляет 12,7 нм. Следует отметить, что по данным ПЭМ наночастицы оксида железа находятся в порах диоксида кремния с размерами 4-8 нм (рис. 2а). Таким образом, данные рентгеновской дифракции и ПЭМ свидетельствуют о том, что несколько наночастиц объединяются друг с другом внутри поры за счет ориентированного присоединения (oriented attachment manner), образуя единичные кристаллы большего размера. Аналогичные результаты были получены и для образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Размер кристаллитов оксида железа в порах оксида алюминия, рассчитанных с использованием уравнения Шеррера для пика (511) без перекрытия, составляет 15,6 нм. Опять же, как и в случае  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ , нанокристаллы магнетита намного больше, чем размер пор (~ 4,5 нм), что указывает на ориентированное присоединение наночастиц магнетита внутри поры с образованием более крупных монокристаллов.

На рисунке 3 показаны репрезентативные изображения ПЭМ  $\text{ZrO}_2\text{-600}$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$ . Некоторые МНЧ обозначены красными стрелками на вставке к рисунку 3.

Чтобы оценить распределение наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в  $\text{ZrO}_2$ , было проведено картирование для  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$  с использованием сканирующей ПЭМ энергодисперсионной спектроскопии. На рисунке 4 показано, что карты Fe, Zr и O похожи по форме на изображение темного поля фрагмента  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$ , что

свидетельствует о равномерном распределении МНЧ в  $ZrO_2$ . Суперпозиция карт Fe / Zr и Zr / Fe / O подтверждает этот вывод.

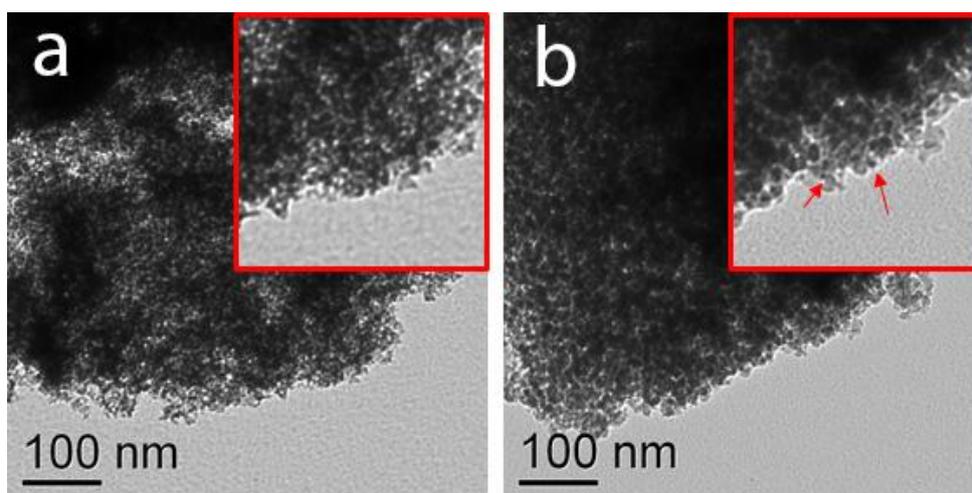


Рисунок 3 – Изображения ПЭМ  $ZrO_2$ -600 (а) и  $Fe_3O_4$ - $ZrO_2$ -600 (б)

Для определения кристаллического строения исходных оксидов циркония и наночастиц магнетита были использованы данные рентгеновской дифракции. Установлено, что в результате обработки при 300 °С образуется аморфный  $ZrO_2$ . Получение при 400 °С приводит в основном к тетрагональной структуре ( $t$ - $ZrO_2$ ). Однако различить кубическую и тетрагональную фазы сложно, поскольку положения пиков перекрываются. Образец  $ZrO_2$ , приготовленный при 600 °С, содержит отражения, относящиеся как к моноклинной ( $m$ - $ZrO_2$ , 62%), так и к  $t$ - $ZrO_2$  (или кубической, 38%). Рентгенограмма  $Fe_3O_4$ - $ZrO_2$ -400 выглядит очень похоже на рентгенограмму исходного образца  $ZrO_2$ -400, отображая в основном  $t$ - $ZrO_2$ . Слабое отражение при  $\sim 57^\circ$  может быть связано со шпинелью, что указывает на то, что наночастицы оксида железа очень малы.

