

ТВЕРСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

**Голикова Екатерина Павловна**

**Синтез стабильных биокатализаторов на  
основе глюкозооксидазы, иммобилизованной  
на неорганические носители**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

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

Научный руководитель  
д.х.н., профессор Матвеева В.Г.

**Тверь – 2019**

## УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

ГЛ – D-глюкоза

ГК – D-глюконовая кислота

GOx – глюкозооксидаза

APTES – 3-аминопропилтриоксисилан

TEOS - тетраэтоксисилан

GA – глутаровый альдегид

МНЧ – магнитные наночастицы

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА ПЕРВАЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Способы окисления D-глюкозы .....	12
1.1.1. Химический способ окисления D-глюкозы .....	15
1.1.2. Электрохимический способ окисления D-глюкозы.....	18
1.1.3. Каталитический способ окисления D-глюкозы.....	21
1.1.4. Ферментативный способ окисления D-глюкозы.....	23
1.2. Характеристика глюкозооксидазы.....	24
1.2.1. Строение глюкозооксидазы .....	25
1.2.2. Механизм действия глюкозооксидазы.....	27
1.2.3. Стабильность глюкозооксидазы.....	29
1.2.4. Ингибиторы глюкозооксидазы.....	30
1.3. Методы иммобилизации глюкозооксидазы .....	31
1.4. Биокаталитическое окисление D-глюкозы .....	34
1.5. Способы синтеза магнитных наночастиц .....	39
1.5.1. Метод синтеза МНЧ – соосаждение.....	40
1.5.2. Золь–гельный метод синтеза МНЧ.....	41
1.5.3. Полиольный метод получения МНЧ.....	42
1.5.4. Гидротермальный метод получения МНЧ .....	44
1.6. Применение глюконовой кислоты .....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ .....	47
ГЛАВА ВТОРАЯ. МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ.....	49
2.1. Реактивы.....	49
2.2. Методика получения биокатализатора на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на оксид алюминия и на диоксид кремния .....	50
2.3. Методика получения биокатализатора на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитные наночастицы.....	51

2.3.1. Методика синтеза магнетита.....	51
2.3.2. Модификация поверхности наночастиц магнетита.....	54
2.3.3. Иммобилизация глюкозооксидазы на магнитные наночастицы.....	56
2.4. Методика окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты .....	56
2.4.1. Методика окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов на основе диоксида кремния и оксида алюминия .....	57
2.4.2. Методика окисления D-глюкозы в присутствии магнитоотделяемых биокатализаторов .....	58
2.5. Методика анализа реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	59
2.6. Методика расчета кинетических параметров.....	60
2.7. Физико-химические методы исследования образцов биокатализаторов..	62
2.7.1. Методика измерения намагниченности.....	62
2.7.2. Исследование образцов биокатализаторов методом инфракрасной спектроскопии .....	64
2.7.3. Исследование поверхности биокатализаторов методом низкотемпературной адсорбции азота .....	65
2.7.4. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия образцов биокатализаторов .....	68
2.7.5. Просвечивающая электронная микроскопия образцов биокатализаторов	71
2.7.6. Сканирующая электронная микроскопия образцов биокатализаторов ..	71
ГЛАВА ТРЕТЬЯ. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	72
3.1. Результаты физико-химического исследования носителей и биокатализаторов на основе Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	72
3.1.1. Данные просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей микроскопии образцов Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	72
3.1.2. Данные просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии образцов Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> после модификации TEOS и APTES .....	74

3.1.3. Данные энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS) биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	76
3.2. Анализ кривых намагничивания исходных носителей и биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	77
3.3. ИК-Фурье спектроскопия биокатализаторов .....	80
3.3.1. ИК - Фурье спектроскопия биокатализаторов на основе $\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{SiO}_2$ .....	80
3.3.2. ИК-Фурье спектроскопия биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	84
3.4. Анализ поверхности биокатализаторов методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии .....	91
3.4.1. Анализ поверхности биокатализаторов на основе $\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{SiO}_2$ методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии .....	91
3.4.2. Анализ поверхности биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$ методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии .....	99
3.5. Характеристика поверхности биокатализаторов методом низкотемпературной адсорбции азота .....	105
3.5.1. Характеристика поверхности биокатализаторов на основе $\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{SiO}_2$ методом низкотемпературной адсорбции азота .....	105
3.5.2. Характеристика поверхности биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$ синтезированных способом соосаждения, методом низкотемпературной адсорбции азота .....	114
3.5.3. Характеристика поверхности биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ синтезированных полиольным способом, методом низкотемпературной адсорбции азота .....	118
3.6. Анализ активности биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы. Подбор оптимальных условий окисления .....	123
3.6.1. Анализ влияния массы субстрата на выход ГК в процессе окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов .....	123
3.6.2. Анализ влияния температуры на выход ГК в процессе окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов .....	126

3.6.3. Определение оптимального времени окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов .....	128
3.6.4. Анализ влияния pH на выход ГК в процессе окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов.....	130
3.6.5. Сравнение активности биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы .....	133
3.6.6. Анализ стабильности биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы .....	134
3.7. Определение кинетических параметров .....	136
3.8. Корреляция каталитической активности и физико-химических характеристик синтезированных биокатализаторов .....	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145

