

На правах рукописи

Стадольникова Полина Юрьевна

**Разработка и исследование свойств нового
биокатализатора на основе альгинатных
микросфер и глюкозооксидазы**

1.5.6 Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2023

Работа выполнена на кафедре биотехнологии, химии и стандартизации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической академии».

Научный руководитель: Тихонов Борис Борисович

кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической академии»

Официальные оппоненты: Лозинский Владимир Иосифович

доктор химических наук, заведующий лабораторией криохимии биополимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова» Российской академии наук

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 мая 2023 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева по адресу: 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9, ауд. 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат диссертации разослан "___" апреля 2023г.

Ученый секретарь диссертационного совета 99.0.027.03,
кандидат технических наук, профессор

 И.В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Активное использование в биотехнологических процессах биокатализаторов на основе ферментов связано с тем, что они высокоспецифичны, экологически безопасны и широко распространены в природе. Однако применение нативных ферментов имеет ряд ограничений. Иммобилизация позволяет повысить операционную стабильность и делает возможным повторное использование биокатализаторов, что повышает экономическую эффективность процесса. Таким образом, иммобилизация является простым и перспективным подходом к разработке биокатализаторов с улучшенными каталитическими свойствами по сравнению со свободными формами ферментов.

Производство гетерогенных биокатализаторов направлено на поиск матриц и методов, отвечающих заданным эксплуатационным и экологическим требованиям. В связи с этим все более популярными с точки зрения иммобилизации ферментов становятся гидрогели природного происхождения. Используя мягкие условия синтеза и нетоксичную биоразлагаемую матрицу, можно получать стабильные, надежные и эффективные каталитические системы при относительно невысоких производственных затратах.

Разработка микрогелей на основе водорослевых полисахаридов – альгинатов, является одним из перспективных направлений исследовательской деятельности в последние десятилетия, благодаря преимуществам альгинатного биополимера – дешевизне, нетоксичности, биосовместимости, биоразлагаемости, наличию реакционноспособных групп и способности к ионотропному гелеобразованию в мягких условиях, что обеспечивает регулируемость химико-механических свойств биополимерной матрицы. Поэтому альгинатные микрочастицы особенно ценятся при иммобилизации различных биообъектов и биологически активных веществ. В частности, они успешно использовались для иммобилизации ферментов различного функционального назначения, таких как папаин, β -галактозидаза, инулиназа, полигалактуроназа, глюкозооксидаза.

Ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, в том числе - в пищевой индустрии в качестве безопасных технологических добавок, для повышения эффективности использования сырья и получения готового продукта с высокими потребительскими свойствами. В частности, обработка пшеничной муки глюкозооксидазой приводит к положительным изменениям в структуре теста и образованию мякиша с улучшенными свойствами, а иммобилизация с использованием биополимеров способна решить трудности, связанные с применением нативных ферментов.

Цели и задачи исследования. Цель работы – разработка нового гетерогенного биокатализатора на основе глюкозооксидазы (GOx) посредством иммобилизации фермента на поверхности альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования (ЭВГ), и изучение его физико-химических и каталитических характеристик.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Теоретически обосновать выбор альгинатных микросфер в качестве эффективной матрицы для иммобилизации GOx.
- 2) Экспериментально определить оптимальные условия синтеза альгинатных микросфер методом ЭВГ.

3) Экспериментально определить оптимальные состав и условия синтеза гетерогенного биокатализатора на основе GOx и микросфер альгината.

4) Провести исследования по изучению морфологии синтезированных микросфер, определению эффективности иммобилизации, физико-химических и каталитических характеристик синтезированного биокатализатора.

5) Изучить влияние температуры, pH и количества субстрата на активность полученного биокатализатора.

6) Исследовать влияние синтезированного биокатализатора на свойства теста из пшеничной муки на основе результатов анализа качества клейковины и пробной выпечки.

7) Изучить устойчивость гетерогенного биокатализатора при хранении.

Научная новизна работы. Впервые теоретически обоснована и экспериментально подтверждена целесообразность физико-химической модификации альгинатных микросфер, полученных методом ЭВГ, с целью получения носителей, способных к ковалентной сшивке с ферментами, проведена ковалентная пришивка GOx к поверхности альгинатных микросфер. Изучено влияние способа и условий синтеза и хранения разработанного ковалентно иммобилизованного фермента (imGOx) на его активность и стабильность. Впервые imGOx использован для улучшения хлебопекарных свойств теста из пшеничной муки. Проведенные исследования являются основой для разработки новой технологической добавки (хлебопекарного улучшителя) на основе GOx, ковалентно иммобилизованной на поверхности частиц полимерного геля.

Практическая значимость. Разработана методика получения гетерогенного биокатализатора на основе GOx, ковалентно иммобилизованной на поверхности альгинатных микросфер посредством активации карбоксильных групп на поверхности биополимера. Микросферы получены простым и эффективным методом ЭВГ. Иммобилизация GOx улучшает операционные характеристики и стабильность фермента, позволяя расширить его рабочий диапазон температур и pH, а преимущество ковалентной иммобилизации заключается в высокой прочности связывания биомолекулы с поверхностью матрицы носителя. Полученные данные позволяют использовать imGOx в различных сферах, в том числе - в качестве технологической добавки для улучшения потребительских характеристик хлебоулучшителей.

Степень достоверности и апробация результатов. Каждый эксперимент повторялся не менее 3 раз, после чего для представления результатов экспериментов была проведена их статистическая обработка. В таблицах и на рисунках данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего при уровне значимости $p < 0.05$.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были представлены на следующих научных конференциях: IX Международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика» (Тверь, Россия, 2019 г.); VIII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, Россия, 2020 г.); XVII международная научно-практическая конференция «Пища. Экология. Качество» (Екатеринбург, Россия, 2020 г.); международная научно-практическая конференция с элементами научной школы для молодежи «Качество и экологическая безопасность пищевых продуктов и производств» (Тверь, Россия, 2020 г.); X Международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика» (Великий Новгород, Россия, 2020 г.); IX

Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, Россия, 2021 г.); X Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Алушта, Россия, 2022 г.); Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2022» (Тула, Россия, 2022 г.).

Личный вклад автора. Автором лично выполнена постановка цели и соответствующих задач исследования, произведен обзор обширного количества литературы по тематике диссертации. Вся экспериментальная часть работы выполнена лично автором или при его непосредственном участии. Автором оптимизирована методика получения альгинатных микросфер с использованием механизма ЭВГ и подобраны условия отделения частиц из масляной фазы. Произведено микроскопирование полученных образцов. Проведена успешная иммобилизация ГОх на поверхности биополимерного носителя. Проведены пробные выпечки с использованием синтезированного биокатализатора. Выполнены анализ и обобщение полученных экспериментальных данных.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Web of Science и Scopus, в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ и прочих изданиях.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Текст изложен на 136 страницах, включает 33 рисунка, 10 таблиц. Список использованных источников содержит 215 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, изложены цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость.