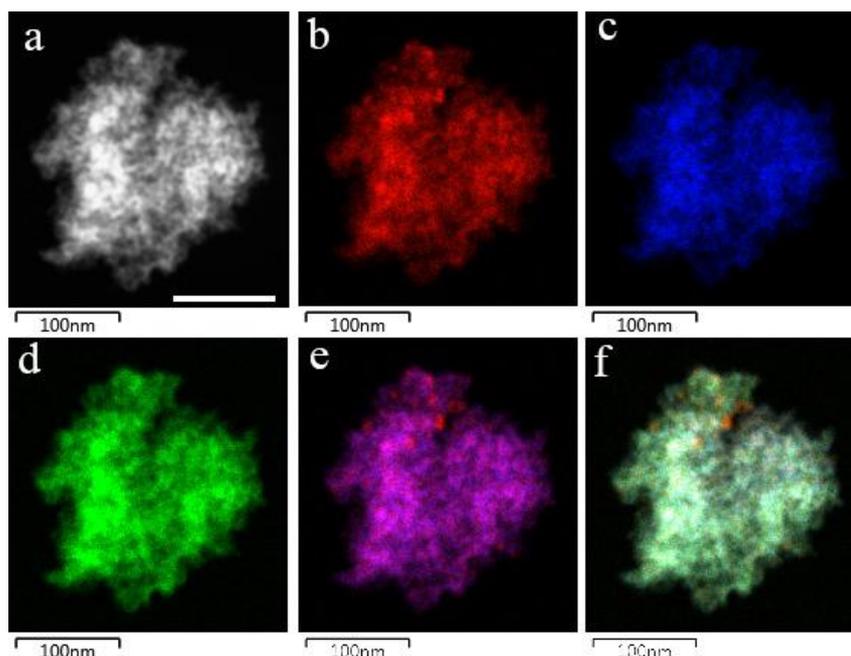


Рисунок 4 – СПЭМ изображение темного поля (а), карты ЭДС  $Fe_3O_4$ - $ZrO_2$ -600 для Fe (b), Zr (c), O (d) и суперпозиции Fe и Zr (e) и Fe, Zr и O (f)

Результаты измерения намагниченности для всех носителей МНЧ свидетельствуют о том, что исследованные образцы являются магнитомягкими ферромагнетиками, т.к. на кривых полностью отсутствует гистерезис. Кривые намагничивания подтверждают, что полученные наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  независимо от способа получения обладают суперпарамагнитными свойствами. Анализ результатов показывает, что наиболее высокой намагниченностью характеризуется образец  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-400}$ .

Для определения состава поверхности магнитоотделяемых носителей, а также степени окисления железа в МНЧ были проведены измерения методом РФЭС. Результаты представлены на рис. 5 на примере  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$ .

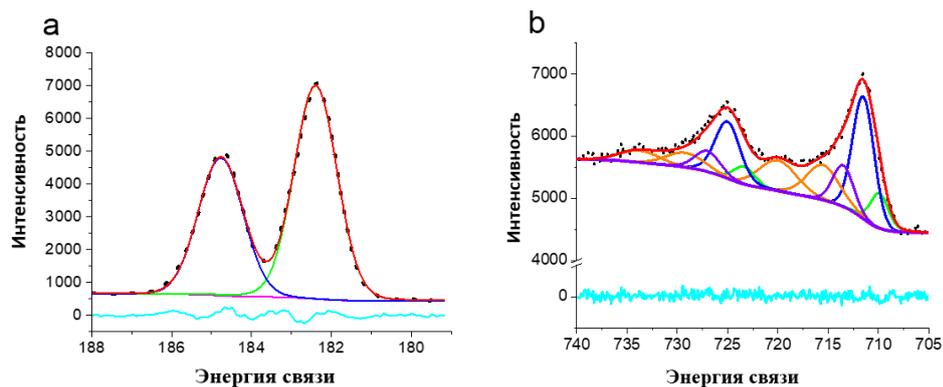


Рисунок 5 – а) РФЭ спектры Zr 3d для  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$ . Зеленая линия соответствует Zr  $3d_{5/2}$ , голубая – Zr  $3d_{3/2}$ . Красная кривая соответствует экспериментальным результатам (черные точки); б) РФЭ спектры Fe 2p для  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600}$ . Зеленая линия представляет компоненты  $\text{Fe}^{2+}$ . Синий и лиловый цвет представляют октаэдральную и тетрагональную компоненты  $\text{Fe}^{3+}$ , соответственно. Красная кривая соответствует экспериментальным результатам (черные точки)

Спектр РФЭС с высоким разрешением Zr 3d, представленный на рисунке 5а, демонстрирует два пика при 182,4 и 184,8 эВ, что согласуется со спектром немодифицированного  $\text{ZrO}_2$ . Спектр высокого разрешения Fe 2p (рисунок 5б) демонстрирует основной пик с энергией связи ( $E_{\text{св}}$ ) 711,5 эВ, что типично для оксидов железа. Комбинация сателлитов  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  в спектре магнетита приводит к плато между пиками Fe  $2p_{3/2}$  и Fe  $2p_{1/2}$ , что указывает на соотношение  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}=2:1$  и образование наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Исходные оксиды и носители МНЧ использовались в качестве подложек для иммобилизации GOx (рис. 6). Процесс проводили при комнатной температуре в следующей последовательности:

- функционализация поверхности образцов 3-аминопропилтретоксисиланом (APTES);
- активация аминогрупп APTES глутаровым альдегидом (GA);
- иммобилизация – реакция альдегидных групп GA с аминогруппами GOx:  $m_{\text{GOx}}/m_{\text{П}}=0,1 - 0,15$  (где  $m_{\text{GOx}}$  и  $m_{\text{П}}$  – массы GOx и подложки).

Избыток реагентов удаляли промывкой дистиллированной водой на каждой стадии.