## ВВЕДЕНИЕ

В современной биотехнологии одну из ключевых позиций занимают ферменты. Высокая каталитическая активность в «мягких» условиях, уникальная специфичность и стереоспецифичность ферментов позволяют создавать на их основе эффективные и перспективные технологические процессы. Использование ферментов в нативной форме сопряжено с такими трудностями как инактивация под действием физических и химических факторов, а также с невозможностью повторного использования. Наиболее распространенным способом стабилизации является иммобилизация на гетерогенный носитель, сущность которой состоит в присоединении исходного фермента к подложке, осуществляемое адсорбционно, через химическую связь или путем механического включения фермента в гель, капсулу и т.п. Природа носителя, его структура, наличие функциональных групп, высокая химическая и биологическая стойкость имеют большое значение для иммобилизации ферментов.

За последнее десятилетие отмечен значительный рост внимания со стороны исследователей к магнитным наночастицам (МНЧ) и материалам на их основе. Важной и актуальной областью применения магнитных материалов, которая в последнее время привлекает всё больше внимания исследователей, является разработка магнитоотделяемых биокатализаторов. В этом случае МНЧ подвергаются функционализации и служат подложкой для формирования каталитических комплексов. Подобные МНЧ обладают уникальными свойствами за счёт большой площади поверхности. Активные центры, сформированные на поверхности таких каталитических систем, сочетают достоинства ферментативных (селективность, активность) и гетерогенных/магнитоотделяемых (легкость отделения и возможность модификации) катализаторов. В зависимости от характеристик фермента, носителя, модификатора можно варьировать каталитические свойства таких систем.

Иммобилизованные ферменты в настоящее время широко используются в синтезе различных лекарственных препаратов в мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов. Одним из наиболее широко применяемых ферментов является глюкозооксидаза (GOx, EC 1.1.3.4, семейство оксигеназ, подкласс оксидоредуктаз), которая способна выступать в роли биокатализатора реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислот, применяемой в производстве лекарственных препаратов, пищевых добавок, чистящих средств и т.д.

#### Цель и задачи работы.

Целью работы является обоснование и проведение синтеза стабильных гетерогенных биокатализаторов (в том числе магнитоотделяемых) на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические носители, и экспериментальная оценка их структурной и каталитической активности.

Для достижения данной цели были решены следующие задачи:

- теоретическое исследование методов синтеза биокатализаторов на основе иммобилизованной глюкозооксидазы;
- изучение существующих методов синтеза наночастиц магнетита;
- подбор условий синтеза магнитоотделяемых носителей;
- выбор модифицирующих и сшивающих агентов для синтеза биокатализаторов как на основе МНЧ, так и на частицах  $Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ ;
- осуществление синтеза иммобилизованных биокатализаторов;
- определение структурных, поверхностных, магнитных и других физико-химических характеристик синтезированных биокатализаторов;
- определение оптимальных условий процесса окисления D-глюкозы на основе экспериментального исследования влияния температуры, pH и количества субстрата на каталитическую активность биокатализаторов;

- проведение экспериментального скрининга активности и стабильности полученных биокатализаторов в окислении D-глюкозы;
- расчет кинетических параметров процесса окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов;
- выявление корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления D-глюкозы;
- 

Научная новизна работы. В данной работе впервые изучена иммобилизация глюкозооксидазы за счет ковалентного связывания на модифицированной поверхности наночастиц магнетита, полученных полиольным методом и методом соосаждения. Подобраны оптимальные условия для иммобилизации глюкозооксидазы на магнитоотделяемые носители. Впервые проведено сравнение структуры биокатализаторов, синтезированных путем иммобилизации глюкозооксидазы на неорганические носители разной природы. Подробно изучены физико-химические характеристики синтезированных биокатализаторов и проведено тестирование их свойств в процессе окисления D-глюкозы. Выявлены корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления D-глюкозы. Подобраны оптимальные условия процесса окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии синтезированных биокатализаторов.

Практическая значимость работы. Биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические (в том числе магнитоотделяемые) носители, показали высокую активность и стабильность в процессе окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты, которая зарегистрирована в качестве пищевой добавки E574 как разрыхлитель и регулятор кислотности пищевых продуктов. Кроме того, глюконовая кислота является подкислителем, комплексообразователем, усиливает действие антиоксидантов. Наряду с пищевой промышленностью глюконовую кислоту

применяют в фармацевтической индустрии с целью синтеза важных препаратов: глюконатов натрия, кальция, железа, а также глюконо- $\delta$ -лактона.