В первой главе представлен анализ литературных данных, который показал перспективность применения микрочастиц на основе биополимера, выделяемого из бурых водорослей – альгината. Приведена сравнительная характеристика основных способов получения альгинатных микросфер, описаны преимущества метода эмульгирования и основные этапы процесса. Рассмотрены механизмы внешнего и внутреннего гелеобразования и основные различия микрочастиц, получаемых с помощью каждого метода. Анализ доступной литературы свидетельствует о том, подавляющее число работ по иммобилизации биологических объектов с использованием в качестве носителей альгинатных микрочастиц, полученных методом ЭВГ, сосредоточено вокруг использования физических методов (инкапсуляция, адсорбция). Такие методы иммобилизации способны сохранить значительную долю активности инкапсулятов, однако не обеспечивают прочность связи с матрицей, что может быть приемлемо только в определенных прикладных сферах. В связи с этим представляет интерес изучение химических методов иммобилизации энзимов на альгинатных микросферах и оценка ее эффективности в биотехнологических процессах, а также определение активности полученных таким образом биокатализаторов.

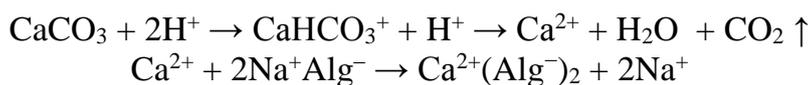
Во второй главе изложены материальная часть, объекты и методы исследования. Представлена методика синтеза альгинатных микросфер методом

ЭВГ. Приведена методика ковалентной иммобилизации ГОх на поверхности биополимерной матрицы посредством предварительной активации карбоксильных групп на поверхности альгинатных микросфер с помощью карбодиимида и N-гидроксисукцинимиды. Описаны методы характеристики гелеобразующего биополимера, биополимерных микросфер и биокатализатора на их основе: вискозиметрический метод определения молекулярной массы полимеров, оптическая микроскопия, просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия с использованием негативного контрастирования уранилацетатом, ИК-Фурье спектроскопия, йодометрический метод определения активности фермента, метод Брэдфорда для определения эффективности иммобилизации, термогравиметрия, определение качества клейковины с помощью измерителя деформации клейковины ИДК-3М.

В третьей главе представлены результаты проведенного исследования и их обсуждение.

На первом этапе работы были изучены основные физико-химические свойства используемого альгината натрия для определения эффективности образования гидрогелевой матрицы для дальнейшей иммобилизации фермента. Как показали эксперименты, используемый в работе альгинат обладает следующими характеристиками: характеристическая вязкость - $5,8 \pm 0,1$ дл/г; молекулярная масса - $211,3 \pm 2,8$ кДа; соотношение маннуриновых и гулуриновых блоков в цепи - 50/50. Таким образом, использованный в работе альгинат содержит в своей структуре достаточное количество гулуриновых блоков, необходимых для формирования устойчивых гидрогелей, и маннуриновых блоков, предоставляющих активные реакционноспособные группировки для осуществления ковалентной иммобилизации фермента на поверхности полученной биополимерной матрицы. Известно, что с возрастанием молекулярной массы скорость гелеобразования снижается, а высокая вязкость высокомолекулярных растворов затрудняет процесс получения однородных по размерам частиц (Abka-Khajouei, 2022; Lee, 2012). Молекулярная масса используемого в данной диссертационной работе альгината обеспечивает необходимые условия для организации процесса синтеза альгинатных микросфер.

Для получения биополимерной матрицы для иммобилизации ГОх в виде микрочастиц альгинатного гидрогеля использовался метод ЭВГ, который включает использование нерастворимой в воде соли кальция, смешиваемой с раствором альгината и добавляемой в масляную фазу, после чего катионы кальция высвобождаются внутри альгинатной фазы путем снижения значений pH среды (добавление уксусной кислоты), в результате чего образуется альгинатный гель (Paques, 2014; Leong, 2016; Zhang, 2007; Mark, 2009; Leong, 2016; Liu2015):



Были подобраны условия синтеза альгинатных микросфер, позволяющие получить биополимерную матрицу, подходящую для иммобилизации фермента. В известную методику получения альгинатных микросфер (Wang, 2011) были внесены изменения, направленные на повышение эффективности процесса синтеза и отделения биополимерных микрошариков. Диспергирование порошка карбоната кальция осуществлялось без ультразвукового воздействия, для создания эмульсии

использовалось подсолнечное масло, подобрано соотношение вода/масло (2,4:1) для наилучшего последующего отделения микросфер из гидрофобной фазы, в качестве сурфактантов использовались Span 80 на стадии гелеобразования (для повышения устойчивости полимерных капель эмульсии и уменьшения их диаметра) и Tween 80 на стадии пост-сшивки хлоридом кальция и последующей промывки (для наиболее полного отделения микрочастиц от гидрофобной фазы). Данные условия позволили синтезировать микрочастицы с гомологичной структурой биополимерной матрицы в большом количестве.

Далее был проведен подбор концентрации альгината, позволяющей получить стабильные микросферы в размерном диапазоне до 200 мкм. Для этого варьировалась концентрация биополимера в диапазоне 1-3 % масс. при постоянстве остальных условий синтеза и оценивались морфология и размер частиц. Разница в размере, морфологии и структуре микросфер при использовании различных концентраций альгината отчетливо видна на рисунке 1, где представлено изображение альгинатных микрочастиц, полученное с помощью оптического микроскопа Биомед-2 (общее увеличение 150х).

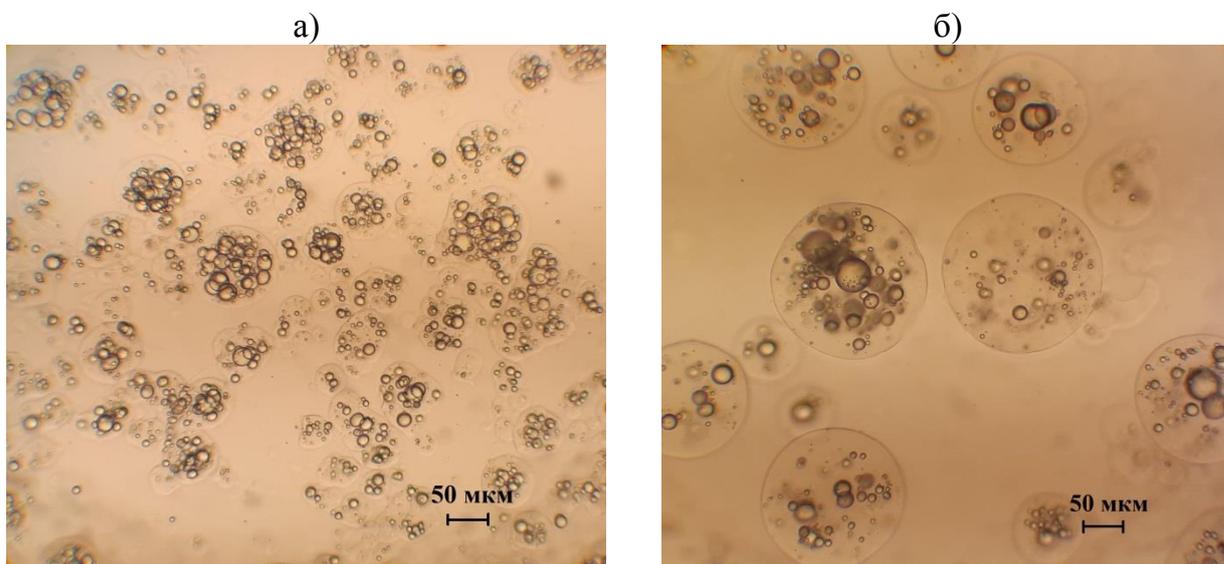


Рисунок 1 – Внешний вид микрочастиц альгината при концентрациях альгината 1,5% масс. (а) и 2% масс. (б)