Таким образом были синтезированы гетерогенные биокатализаторы как на основе исходных оксидов:  $\text{SiO}_2\text{-GOx}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-GOx}$ ,  $\text{ZrO}_2\text{-300-GOx}$ ,  $\text{ZrO}_2\text{-400-GOx}$ ,

ZrO<sub>2</sub>-600-GOx), так и на магнитоотделяемых носителях: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx).

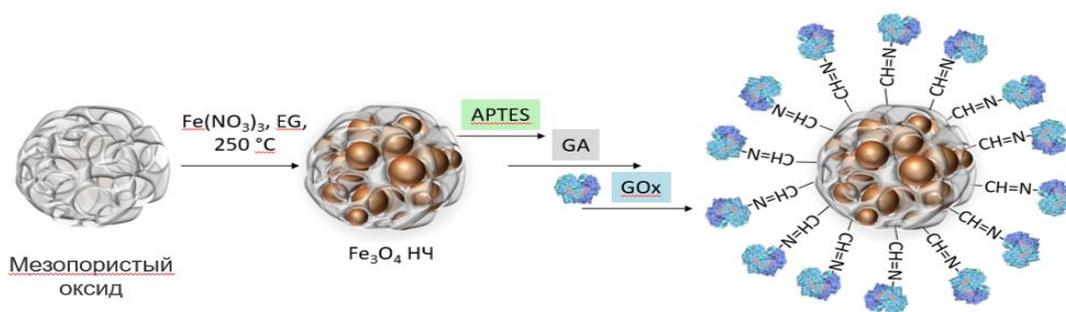


Рисунок 6 – Схематическое изображение синтеза биокатализатора

Для оценки количества иммобилизованной GOx определялась каталитическая активность супернатанта до и после иммобилизации фермента и рассчитывался коэффициент иммобилизации (IC). Согласно этим данным, исходные оксиды кремния и алюминия связывают ~ 65% GOx. Для носителей, содержащих МНЧ, количество иммобилизованной GOx увеличивается до 70%. Аналогичное увеличение коэффициента иммобилизации наблюдалось для циркониевых подложек. Полученные значения указывают, что IC в основном зависит от температуры кальцинирования ZrO<sub>2</sub>, причем самые высокие значения получены для ZrO<sub>2</sub>-600 (70%) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (76%), а самые низкие – для ZrO<sub>2</sub>-300 (52%) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300 (55%). В то же время, различия между образцами, обработанными при 400 °C и 600 °C (оба кристаллических носителя), являются незначительными. Кроме того, эффективность иммобилизации несколько выше для магнитоотделяемых подложек, что можно отнести к вкладу наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Необходимо отметить, что увеличение нагрузки  $m_{GOx}/m_{П}$  с 0,1 до 0,15 не повлияло на количество иммобилизованной GOx, демонстрируя, что с поверхностью носителя может быть связано ограниченное количество молекул GOx.

Учитывая сложность синтезированных биокатализаторов, невозможно напрямую оценить какие-либо структурные или конформационные изменения GOx при иммобилизации. Однако эта оценка может быть проведена косвенно, используя относительную активность биокатализатора по сравнению с активностью нативной GOx и предполагая, что высокая относительная активность биокатализатора указывает на невозмущенную структуру иммобилизованной GOx.

Гетерогенные биокатализаторы были исследованы в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты (рис. 7) в диапазоне pH 4-8, при T 40 °C. Хорошо известно, что активность фермента сильно зависит от степени ионизации аминокислотных остатков в активном центре, что делает pH ключевым фактором в каталитической реакции. Сравнительные эксперименты проводились с нативным и иммобилизованным ферментом. Относительная активность нативной GOx максимальна (~100%) при pH 6 и резко снижается при изменении водородного показателя (табл. 2, рис. 8а). Для гетерогенных биокатализаторов зависимость относительной активности от pH имеет пологий характер, оставаясь высокой в диапазоне от pH 4 до pH 8. Известно, что иммобилизация GOx приводит к сохранению относительной активности в широком диапазоне pH, что согласуется с нашими данными. Относительная активность для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx составила 95% при pH 6 и pH 7, тогда как у нативной GOx – 40%. Магнитоотделяемые

биокатализаторы демонстрируют более высокую активность, как это показано на рис. 8а, для образцов на основе циркония, что, вероятно, связано с влиянием МНЧ оксида железа, проявляющего каталитическую активность. Наибольшая относительная активность 98% при рН 6 и 7 наблюдалась для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx. Результаты, представленные на рис. 8а, показывают, что температура прокаливания ZrO<sub>2</sub> влияет на каталитические свойства, хотя различия в кристаллической структуре между образцами, обработанными при 400 и 600 °С, незначительные.