Сформулированные в работе подходы к синтезу магнитоотделяемых биокатализаторов (важное преимущество которых – магнитное осаждение из реакционного раствора, что позволяет исключить стадии очистки продукта от катализатора в производственных процессах) могут быть использованы при создании других промышленно значимых биокатализаторов.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы представлены на конференциях: «Биоресурсы: сырье химической промышленности.» Фарадей Дискуссии (Лондон, 2017 г), 13-й Европейский конгресс по катализу (Флоренция, 2017 г), «Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической промышленности» VIII международная конференция российского химического общества имени Д.И. Менделеева, посвященная 85-летию со дня рождения П.Д. Саркисова (Москва, 2017 г.), 4-й Международный симпозиум по химии превращения и сохранения энергии (Албена, Болгария, 2018г), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни.» (Москва, 2018 г.), 2-ая Международная конференция по химической инженерии в охране окружающей среды (Мальта, 2018 г.), 18-ая Международная многодисциплинарная научная конференция (Албена, Болгария, 2018 г.), 23-й Международный конгресс по химическому инженерингу (Прага, 2018 г.), IX международная конференция Российского химического общества им. Д.И. Менделеева: Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов (Москва, 2018 г.), XII Конкурс проектов молодых ученых (Москва, 2018), XXIII Международная конференция по химическим реакторам (Гент, Бельгия, 2018).

Личный вклад автора. Была выполнена постановка цели и задач исследования, обобщены литературные данные. Автором были синтезированы магнитные наночастицы методом соосаждения, полиольным методом. Подобраны модифицирующие (тетраэтоксисилан и 3-аминопропилтритоксисилан) и сшивающий (глутаровый альдегид) агенты для

магнитных наночастиц. Непосредственно автором были получены биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на  $Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ ,  $Fe_3O_4$  и проведены научные эксперименты по определению активности синтезированных биокатализаторов и подбору оптимальных условий для процесса окисления D-глюкозы. Выполнен анализ полученных результатов экспериментов и обсуждены данные физико-химического анализа биокатализаторов: ИК-спектроскопии, рентгенофотоэлектронной спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, сканирующей микроскопии образцов, измерения намагниченности образцов, определения площади удельной поверхности и пористости образцов.

Публикации по теме диссертации. По теме работы опубликовано 17 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.

## ГЛАВА ПЕРВАЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Способы окисления D-глюкозы

В основе ряда современных методов получения ряда биологически активных соединений лежат реакции окисления моносахаридов. Моносахариды (монозы) — это бесцветные кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде и полярных органических растворителях, не способные гидролизоваться с образованием более простых молекул, сладкие на вкус, при нагревании разлагаются. В зависимости от вида функциональной группы моносахариды делятся на альдозы (содержащие альдегидную группу) и кетозы (содержащие кетонную группу). ГЛ ( $C_6H_{12}O_6$ ) относится к альдогексозам. ГЛ — это неразветвленный пентаоксиальдегид с шестью атомами углерода, т. е. альдогексоза [1, 2]. ГЛ представляет собой структурную единицу, из которой состоит крахмал, целлюлоза и гликоген, а также ее особую роль в биологических процессах, то окажется, что ГЛ наиболее распространенный и важный моносахарид в природе. ГЛ представляет собой белый мелкокристаллический порошок без запаха, сладкого вкуса. Удельное вращение от  $+52^{\circ}$  до  $+53^{\circ}$  (10% водный раствор).

Кислоты, образующиеся при окислении D-глюкозы, представлены на следующем рисунке 1.1.