Как видно из рисунка 1, полученные альгинатные микросферы представляют собой частицы сферической формы, внутри биополимерной матрицы просматриваются воздушные полости, образующиеся вследствие разложения карбоната кальция, заключенного внутри альгинатных капель, микросферы мягкие и имеют тенденцию к агломерации, что соответствует закономерностям метода ЭВГ (Mark, 2009; Leong, 2016; Song, 2013).

Зависимость размеров полученных микрочастиц от концентрации альгината представлена в таблице 1. Для дальнейших исследований была выбрана концентрация альгината натрия 1,5%, при которой образуется около 99,6% частиц менее 200 мкм, легко отделяемых от реакционной смеси.

Таблица 1 – Изменение размера микросфер в зависимости от концентрации альгината натрия

Концентрация альгината натрия, %	Содержание микросфер различных размеров, %				Средний диаметр, мкм	Максимальный диаметр, мкм
	0-50 мкм	50-100 мкм	100-200 мкм	>200 мкм		
1,0	75,8	22,9	1,3	-	41,9	177,4
1,5	59,5	34,0	6,1	0,4	53,6	207,7
2,0	43,1	36,8	11,3	8,8	83,0	457,7
2,5	44,1	29,3	17,6	9,0	84,7	464,8
3,0	44,3	25,8	20,6	9,3	86,4	471,9

Следующим этапом исследований стал подбор количеств активаторов функциональных групп (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этил-карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимида (NHS)), которые использовались для ковалентной сшивки GOx с поверхностью альгинатных микросфер (Alg⁻). Схема иммобилизации представлена на рисунке 2.

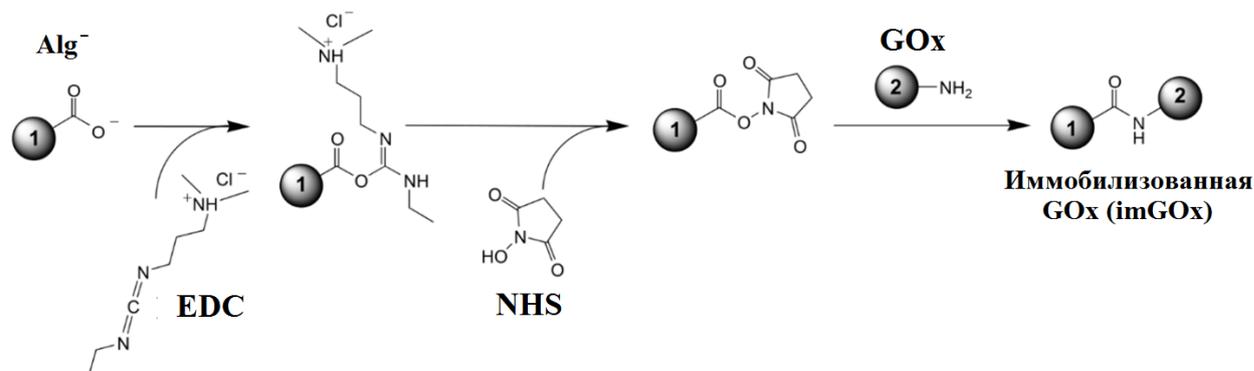


Рисунок 2 – Схема активации карбоксильных групп альгината натрия EDC и NHS: 1 – альгинатные микросферы (Alg⁻), 2 – глюкозооксидаза (GOx)

Ферментативная активность оценивалась в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты по количеству выделяющегося H₂O₂ (рисунок 3) (Kornecki, 2020).

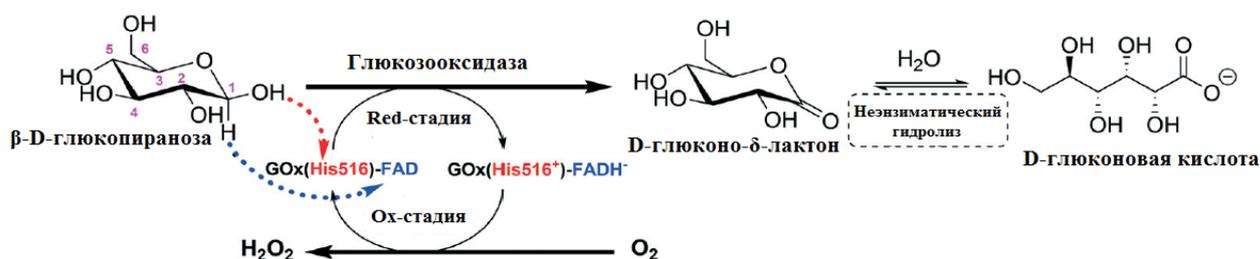


Рисунок 3 – Механизм окисления β-D-глюкозы в присутствии GOx до D-глюконо-δ-лактона с его последующим неэнзиматическим гидролизом до D-глюконовой кислоты

На рисунках 4 и 5 представлено изменение концентрации H_2O_2 в реакционной среде при различном содержании EDC/NHS и GOx в растворах, используемых для иммобилизации.

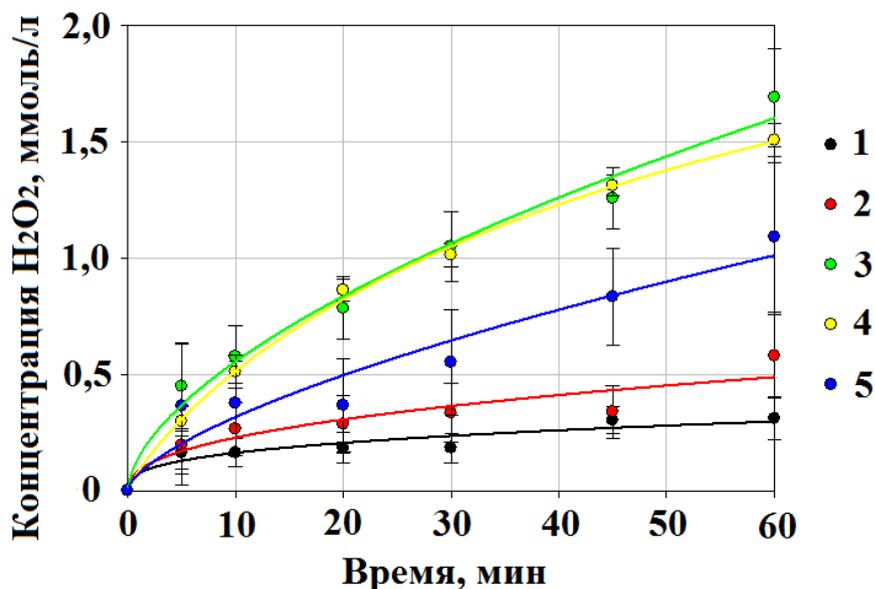


Рисунок 4 – Изменение концентрации H_2O_2 в реакционной смеси при различном содержании EDC/NHS (мг/мг) (на 0,3 г альгината и 25 мг GOx): 1 – 58/22; 2 – 116/44; 3 – 232/87; 4 – 348/141; 5 – 464/174 (pH = 6,0; t = 30°C)