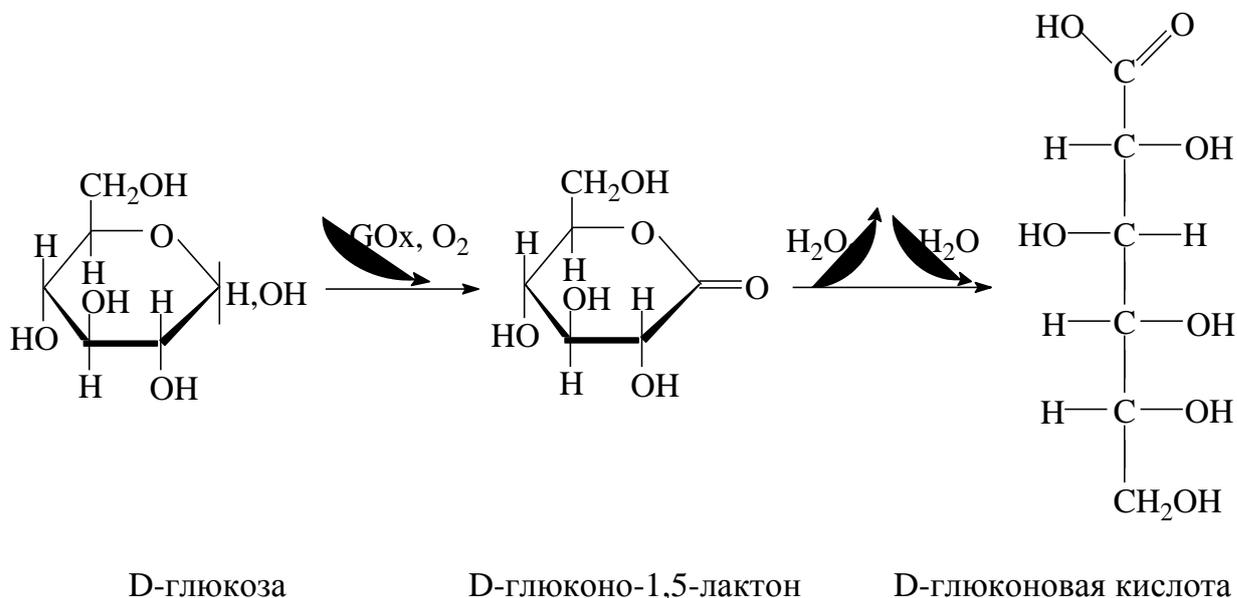


Рисунок 7 – Схема окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии биокатализатора

Таблица 2 – Влияние рН и температуры на относительную активность нативной и иммобилизованной GOx

рН	Относительная активность биокатализаторов, %				
	GOx	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	SiO <sub>2</sub> -GOx	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> -GOx
4	20	71	75	79	82
5	72	76	84	86	92
6	100	79	88	89	95
7	40	82	89	90	95
7,5	38	79	85	87	91
8	30	69	72	76	81
Температура, °С					
30	70	75	87	88	94
35	93	78	88	89	95
40	100	79	88	89	95
45	93	82	90	93	95
50	73	79	82	92	95
60	39	67	74	84	91

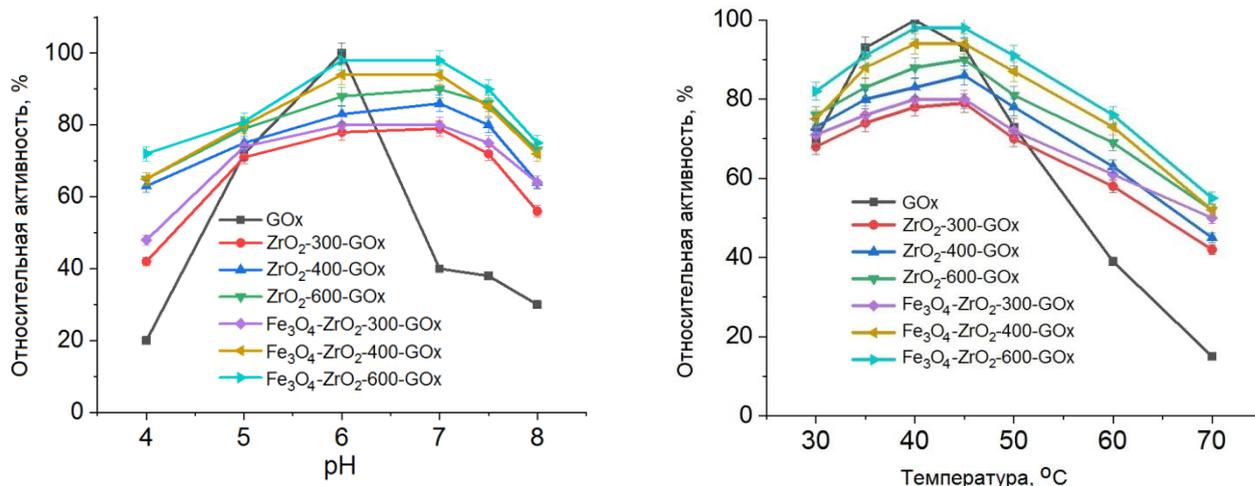


Рисунок 8 – Влияние pH (а) и температуры (б) на относительную активность нативной и иммобилизованной GOx

Влияние температуры на окисление D-глюкозы изучалось в интервале от 30 до 70 °C при pH 6 (табл. 2, рис. 8б). Нативный фермент проявляет максимальную активность при 40 °C (~100%) с последующим резким снижением до 73% при 50 °C, в то время как иммобилизованные биокатализаторы, как это видно из приведённых данных, менее чувствительны к изменению температуры. Так, активность Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400-GOx и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx в интервале 35-50 °C остаётся на уровне 87-98% (рис. 8б). При 60 °C нативный фермент теряет около 60% каталитической активности, в то время как активность гетерогенных биокатализаторов снижается только на 4-18% в зависимости от типа подложки. Среди иммобилизованных биокатализаторов лучшие результаты были получены для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx с относительной активностью 98% при 40-45 °C.