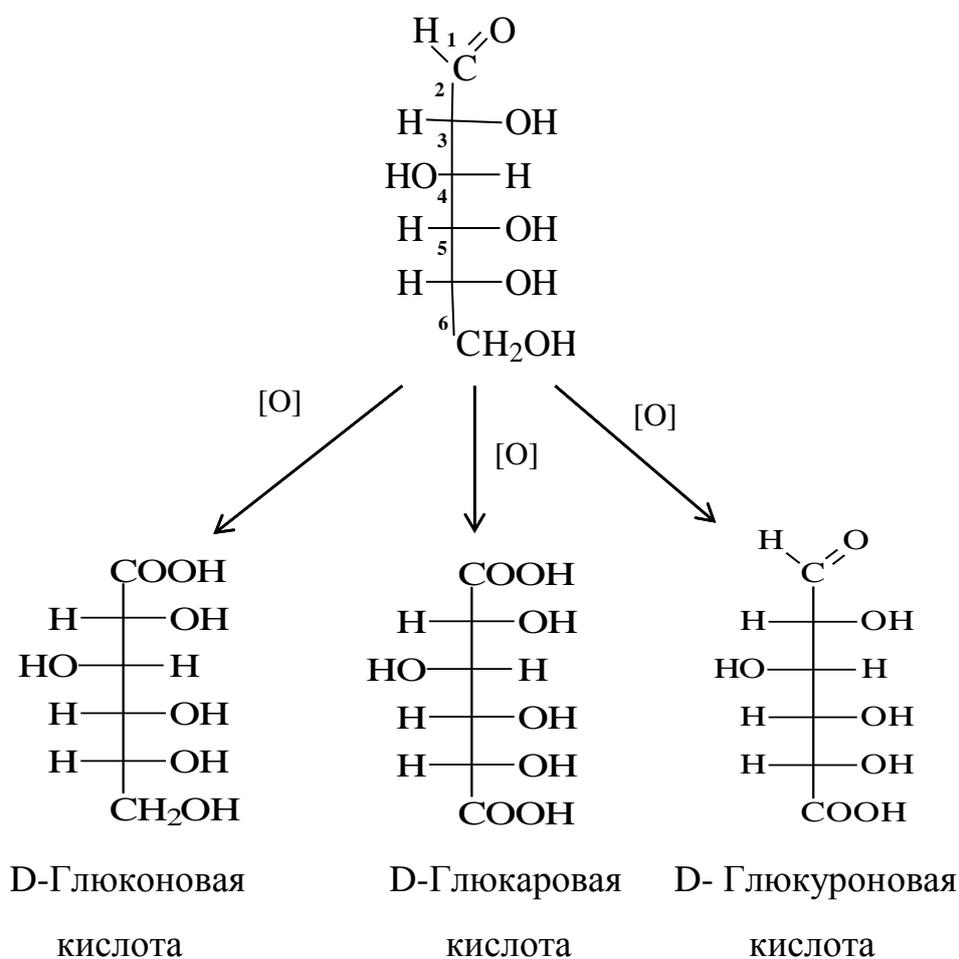


Рисунок 1.1. – Кислоты, образующиеся при окислении D-глюкозы

При окислении альдегидной группы у первого атома углерода (C<sub>1</sub>) ГЛ образуется D-глюконовая кислота (ГК), фосфорилированная форма, которая является промежуточным метаболитом превращения ГЛ по механизму пентозофосфатного пути. При действии более сильных реагентов окисляется две группы, и альдегидная (C<sub>1</sub>), и первичная спиртовая группа у последнего углеродного атома (C<sub>6</sub>) и образуются дикарбоновые, или альдаровые кислоты. Продуктами окисления D-глюкозы являются D-глюкарная (D-сахарная кислота).

Альдурановые кислоты образуются при окислении только первичной спиртовой группы у C<sub>6</sub>, а альдегидная группа остается неокисленной. В этом случае из ГЛ образуется D-глюкуроновая кислота. Глюкуроновые кислоты имеют большое биологическое значение. Так многие из них входят в состав

полисахаридов, а D-глюкуроновая кислота принимает участие в организме в обезвреживании билирубина и ряда ксенобиотиков, в том числе лекарственных веществ [3].

При окислении D-глюкозы могут образовываться побочные продукты, которые представлены на рисунке 1.2.