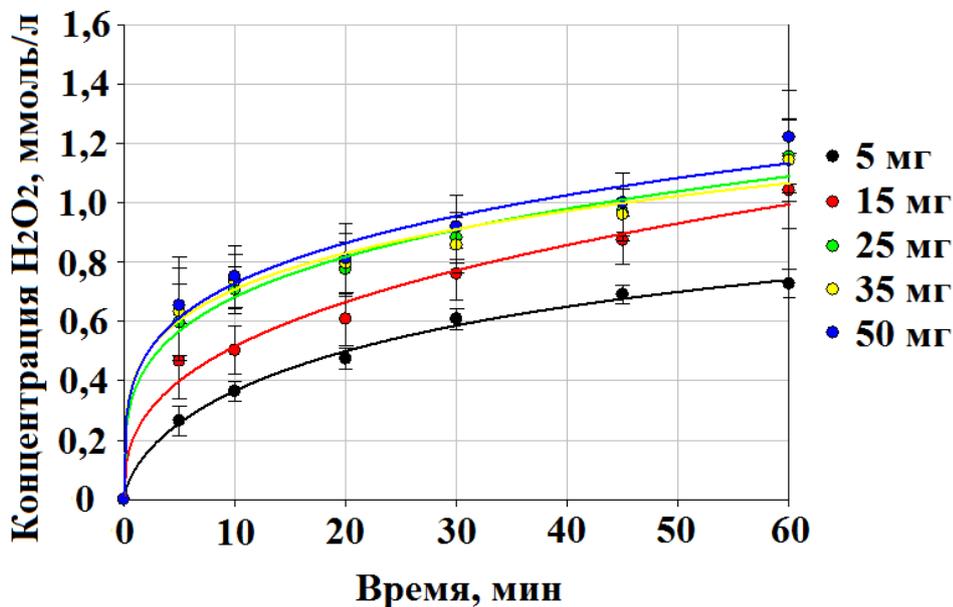


Рисунок 5 – Изменение концентрации H_2O_2 в реакционной смеси при различном содержании GOx (на 0,3 г альгината, 232 мг EDC и 87 мг NHS; pH = 6,0; t = 30°C)

Как видно из представленных данных, увеличение содержания EDC выше 232 мг и NHS выше 87 мг на 0,3 г альгината нецелесообразно, так как при этом происходит снижение концентрации образующегося пероксида водорода. Увеличение содержания GOx выше 25 мг не приводит к дальнейшему увеличению

эффективности процесса в связи с ограниченной емкостью носителя по ферменту. Поэтому для дальнейших экспериментов был выбран биокатализатор, синтезированный с помощью следующего соотношения компонентов: 0,3 г альгината натрия; 232 мг EDC; 87 мг NHS; 25 мг GOx.

Изучение промежуточных форм биокатализатора методом инфракрасной Фурье-спектроскопии (рисунок 6) показало, что в спектре исходных альгинатных микросфер обнаружены полосы поглощения валентных колебаний O–H и C–H ($4000-2700\text{ см}^{-1}$), интенсивные полосы $1605-1608$ и $1412-1413\text{ см}^{-1}$, обусловленные асимметричными и симметричными валентными колебаниями карбоксильной группы и полосы валентных колебаний пиранозного кольца 809 см^{-1} .

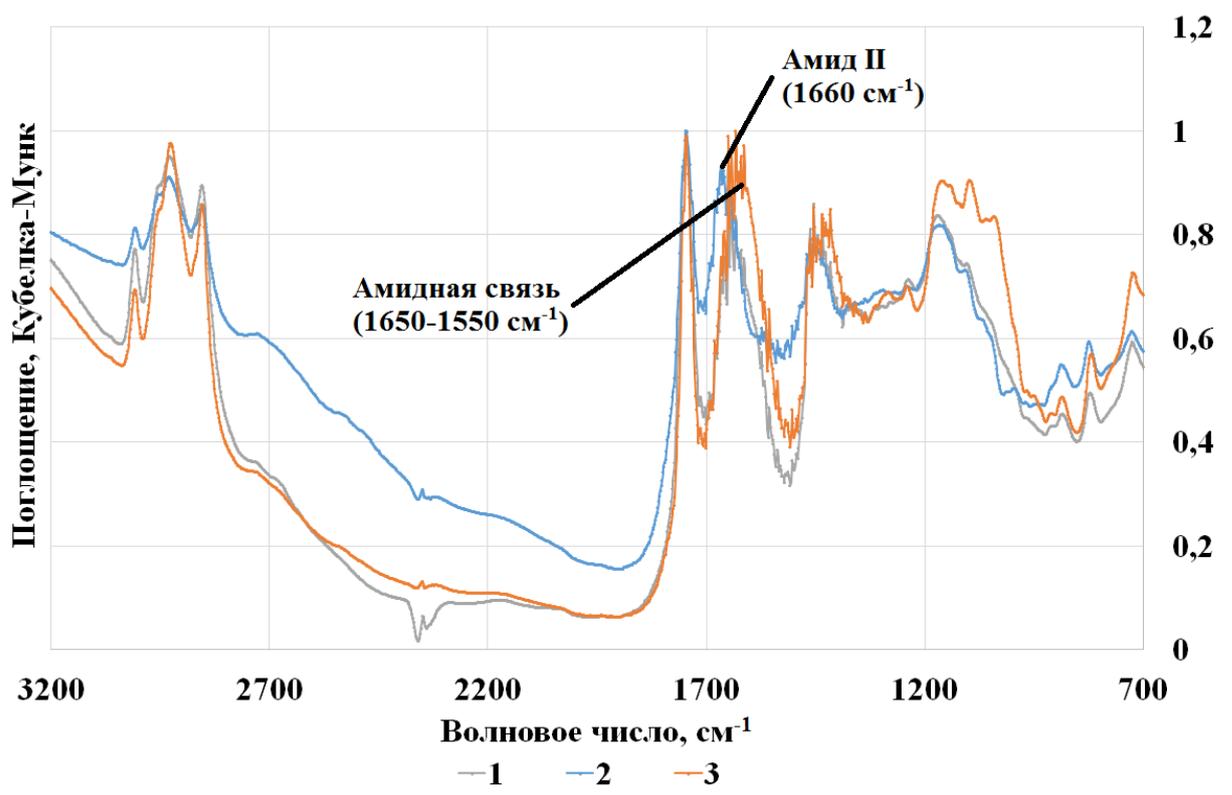


Рисунок 6 – Инфракрасные Фурье-спектры промежуточных форм биокатализатора: 1 – альгинатные микросферы; 2 – альгинатные микросферы, активированные EDC и NHS; 3 – imGOx