Следовательно, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx проявляет высокую относительную активность в достаточно широком для ферментов диапазоне pH и температуры, что делает его полезным для повышения устойчивости технологического процесса ферментативного окисления D-глюкозы в D-глюконовую кислоту.

Для сравнительной характеристики биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов были определены кинетические параметры: максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ ) и константа Михаэлиса ( $K_m$ ), которые представлены в таблице 3. Из представленных данных видно, что для нативной GOx  $V_{max}$  и  $V_{max}/K_m$  являются самыми высокими, а значение  $K_m$  является самым низким, что коррелирует с его более высокой активностью по сравнению с иммобилизованной GOx (pH 6, 40 °C). Сравнение кинетических параметров для биокатализаторов на основе оксидов кремния, алюминия и циркония (табл. 3) свидетельствует, что значения  $K_m$ ,  $V_{max}$  и  $V_{max}/K_m$  отличаются незначительно.

Во всех случаях для магнитоотделяемых биокатализаторов значение  $K_m$  меньше, а  $V_{max}$  и  $V_{max}/K_m$  – больше по сравнению с GOx, иммобилизованной на обычные оксиды. Вероятно, что синергия между активностью GOx и присущей МНЧ каталитической активностью способствует повышению эффективности биокатализатора. В этом случае МНЧ ведут себя как сокатализатор для фермента. Для биокатализаторов на основе оксидов циркония наблюдается уменьшение  $K_m$  и увеличение  $V_{max}$  и  $V_{max}/K_m$  с увеличением температуры кальцинирования ZrO<sub>2</sub> (как для исходных, так и для магнитоотделяемых носителей ZrO<sub>2</sub>). Наиболее

близкие к нативному ферменту значения кинетических параметров показывают биокатализатор на основе оксида циркония кристаллической структуры – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx.

Таблица 3 – Кинетические параметры и максимальное значение относительной активности нативной и иммобилизованной GOx

Биокатализатор	<i>K<sub>m</sub></i> , мМ	<i>V<sub>max</sub></i> , мкМ / мин	<i>V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub></i> · 10 <sup>3</sup> , мин <sup>-1</sup>	Относительная активность, %
GOx	78	173	2,2	100
ZrO <sub>2</sub> -300-GOx	133	88	0.7	79
ZrO <sub>2</sub> -400-GOx	125	113	0.9	86
ZrO <sub>2</sub> -600-GOx	115	151	1,3	90
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -300-GOx	124	104	0.8	80
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -400-GOx	113	148	1,3	94
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -600-GOx	105	164	1,6	98
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	140	43	0,3	82
SiO <sub>2</sub> -GOx	132	77	0.6	90
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	125	104	0.8	93
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> -GOx	118	152	1,3	95

Известно, что присутствие кислотных центров Льюиса (ЛКЦ) и Бренстеда (БКЦ) на поверхности подложки может влиять на активность иммобилизованного фермента. Чтобы оценить кислотные и основные центры оксидных носителей, использовалась DRIFT спектроскопия адсорбции дейтерированного ацетонитрила (CD<sub>3</sub>CN) и дейтерированного хлороформа (CCl<sub>3</sub>D), соответственно.

На рисунке 9 показаны ИК-спектры в области ОН-группы, записанные при адсорбции CD<sub>3</sub>CN. Основываясь на смещении полосы валентного колебания ОН, сила БКЦ может быть выражена следующим образом: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> > SiO<sub>2</sub> > Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> > Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Эта зависимость согласуется с различиями в каталитической активности GOx, иммобилизованной на исходных и магнитоотделяемых оксидах кремния и алюминия (табл. 3). Для носителей на основе ZrO<sub>2</sub> не выявлено четкой корреляции между кислотно-основными свойствами подложки и каталитическими характеристиками иммобилизованной GOx. Можно предположить, что различия относительной активности в биокатализаторах на исходных и магнитоотделяемых оксидах циркония объясняются кристаллическим порядком поверхности ZrO<sub>2</sub> по сравнению с ее аморфным характером. Действительно, поверхность t-ZrO<sub>2</sub> (полученного при 400 °С) или смешанного t-ZrO<sub>2</sub>/m-ZrO<sub>2</sub> (полученного при 600 °С) может лучше подходить для сохранения нативной конформации GOx при иммобилизации, чем неупорядоченная поверхность аморфного ZrO<sub>2</sub> (полученного при 300 °С).