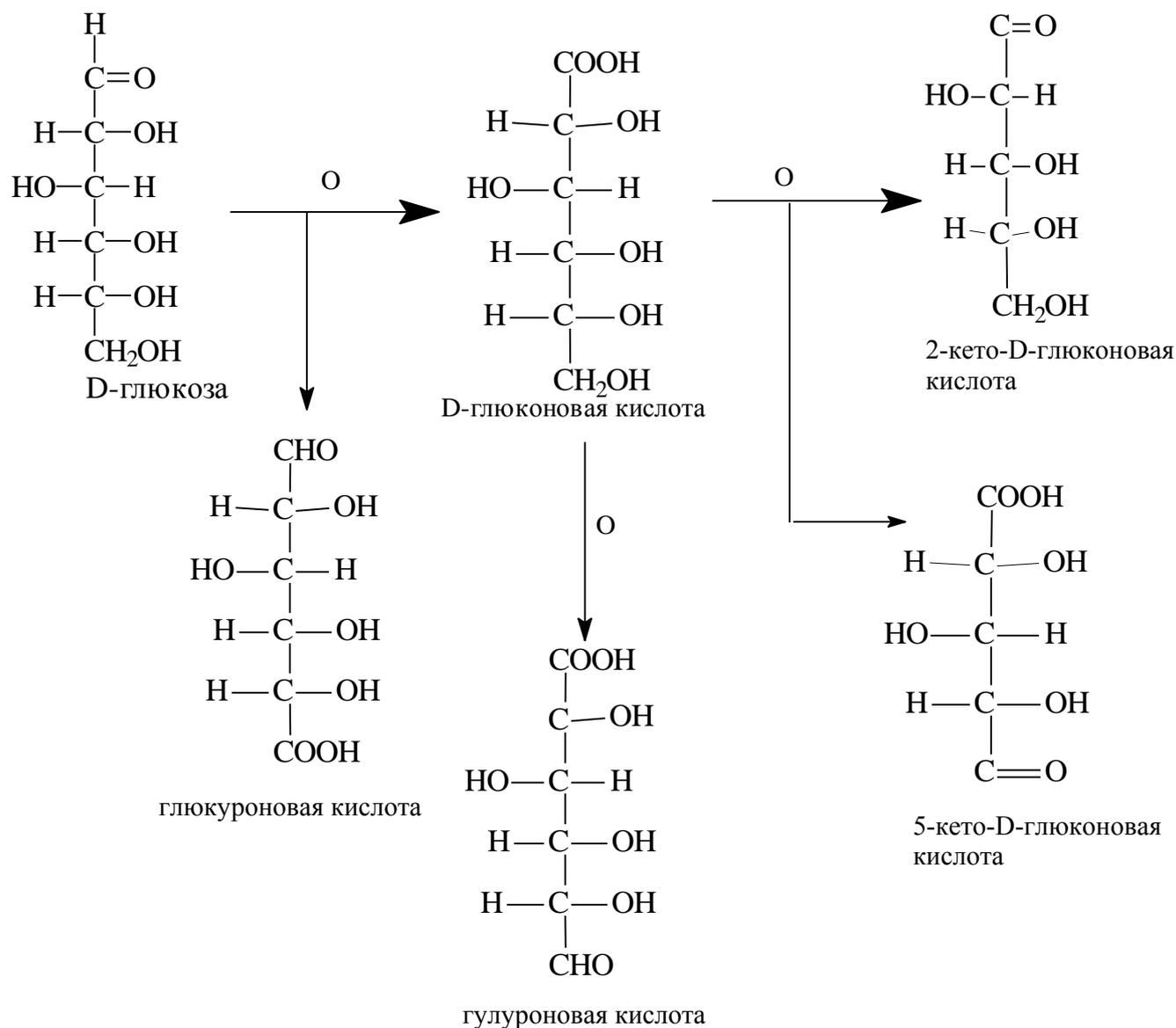


Рисунок 1.2. – Схемы продуктов образующиеся при окислении D-глюкозы

Из представленных схем реакций видно, что окисление ГЛ идет в различных термодинамически возможных направлениях с образованием большого числа продуктов. Поэтому очень важно рассмотреть закономерности

процесса окисления как основы селективного ведения реакции с целью получения определенного продукта.

Известно несколько методов окисления ГЛ: химический, электрохимический, каталитический, микробиологический. В настоящее время иммобилизованные ферментативные каталитические системы является приоритетным направлением в синтезе ГК.

#### 1.1.1. Химический способ окисления D-глюкозы

Химическое окисление ГЛ можно осуществить различными по силе окислителями.

К классическим способам относят химическое окисление ГЛ в мягких условиях слабыми окислителями, такими как:

- бромная вода
- реактив Толленса
- раствор Фелинга [4].

Бромная вода окисляет ГЛ, это кислый реагент и он не вызывает изомеризации молекулы. Поэтому бромная вода используют для синтеза ГК (монокарбоновой кислоты) из ГЛ [5].

Схема реакции химического окисления D-глюкоза до D-глюконовой кислоты с использованием бромной воды в качестве окисляющего агента представлены на рисунке 1.3.

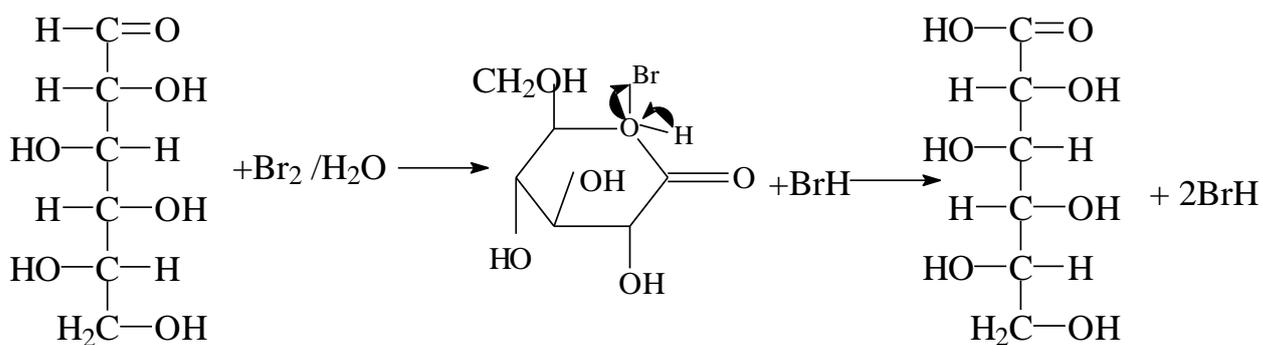


Рисунок 1.3. – Схема химического окисления D-глюкоза до D-глюконовой кислоты с использованием  $\text{Br}_2 + \text{H}_2\text{O}$

При окислении образуется не сама ГК, а соответствующий ей лактон. Далее происходит отщепление бромистого водорода.

Реактивы Толленса и Фелинга (фелингова жидкость) окисляют альдозы до ГК. Каждый из этих реактивов содержит катион металла. Окисление происходит в щелочной среде.

Реактив Толленса готовят, смешивая растворы едкого натра и нитрата серебра, в результате чего выпадает осадок оксида серебра.

При осторожном добавлении водного раствора аммиака осадок растворяется и образуется ион  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  (в осадок не выпадает). Добавление ГЛ к реактиву Толленса осаждает металлическое серебро, нередко в виде зеркального покрытия на стенках пробирки.

Схема реакции химического окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с использованием реактива Толленса в качестве окисляющего агента представлены на рисунке 1.4.