В спектре альгинатных микросфер, активированных EDC и NHS, выявлена полоса поглощения эфира N-ацилмочевины (полоса Амид II) (1660 см^{-1}), которая отсутствует в предыдущем спектре, что свидетельствует об эффективной активации свободных карбоксильных групп альгината. В спектре синтезированного биокатализатора выявлены полосы поглощения амидной связи – $1650-1550\text{ см}^{-1}$, что подтверждает образование ковалентной связи между активированными карбоксильными группами альгината натрия с аминогруппами GOx.

Следующим этапом работы стало изучение кинетики реакций в присутствии imGOx. Для определения кинетических параметров проводили окисление D-глюкозы кислородом воздуха при варьировании начальной концентрации D-глюкозы от 2,2 до 22 ммоль/л. Для исключения внешнедиффузионного торможения реакции проводилась при интенсивности перемешивания 300 мин^{-1} . В ходе реакции

определялось количество образующегося H_2O_2 по йодометрическому методу (Тихонов, 2021). Зависимости концентрации H_2O_2 от времени реакции при варьировании начальной концентрации D-глюкозы представлены на рисунке 7 для GOx (а) и imGOx (б).

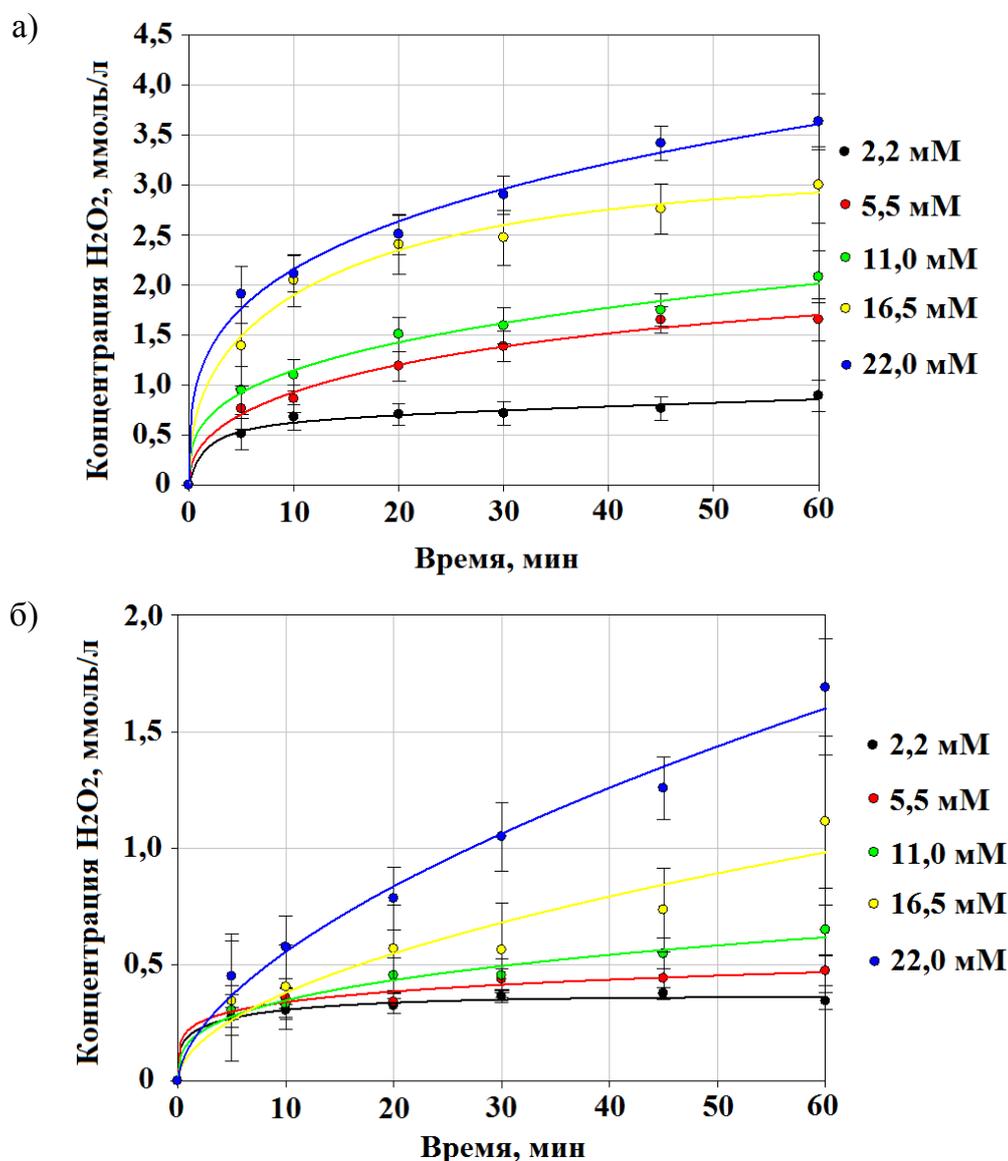


Рисунок 7 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для GOx (25 мг) (а) и imGOx (б) ($\text{pH} = 6,0$; $t = 30^\circ\text{C}$)

По полученным данным были рассчитаны кинетические параметры GOx и imGOx (активность A , предельная скорость реакции V_m и константа Михаэлиса K_M), приведенные в таблице 2.

Таблица 2 – Кинетические параметры исследуемых биокатализаторов

Биокатализатор	A (ед.ак. $\cdot 10^3$)	K_M , ммоль/л	V_m , ммоль/л \cdot мин
GOx	$5,46 \pm 1,39$	$5,41 \pm 1,38$	$0,34 \pm 0,09$
imGOx	$3,25 \pm 0,83$	$11,43 \pm 2,91$	$0,20 \pm 0,05$

Из представленных данных видно, что imGOx обладает несколько меньшей активностью (около 60%), по сравнению со свободной формой фермента (GOx). Константа Михаэлиса для imGOx немного выше, а предельная скорость реакции – ниже, что связано с уменьшением сродства фермента к субстрату, а также затруднением доступа субстрата к активным центрам фермента. Однако иммобилизация позволяет повысить устойчивость фермента к ингибирующим воздействиям, а также, при необходимости, легко отделить биокатализатор от реакционной среды и использовать его повторно.