Для оценки возможности повторного использования гетерогенных биокатализаторов были проведено тестирование в десяти последовательных экспериментах при рН 6 и температуре 40 °С. Для биокатализаторов на основе исходных оксидов кремния и алюминия относительная активность снизилась на 24% и 30% (рис. 10а, 10-ый цикл), в то время как для магнитоотделяемых аналогов снижение составило 11% и 13%, соответственно. Полученные результаты демонстрируют, что относительная активность ZrO<sub>2</sub>-600-GOx уменьшается на 14% (рис. 10б, 10-ый цикл), в то время как для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx снижение

относительной активности составляет всего 7%. Стоит отметить, что для образцов  $ZrO_2-600-GOx$  и  $Fe_3O_4-ZrO_2-600-GOx$  не наблюдалось истирания. Это объясняется более высокой устойчивостью к истиранию  $ZrO_2$ . Кроме того, высокая каталитическая стабильность при повторном использовании гетерогенных биокатализаторов, содержащих МНЧ, возможно объясняется положительным влиянием наночастиц оксида железа.

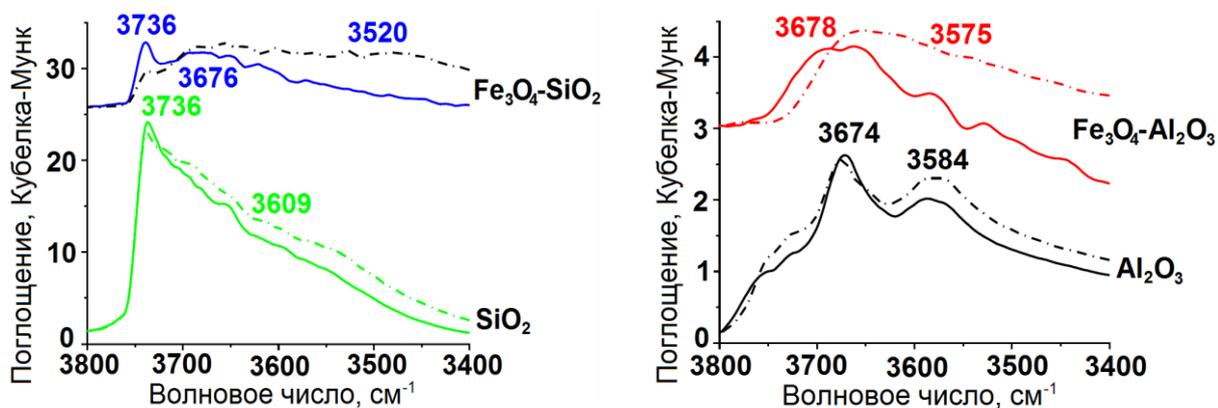


Рисунок 9 – DRIFT спектры ОН-групп до (сплошной) и после (тире) адсорбции  $CD_3CN$

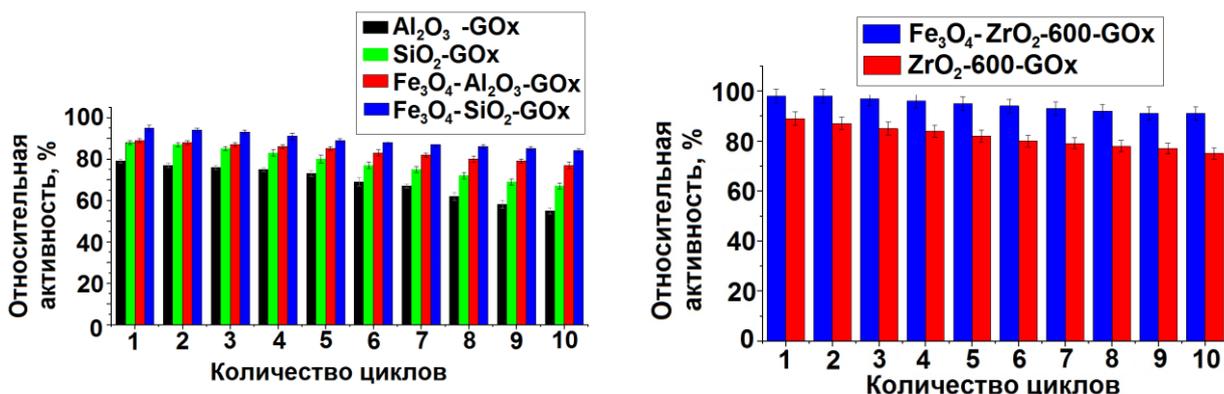


Рисунок 10 – Относительная активность иммобилизованной GOx при повторном использовании для биокатализаторов на основе оксидов алюминия и кремния (а) и оксидов циркония (б) (на примере  $ZrO_2-600-GOx$  и  $Fe_3O_4-ZrO_2-600-GOx$ )

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

- Для биокатализаторов на основе иммобилизованной глюкозооксидазы синтезированы гетерогенные носители, а именно мезопористые оксиды циркония с использованием в качестве жесткого шаблона мезопористого оксида кремния с размером пор 6 нм. При варьировании температуры прокаливания получены разные структуры: аморфная (при 300 °C), тетрагональная (t- $ZrO_2$ , при 400 °C), моноклинная (m- $ZrO_2$ , 62%) и t- $ZrO_2$  (38%) при 600 °C.