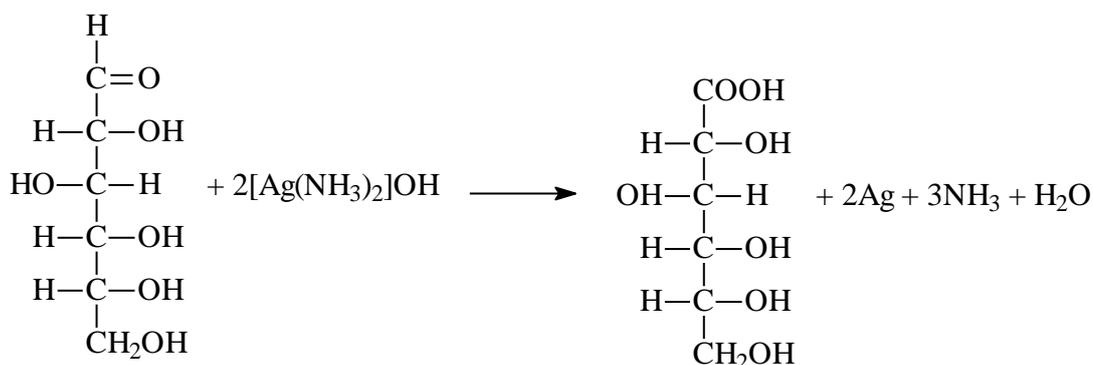


Рисунок 1.4. – Схема реакции химического окисления D-глюкоза до D-глюконовой кислоты с использованием реактива Толленса

Реактив Фелинга готовят, смешивая слабокислый раствор сульфата меди со щелочным раствором виннокислого калия-натрия (соль Рошеля). При нагревании раствора в присутствии ГЛ выпадает красный осадок  $\text{Cu}_2\text{O}$  [6].

Схема реакции химического окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с использованием реактива Фелинга в качестве окисляющего агента представлены на рисунке 1.5.

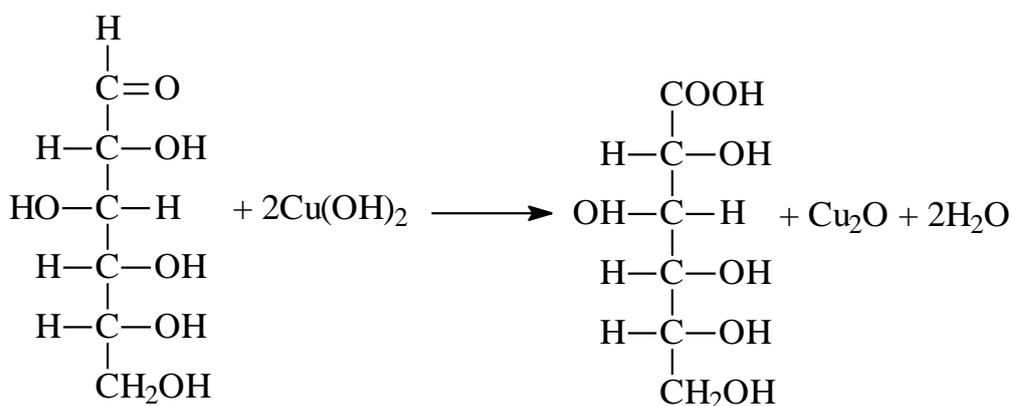


Рисунок 1.5. – Схема реакции химического окисления D-глюкоза до D-глюконовой кислоты с использованием реактива Фелинга

Современные способы химического окисления ГЛ происходят с использованием различных окисляющих агентов, содержащих такие ионы-

окислители, как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{O}_2^{2-}$ ,  $\text{Cl}^{5+}$ ,  $\text{Cl}^+$ ,  $\text{Br}^+$ ,  $\text{J}^{7+}$ ,  $\text{N}^{5+}$ ,  $\text{Mn}^{7+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ , а также молекулярный  $\text{Br}_2$  [7-10].

В работе [11] рассматривалось окисление D-глюкозы  $\text{Cu(II)}$  в ацетатном буфере при  $110^\circ\text{C}$  и  $\text{pH}$  4.0-5.0. Предложен возможный механизм окисления и показано, что окисляющим агентом в условиях данной реакции является  $\text{CuOAc}^+$ , присутствующий в растворе.

Авторами [12] подробно изучено окисление D-глюкозы до D-глюконовой кислоты персульфат-ионом в присутствии ионов  $\text{Mn(II)}$ . Процесс проводился в атмосфере азота при начальном  $\text{pH} = 7.0$  раствора ГЛ. Показано, что скорость окисления ГЛ персульфатом в присутствии  $\text{Mn(II)}$  возрастает с увеличением концентрации иона металла. По результатам физико-химического исследования сделан вывод об образовании реакционного комплекса  $\text{Mn(II)}$  с ГЛ и об изменении степени окисления  $\text{Mn}$  с +2 до +3, с последующим восстановлением марганца в ходе реакции. Исследуемая реакция используется в качестве модельной для получения привитых сополимеров целлюлозы и ее производных.

В целом химическое окисление моносахаридов, в том числе ГЛ, имеет следующие особенности:

- селективность процесса и выходы целевого продукта в большинстве случаев невелики, из-за образования побочных продуктов;
- всегда требуется специальное аппаратное оформление из антикоррозийных инертных материалов;
- использование большого количества окислителей неблагоприятно воздействует на окружающую среду.

### 1.1.2. Электрохимический способ окисления D-глюкозы

Электрохимические методы получения ГК широко используются в фармацевтической промышленности, металлургии, производстве строительных материалов и моющих средств, гальванотехнике, в качестве ингибиторов

коррозии. По сравнению с химическим окислением, электрохимический способ окисления D-глюкозы является более перспективным.