Известно, что на активность нативных и иммобилизованных ферментов существенное влияние оказывают значение pH реакционной среды и температура (Renneberg, 2017). На рисунке 8 представлены зависимости значений относительной активности нативного и иммобилизованного фермента в определенном диапазоне pH и температуры. Относительная активность GOx максимальна при pH 6,0-6,1 и при $t = 30^{\circ}\text{C}$, а при значениях выше и ниже указанных она резко снижается. Для imGOx относительная активность выше, чем для нативного фермента: при pH 3,6-3,7 – на 21,7%, при pH 8,6-8,7 – на 6,0 %, при pH 12,0-12,1 – на 19,9%; при 30-60 $^{\circ}\text{C}$ – на 4,0-45,0 %. Таким образом, иммобилизация на альгинатных микросферах расширила рабочий диапазон pH и температуры фермента по сравнению с растворимой формой, что свидетельствует о более высокой устойчивости синтезированного биокатализатора, позволяющей использовать его в прикладных биотехнологических процессах.

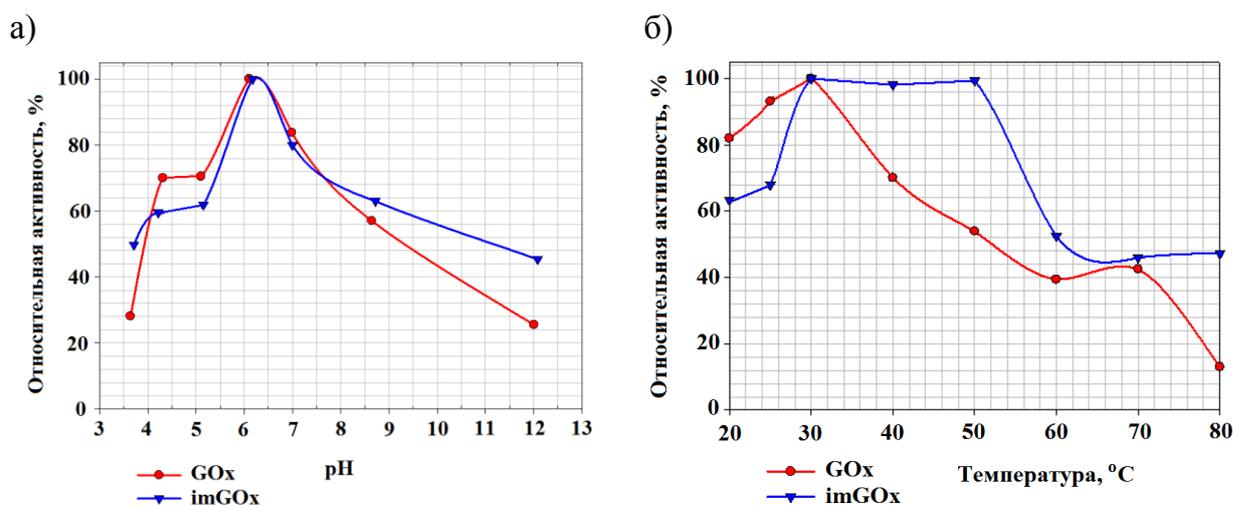


Рисунок 8 – Зависимость относительной активности GOx и imGOx от значений pH реакционной среды (а) и температуры (б)

Иммобилизованные ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности. imGOx может быть использован для определения концентрации D-глюкозы в биологических жидкостях (в том числе - в составе биосенсоров), для получения D-глюконовой кислоты, а также в пищевой промышленности.

В работе была проведена оценка эффективности использования синтезированного imGOx в хлебопечении в качестве технологической добавки. Входящие в состав imGOx альгинат натрия и глюкозооксидаза из *Aspergillus niger* являются безопасными и разрешенными для употребления в пищу компонентами технологических добавок, в соответствии с требованиями ТР ТС 029/2011 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических

вспомогательных средств». EDC и NHS не обладают токсическим действием на организм человека (согласно паспортам безопасности), не входят в перечень запрещенных для употребления в пищу веществ и успешно применяются в многочисленных системах доставки лекарств. Кроме того, в соответствии со схемой иммобилизации (рисунок 2), они используются для активации карбоксильных групп альгината и удаляются из системы промывкой дистиллированной водой.

Для оценки влияния imGOx на свойства хлебобулочных изделий биокатализатор во влажном виде добавлялся при замешивании теста и проводилась пробная выпечка традиционного белого хлеба. Оценивались основные органолептические показатели изделия (внешний вид, состояние мякиша, вкус) и изменения в его свойствах. Качество сырой клейковины замешиваемого теста определялось с помощью измерителя деформации клейковины ИДК-3М («Плаун», Россия). При использовании фермента, иммобилизованного на альгинатных микрочастицах, качество клейковины улучшилось на 5-10%, по сравнению с образцами без GOx. В пробной выпечке наилучший результат был достигнут при добавлении 25 мг imGOx на 225 г муки, при этом хлеб стал более пористым, с мелкими равномерными порами, выраженным сладковатым привкусом, его мякиш не крошится и не липнет к ножу при нарезке, корка хрустящая и прочная, участки непромеса отсутствуют. Таким образом, внесение иммобилизованной на биополимерных частицах глюкозооксидазы в тесто позволяет улучшить качество хлебобулочных изделий, что обусловлено окислением пероксидом водорода, образующимся в результате каталитической реакции, свободных сульфгидрильных групп в структуре клейковинных белков с последующим образованием дисульфидных связей, что согласуется с работами авторов (Tang, 2014; Miguel, 2012; Kouassi-Koffi, 2014).

С целью оценки изменений в свойствах imGOx, происходящих в процессе выпечки хлебобулочных изделий, проводился термогравиметрический анализ. На рисунке 9 приведены термогравиметрические кривые для образца биокатализатора, нагретого до 100 °С в инертной среде аргона (а), и для образца, нагретого в окислительной среде аргон-кислород, до 200 °С (б). Как показали исследования, при нагревании образцов до 100 °С происходит дегидратация образцов с соответствующей потерей массы, что связано с существенным снижением водосвязывающей способности альгината и фермента. При нагреве до температуры более 140 °С происходит разрыв связей в полимерных цепях полисахарида и фермента и дегидратация, обусловленная термической конденсацией соседних гидроксильных групп звеньев. Интенсивность окраски образца, нагретого до 200 °С, существенно выше, что свидетельствует о достаточно большом количестве продуктов реакций карамелизации и меланоидинообразования. Данные типы реакций характерны и для процесса выпечки традиционных хлебобулочных изделий и определяют вкус и аромат готовой продукции.

Изучение устойчивости синтезированного биокатализатора при хранении в течение 1 и 2 месяцев показало, что наиболее эффективно хранение отфильтрованного биокатализатора в высушенном на воздухе виде в холодильнике при +2-+4°С, что позволяет сохранить более 70% от исходной активности к истечению 1 месяца хранения и более 60% от исходной активности к истечению 2 месяцев хранения.