2. Подобраны оптимальные условия *in-situ* кристаллизации наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония и получены магнитоотделяемые носители по следующей схеме: пропитка мезопористого оксида этанольным раствором нитрата железа (III) в течение 12 часов, сушка под вакуумом в течение 2 часов, восстановление этиленгликолем, отжиг под аргоном при 250 °С в течение 6 часов.

3. Синтезированы новые биокатализаторы путем ковалентного связывания глюкозооксидазы с исходными и магнитоотделяемыми мезопористыми оксидами кремния, алюминия и циркония. Предварительно поверхность носителя функционализировали аминогруппами при помощи 3-аминопропилтретоксисилана. В качестве сшивающего агента был выбран глутаровый альдегид.

4. Исследование методом низкотемпературной адсорбции азота для оксидов кремния, алюминия и циркония показало, что они относятся к мезопористым материалам с размером пор 4-8 нм. Данные просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции показали, что наночастицы магнетита формируются в порах (размер 4-8 нм) и в стыках пор (размер 12-13 нм). Кривые намагничивания подтверждают, что полученные наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , независимо от природы оксида, обладают суперпарамагнитными свойствами.

5. ИК-Фурье спектроскопия с диффузным отражением показала для оксидов кремния и алюминия, что сила Бренстедовских кислотных центров коррелирует с активностью глюкозооксидазы, иммобилизованной на исходных и магнитоотделяемых оксидах кремния и алюминия.

6. Для магнитоотделяемых биокатализаторов выявлено, что включение наночастиц магнетита увеличивает относительную активность на 7-10%, что связано с корреляцией между активностью глюкозооксидазы и ферментоподобной активностью  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

7. Магнитоотделяемые биокатализаторы  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-GOx}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-GOx}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$  в процессе окисления D-глюкозы показали соответственно 95%, 93% и 98% активности нативного фермента. Рассчитаны кинетические параметры и показано, что наибольшее сродство субстрата и фермента наблюдается для биокатализатора  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$ .

8. Изучена стабильность глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемых мезопористых оксидах, в процессе окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. В десяти последовательных циклах лучший магнитоотделяемый биокатализатор  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2\text{-600-GOx}$  теряет не более 7% своей активности, что объясняется высокой устойчивостью к истиранию  $\text{ZrO}_2$ . Высокая ферментативная активность биокатализаторов в широком диапазоне pH и температуры делает их перспективными для практического применения.

#### **Публикации автора по теме диссертации**

*А. Работы, включенные в международные реферативные базу данных Scopus, Web of Science и работы, опубликованные в научных журналах из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ*

1. Grebennikova, O. Physical–chemical analysis and kinetics of the magnetic biocatalyst for 2,3,6 -trimethylphenol oxidation / O. Grebennikova, **A. Sulman**, V. Matveeva, E. Sulman // Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis. - 2020. - Т. 130. - № 1. - С. 317-329.

2. Haskell, A.K. Glucose oxidase immobilized on magnetic zirconia: controlling catalytic performance and stability / A.K. Haskell, M. Pink, D.G. Morgan, L.M. Bronstein, **A.M. Sulman**, N.V. Lakina, E.M. Sulman, V.G. Matveeva, B.D. Stein, O.P. Tkachenko, E.P. Golikova, A.Y. Karpenkov // ACS Omega. - 2020. - T. 5. - № 21. -C. 12329-12338.
3. Sulman, A. The design of magnetically separable biocatalyst on the basis of glucose oxidase / **A. Sulman**, E. Golikova, N. Lakina, E. Sulman, V. Matveeva // 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConferences. SGEM. Conference proceedings. - 2019. - P. 519-526.
4. Tikhonov, B.B. Immobilized enzymes from the class of oxidoreductases in technological processes: a review / B.B. Tikhonov, E.M. Sulman, P.Y. Stadol'nikova, **A.M. Sulman**, E.P. Golikova, A.I. Sidorov, V.G. Matveeva // Catalysis in Industry. - 2019. - Vol. 11. - № 3. - P. 251-263.
5. **Sulman, A.M.** Oxidoreductase immobilization on magnetic nanoparticles / **A.M. Sulman**, V.G. Matveeva, E.P. Golikova, O.V. Grebennikova, N.V. Lakina, V.Y. Doluda, E.M. Sulman, A.Y. Karpenkov // Chemical Engineering Transactions. - 2019. – Vol. 74. - P. 487-492.
6. **Sulman, A.M.** Oxidoreductase immobilization on magnetic nanoparticles / **A.M. Sulman**, V.G. Matveeva, E.P. Golikova, O.V. Grebennikova, N.V. Lakina, V.Yu. Doluda, E.M. Sulman // 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering, CHISA 2018 and 21st Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction, PRES. - 2018. – Vol. 23. - P. 601-602.
7. Matveeva, V. Immobilization of horseradish peroxidase: effect of the support and the design / V. Matveeva, **A. Sulman**, B. Tikhonov, P. Stodolnikova, A. Sidorov // 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConferences. SGEM. Conference proceedings. - 2018. - P. 229-236.
8. Matveeva, V. Magnetically separable biocatalyst of d-glucose oxidation / V. Matveeva, E. Golikova, N. Lakina, **A. Sulman**, A. Sidorov, V. Doluda, E. Sulman, A.Y. Karpenkov // AIP Conference Proceedings. Ser. "Recent Advances on Environment, Chemical Engineering and Materials". - 2018. -P. 200-208.
9. Jaquish, R. Immobilized glucose oxidase on magnetic silica and alumina: beyond magnetic separation / R. Jaquish, A.K. Reilly, B.P. Lawson, L.M. Bronstein, E. Golikova, **A. M. Sulman**, N.V. Lakina, E.M. Sulman, V.G. Matveeva, B.D. Stein, O.P. Tkachenko // International Journal of Biological Macromolecules. - 2018. – Vol. 120. - P. 896-905.
10. Matveeva, V. Immobilization of horseradish peroxidase: effect of the support and the design / V. Matveeva, **A. Sulman**, B. Tikhonov, P. Stodolnikova, A. Sidorov // International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM. - 2018. Vol. 18. - № 6.2. - P. 229-236.
11. Lawson, B.P. Insights into sustainable glucose oxidation using magnetically recoverable biocatalysts / B.P. Lawson, D.G. Morgan, L.M. Bronstein, E. Golikova, **A.M. Sulman**, N.V. Lakina, E.M. Sulman, V.G. Matveeva, B.D. Stein, A.Y. Karpenkov // ACS Sustainable Chemistry and Engineering. - 2018. Vol. 6. - № 8. - P. 9845-9853.