Авторами работы [13] изучался электрохимический способ окисления ГЛ до ГК. В методе используется медиаторная система с бромиды щелочных металлов, которые служат «переносчиком активного кислорода». Основной электродной реакцией является разряд ионов брома на аноде с образованием элементного брома, взаимодействие которого с щелочным водным раствором приводит к образованию гипобромита, окисляющего ГЛ в объеме электролита. При электролизе бромида кальция на аноде выделяется свободный бром, который окисляет ГЛ до ГК. Глюконовая и бромоводородная кислоты нейтрализуются карбонатом кальция.

Альтернативой этому способу может быть не прямое окисление органических субстратов на анодах из оксидов металлов с использованием активных форм кислорода, которые дополнительно генерируются из  $H_2O$ ,  $H_2O_2$  и  $O_2$ . Данный способ не использует соли брома, что делает его экологически более привлекательным.

Наибольшее применение нашли: инертные металлические электроды изготавливают из благородных металлов (Ru, Au, Pt, Ni, Ir и др.). Они служат переносчиками электронов от восстановленной формы к окисленной. Селективность процесса электрохимического окисления определяется приложенным потенциалом, природой электродов и модифицирующих добавок. Необходимо подчеркнуть, что металлы Pt-группы, используемые в качестве электродов, одновременно являются и катализаторами процесса электрохимического окисления [14-16].

Изучена [17] кинетика реакции электрокаталитического окисления D-глюкозы на монокристаллических платиновых электродах Pt(111), Pt(100). Установлено, что первый шаг реакции, включающий в себя окисление альдегидного атома водорода, связанного с  $C_1$  углеродным атомом, является определяющим для скорости реакции. Это касается обеих поверхностей: Pt(100) и Pt(111). В ходе реакции глюколактон образует сильные связи с

Pt(111), а СО - с Pt(100). Авторами работы [18] изучалось окисление D-глюкозы на платиновом электроде в 0.1 М растворе NaOH. Идентифицированы продукты реакции. Необходимо отметить, что в случае электроокисления процессы проводились в водных растворах как щелочей, так и кислот. Исследовано электрохимическое окисление D-глюкозы на Pt/WO<sub>3</sub> электроде в сернокислой среде [19]. Присутствие серной кислоты в таких реакциях способствует лактонизации продуктов реакции.

Развитие технологии металлоиммобилизованных полимеров позволило исследовать электрокаталитическое окисление моносахаридов с использованием электродов, покрытых металлосодержащими полимерами [20-22]. Было установлено, что частицы платины или осмия, диспергированные в полимерных пленках (полианилиновой, поливинилпиридиновой), проявляют лучшие электрокаталитические свойства, чем однородные металлы в электроокислении D-глюкозы в соответствующую кислоту в водных растворах. Частицы металлов, иммобилизованные в полимерных пленках, менее чувствительны к отравлению, чем однородные металлы. На каталитическую активность диспергированных частиц влияли путем модификации низкопотенциальными включениями Tl, Pb или Bi.

Поиск более экологичных и экономичных методов окисления органических веществ, в том числе ГЛ, с учетом низкой отходности и высокой селективности синтеза приобретает в настоящее время особую актуальность. Для решения этой задачи, возможно, использовать более дешевый по сравнению с платиной оксидно-рутениево-титановый анод в автоклаве без мембраны под давлением кислорода для электрохимического окисления ГЛ. Экспериментальные опыты проводились в автоклаве при избыточном давлении кислорода до 20 МПа. Давление в автоклаве регулировалось системой вентилей, редуктором и манометром.

При электрохимическом способе окисления ГЛ выход ГК составляет более 70% [23].

Таким образом, электрохимическое окисление моносахаридов в большинстве случаев следует рассматривать как электрокаталитическое. Однако, для селективного ведения процесса требуется специальное аппаратное оформление (вращающийся анод, электроды покрытые металлосодержащими полимерами и т.д.). Во избежание протекания побочных реакций на электродах предъявляются высокие требования к чистоте реактивов и сырья [7].

### 1.1.3. Каталитический способ окисления D-глюкозы

Гетерогенно-каталитический способ окисления ГЛ является достаточно перспективным по сравнению с остальными [24].

Применение данного способа позволяет:

- сократить количество промышленных отходов,
- не требует применения агрессивных окислительных агентов,
- при многократном использовании катализатора упрощает процесс его отделения от жидкой реакционной среды.

При этом окисление ГЛ кислородом воздуха в присутствии гетерогенных катализаторов является экологически безопасным процессом. Каталитическому окислению D-глюкозы с использованием моно- и биметаллических катализаторов на основе Pt, Pd, Bi, Au, Rh, Tl, Sn, Co посвящено значительное количество работ [25-33].

В 1953 г. группой под руководством Хейнса была начата исследовательская программа по изучению реакций окисления сахаров в присутствии благородных металлов в щелочной среде. Соотношение ГЛ : катализатор составляло 1:1 при использовании 5% Pt/C. Рабочая концентрация раствора D-глюкозы - 2%. Время реакции - 8 часов. В результате платиновый катализатор, приготовленный восстановлением платинохлористоводородной кислоты формальдегидом, был рекомендован как наиболее эффективный для

окисления ГЛ. Из-за несовершенного метода анализа содержание суммы образующихся кислот в ряде случаев превышало 100% [34].