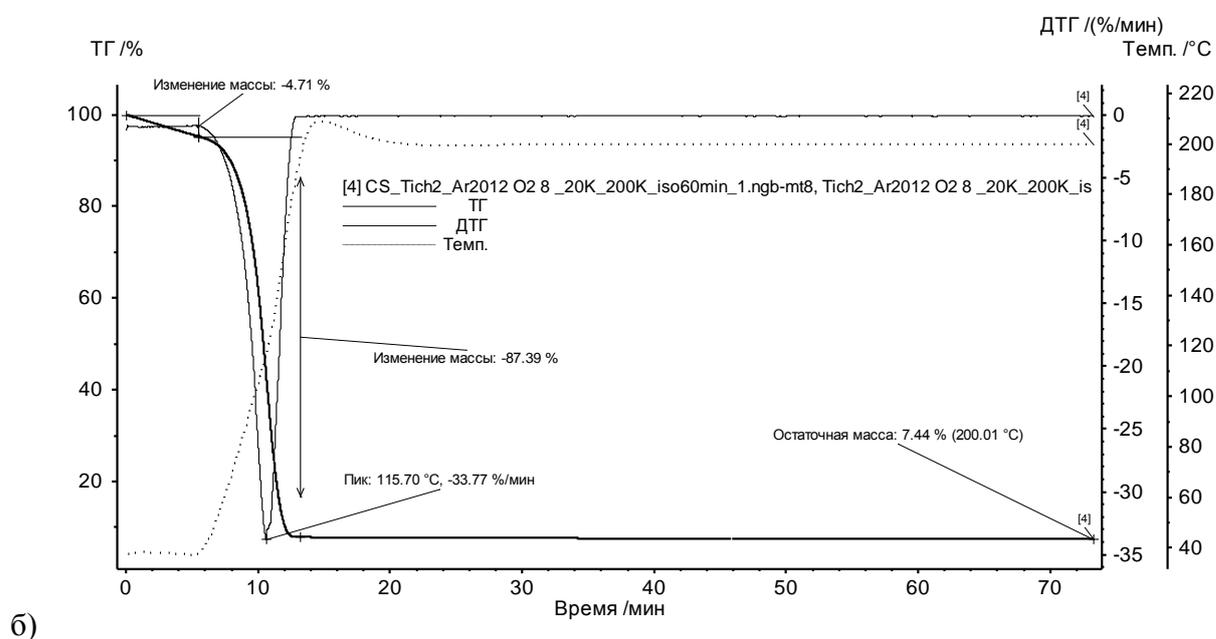
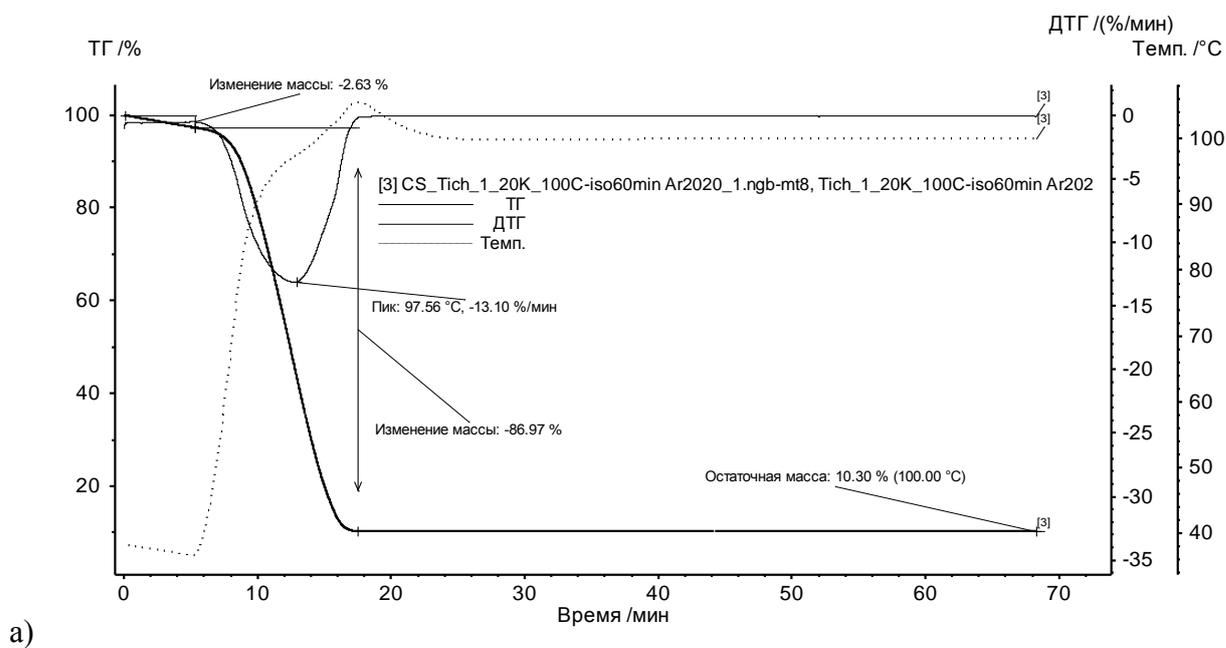


Рисунок 9 – Термогравиметрические кривые для образцов imGOx, нагретого до 100 °С в инертной среде аргона (а), и нагретого до температуры 200 °С в окислительной среде аргон-кислород (б)

ВЫВОДЫ

На основании проведенной исследовательской работы можно сделать следующие выводы:

1) Теоретически обоснован выбор альгинатных микрофер в качестве эффективного носителя для иммобилизации GOx. Благодаря биосовместимости, нетоксичности и возможности регулировать свойства биополимерной матрицы, они широко используются в различных отраслях биотехнологии. Оптимальными для иммобилизации ферментов характеристиками обладают альгинатные микрофер, получаемые методом ЭВГ.

2) Разработана методика синтеза альгинатных микросфер методом ЭВГ и экспериментально определены условия и состав компонентов, обеспечивающие наиболее эффективный синтез микрочастиц с заданными характеристиками. Наиболее подходящие для дальнейшей иммобилизации ферментов по морфологическим и размерным характеристикам микрочастицы были синтезированы с использованием 1,5% альгината натрия (99,6% частиц диаметром менее 200 мкм со средним диаметром 53,6 мкм).

3) Синтезирован новый гетерогенный биокатализатор на основе глюкозооксидазы посредством ее ковалентной иммобилизации на поверхности альгинатных микросфер, полученных методом ЭВГ. Для обеспечения активации карбоксильных групп поверхность биополимерного носителя была предварительно активирована с помощью функциональных реагентов: карбодиимида и N-гидроксисукцинимидом. Прочная сшивка фермента с носителем происходила за счет образования амидной связи, наличие которой было доказано с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии. Были подобраны соотношения компонентов биокатализатора, обеспечивающих его наибольшую активность.