*В. Публикации в других изданиях*

1. **Сульман, А.М.** Иммуобилизация глюкозооксидазы на магнитоотделяемых оксидах / **А.М. Сульман**, О.В. Гребенникова, Е.М. Михайлова, М.Г.

- Сульман, В.Г. Матвеева // Актуальная биотехнология. – 2020. – № 3 (34). – С. 330-333.
2. Гребенникова, О.В. Окисление органических соединений магнитным биокатализатором / О.В. Гребенникова, **А.М. Сульман**, С.П. Михайлов, Е.И. Шиманская, В.Г. Матвеева // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2020. – № 1 (39). – С. 31-39.
  3. **Sulman, A.** Bi-enzymatic catalyst based on the glucose oxidase and horseradish peroxidase immobilized on an inorganic support / **A. Sulman**, L. Mushinskiy, N. Lakina, E. Golikova, V. Matveeva, E. Sulman // 5<sup>th</sup> International Congress on Catalysis for Biorefineries (CatBior). - 2019. – P. 232.
  4. **Сульман, А.М.** Синтез биокатализаторов на основе глюкозооксидазы и пероксидазы, иммобилизованных на неорганических носителях / **А.М. Сульман**, Л.С. Мушинский, Н.В. Лакина, О.В. Гребенникова, Е.П. Голикова, В.Г. Матвеева, Э.М.Сульман // В сборнике: Саморазвивающаяся среда технического вуза: научные исследования и экспериментальные разработки. Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. В 2 ч. под общ. ред. Т.Б. Новиченковой. - 2019. - С. 105-109.
  5. Сульман, Э.М. Достижения в области катализа в работе 23-го международного конгресса по химической технологии (CHISA- 2018) и 21-й конференции по интеграции, моделированию и оптимизации процессов для энергосбережения и уменьшения выбросов (PRES 2018) / Э.М. Сульман, А.А. Степачёва, О.В. Манаенков, **А.М. Сульман**, В.Г. Матвеева, М.Г. Сульман // Катализ в промышленности. - 2018. - № 6. - С. 74-76.
  6. **Сульман, А.М.** Магнитоотделяемые биокатализаторы для процессов окисления / **А.М. Сульман**, В.Г. Матвеева, Е.П. Голикова, О.В. Гребенникова, Н.В. Лакина, М.Г. Сульман // В книге: Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов. IX Международная конференция Российского химического общества имени Д. И. Менделеева, посвященная 150-летию РХО имени Д. И. Менделеева : тезисы докладов. - 2018. - С. 156-157.
  7. Сидоров, А. И. Магнитоотделяемые биокатализаторы на основе иммобилизованных ферментов / А.И. Сидоров, **А.М. Сульман**, О.В. Гребенникова, В.Г. Матвеева // Актуальная биотехнология. -2018. - № 3 (26). - С. 264.
  8. Матвеева, В. Г. Иммобилизованные ферменты в процессах тонкого органического синтеза / В. Г. Матвеева, Н. В. Лакина, Е. П. Голикова, О.В. Гребенникова, **А.М. Сульман**, Э. М. Сульман // В книге: Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической и нефтехимической промышленности. VIII Международная конференция РХО имени Д. И. Менделеева: тезисы докладов. - 2017. - С. 51-52.