4) Изучение частиц с помощью методов оптической микроскопии показало, что альгинатные микросферы имеют структуру биополимерной матрицы, характерную для гелевых частиц, получаемых внутренним гелеобразованием. Определена активность синтезированного биокатализатора в реакции окисления глюкозооксидазой β -D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Рассчитаны кинетические параметры GOx ($A = 5,46 \cdot 10^{-3}$ ед. ак; $K_M = 5,41$ ммоль/л; $V_m = 0,34$ ммоль/л·мин) и imGOx ($A = 3,25 \cdot 10^{-3}$ ед. ак; $K_M = 11,43$ ммоль/л; $V_m = 0,20$ ммоль/л·мин). Активность imGOx примерно на 40% ниже активности GOx, что связано с уменьшением сродства фермента к субстрату, а также затруднением доступа субстрата к активным центрам фермента. Однако иммобилизация позволяет легко отделить биокатализатор от реакционной среды и использовать его повторно.

5) Результаты исследования стабильности биокатализатора продемонстрировали, что иммобилизация глюкозооксидазы на альгинатных микросферах расширила рабочие диапазоны pH и температуры для фермента. Относительная активность иммобилизованной формы энзима выше, чем у нативной, на 5-22% при различных значениях pH, а в температурном диапазоне 30-60 °C на 4-45 %. Также иммобилизация на биополимерных частицах повысила устойчивость глюкозооксидазы к ингибирующему воздействию субстрата и продуктов реакции.

6) Пробная выпечка с использованием синтезированного биокатализатора в качестве добавки к тесту показала, что добавление биокатализатора (25-50 мг на 225 г муки) при замесе благоприятно отражается на хлебопекарных свойствах муки и органолептических показателях готового хлебобулочного изделия, способствуя укреплению клейковины и образованию мякиша с улучшенными структурными свойствами.

7) Хранение отфильтрованного биокатализатора в высушенном виде в холодильнике при +2...+4°C позволяет сохранить более 70% от исходной активности к истечению 1 месяца хранения и более 60% от исходной активности к истечению 2 месяцев хранения, в то время лиофильное высушивание и хранение в морозильной камере нецелесообразно, так как приводит к существенному

снижению ферментативной активности вследствие повреждения биополимерной матрицы и денатурации фермента.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ 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. **Stadolnikova, P. Yu.** Immobilization of glucose oxidase on sodium alginate microspheres / **P. Yu. Stadolnikova**, B. B. Tikhonov, E. A. Prutenskaya, A. I. Sidorov, M. G. Sulman // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2023. - Vol. 59, №1. - P. 68–75.

2. 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.

3. Matveeva, V.G. Water treatment from phenol derivatives by the oxidoreductases immobilized on alginate microspheres / V.G. Matveeva, B.B. Tikhonov, **P.Y. Stadolnikova**, A.I. Sidorov, O.V. Grebennikova, E.M. Sulman, V.I. Panfilov // Chemical Engineering Transactions. - 2020. – Vol. 81. - P. 787-792.

4. Тихонов, Б.Б. Определение активности глюкозооксидазы спектрофотометрическим методом / Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. - 2021. - № 2 (44). – С. 18-25.

5. Тихонов, Б.Б. Влияние способов извлечения на биокаталитическую активность пероксидазы хрена // Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, Э.М. Сульман // Научно-технический вестник Поволжья. - 2018. - № 11. - С. 72-74.

6. Тихонов, Б.Б. Оптимизация состава и условий функционирования мультиферментной системы на основе оксидоредуктаз // Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, Э.М. Сульман // Научно-технический вестник Поволжья. - 2018. - № 5. - С. 62-65.

7. Тихонов, Б.Б. Исследование свойств мультиферментных систем на основе оксидоредуктаз / Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, Н.В. Лакина // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. - 2015. - № 4. - С. 84-90.

8. Тихонов, Б.Б. Исследование свойств мультиферментных систем на основе пероксидазы хрена и глюкозооксидазы / Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, **П.Ю. Стадольникова**, О.В. Матвеева, Н.В. Лакина // Научно-технический вестник Поволжья. - 2015. - № 5. - С. 85-87.

В. Публикации в других изданиях

9. **Стадольникова, П.Ю.** Имобилизованные формы глюкозооксидазы для использования в хлебопечении / **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, Б.Б. Тихонов, М.Г. Сульман // Актуальная биотехнология. - 2022. - № 1. - С. 49-50.

10. Матвеева, В.Г. Гетерогенные катализаторы окисления органических соединений на основе иммобилизованных на альгинатных микросферах оксидоредуктаз / В.Г. Матвеева, **П.Ю. Стадольникова**, Б.Б. Тихонов, А.И.

Сидоров, М.Г. Сульман В книге: Роскатализ. Сборник тезисов. Институт катализа СО РАН. - 2021. - С. 116-117.

11. Тихонов, Б.Б. Кинетические закономерности деятельности биферментных систем на основе оксидоредуктаз // Тихонов Б.Б., **Стадольникова П.Ю.**, Сидоров А.И. // В сборнике: Химическая термодинамика и кинетика. Сборник материалов одиннадцатой международной научной конференции. Великий Новгород. - 2021. - С. 250-251.

12. **Стадольникова, П.Ю.** Влияние концентрации альгината натрия на морфологию микрочастиц, полученных методом внутреннего гелеобразования / **П.Ю. Стадольникова**, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман // Актуальная биотехнология. - 2021. - № 1 (35). - С. 315-318.

13. Тихонов, Б.Б. Кинетические закономерности окисления D-глюкозы, иммобилизованной на биополимерных микросферах глюкозооксидазой / Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров // В книге: Химическая термодинамика и кинетика. Сборник материалов десятой международной научной конференции. Великий Новгород. - 2020. - С. 222-223.

14. Тихонов, Б.Б. Улучшение хлебопекарных свойств муки с помощью ферментных препаратов / Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров // В сборнике: Качество и экологическая безопасность пищевых продуктов и производств. материалы международной научно-практической конференции с элементами научной школы для молодежи. – Тверь. - 2020. - С. 49-53.

15. Тихонов, Б.Б. Новый хлебопекарный улучшитель на основе иммобилизованной на биополимерах глюкозооксидазы / Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман // В сборнике: Пища. Экология. Качество. труды XVII Международной научно-практической конференции. Екатеринбург. - 2020. - С. 641-645.

16. Тихонов, Б.Б. Биотехнологические аспекты иммобилизации глюкозооксидазы на природных полимерах / Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева, М.Г. Сульман // Актуальная биотехнология. - 2020. - № 3 (34). - С. 633-636.

17. Тихонов, Б.Б. Метод определения активности глюкозооксидазы / Б.Б. Тихонов, **П.Ю. Стадольникова**, А.И. Сидоров, Э.М. Сульман // В сборнике: девятая международная научная конференция "Химическая термодинамика и кинетика". Сборник научных трудов. 2019. С. 336-337.

18. **Стадольникова, П.Ю.** Разработка новых форм биополимерных носителей для иммобилизации ферментов / **П.Ю. Стадольникова**, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров // Актуальная биотехнология. - 2019. - № 3 (30). - С. 33-36.

19. **Стадольникова, П.Ю.** Иммобилизация оксидоредуктаз на наночастицах природных полимеров / **П.Ю. Стадольникова**, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, Э.М. Сульман // Актуальная биотехнология. - 2018. - № 3 (26). - С. 182-185.