В исследованиях [35] рассматривается способ окисления ГЛ с использованием катализаторов на основе Pt и Pd. Окисление ГЛ проводили в водном растворе при температуре 40<sup>0</sup>C при нормальном давлении воздуха, pH = 9.0 с использованием катализатора 5% Pt/C-Bi. В результате окисления ГЛ выход ГК не превышал 80%, а при применении катализатора 2% Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - 95%. О побочных продуктах реакции не сообщается.

Исследование [36], показало, что окисление ГЛ до ГК может происходить с высокой активностью и селективностью при использовании катализатора на основе Au на подложке из оксида алюминия. На рисунке 6 представлена реакция окисления ГЛ до ГК с использованием катализатора Au/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

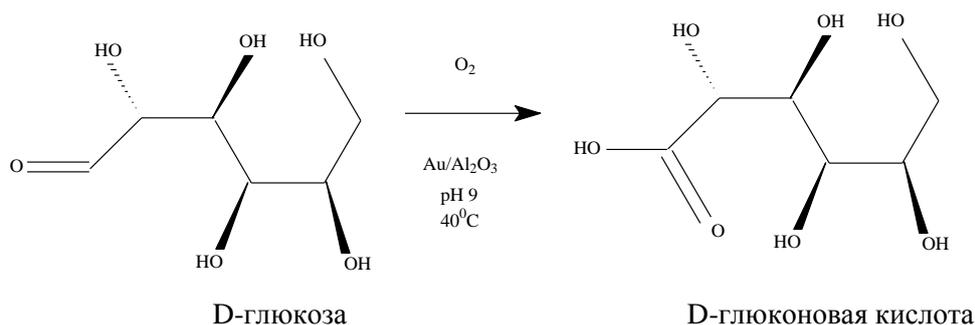


Рисунок 1.6. – Схема каталитического окисления D-глюкоза до D-глюконовой кислоты

Выход ГК при использовании Au/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> более 90%. Таким образом, катализатор продемонстрировал отличную стабильность.

В исследованиях [37] рассматриваются наночастицы золота (AuNPs), которые могут, ускоряют реакцию окисления ГЛ, до перекиси водорода и ГК.

По сравнению с Pd и Pt катализаторами системы Au/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> показали более высокую каталитическую активность и термостабильность в реакциях окисления ГЛ.

Единственное, что требует гетерогенно-каталитический способ окисления, - это создание активных, стабильных и селективных каталитических систем.

#### 1.1.4. Ферментативный способ окисления D-глюкозы

Наиболее мягко и с высокой селективностью моносахариды могут быть окислены ферментативным путем. Для этих целей используются различные штаммы микроорганизмов (например, *Gluconobacter spp.*, *Aspergillus niger*, *Tricholoma robustum* и *Tricholoma bakamatsutake*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Penicillium variable*, *Acetobacter methanolicus*, *Acetobacter diazotrophicus* и *Acetobacter suboxydans*) и выделенные из них ферменты [38-42]. В настоящее время активно исследуют способы ферментативного получения ГК.

Для получения ГК используются штаммы микроорганизмов (*Penicillium variable*, *Aspergillus niger*). Ферментативное окисление в промышленных масштабах осуществляют с использованием среды с высоким содержанием ГЛ (до 30–35 %), в составе сред фосфат калия, сульфат магния, кальций, азот.

Окисление ГЛ до ГК, реакцию катализирует глюкозооксидаза. Механизм ферментного окисления изучен с помощью меченой воды  $H_2O$  и кислорода  $O^{18}$ , при этом оказалось, что кислород, выделяющийся при разложении перекиси водорода под действием каталазы, не содержит  $O^{18}$ , т. е. глюкозооксидаза катализирует перенос водорода от ГЛ в газовой фазе, акцептором водорода служит газообразный кислород.[43,44]

Недостатками ферментативных методов являются то, что ферменты функционируют в большинстве случаев в водной среде, а большинство субстратов, плохо растворимы в воде. Поэтому в процессах приходится использовать растворы с низкой концентрацией, что приводит к снижению выхода целевого продукта.

Очистка и выделение ферментов – очень трудоемкая и дорогая процедура, поэтому если фермент можно использовать в неочищенном виде,

его не очищают, но такие ферменты нельзя использовать в пищевой, фармацевтической промышленности.

## 1.2. Характеристика глюкозооксидазы

Ферменты играют особую роль в процессах жизнедеятельности организмов. Они широко используются в различных отраслях химической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине и научных исследованиях. Одним из таких практически важным ферментом является глюкозооксидаза (GOx) КФ 1.1.3.4 [45].

В настоящее время известно, что прямое окисление ГЛ у многих микроорганизмов с образованием ГК катализируется ферментом GOx, который обнаружен у многих плесневых грибов. Впервые наличие фермента, катализирующего окисление ГЛ за счет кислорода воздуха, не сопровождающееся выделением CO<sub>2</sub>, было обнаружено в 1904 году Максимовым в отпрессованной жидкости *Aspergillus niger* [46]. Максимовым также были получены первые ацетоновые порошки из отпрессованной жидкости *A. niger*, которые содержали фермент, катализирующий окисление ГЛ. При потреблении кислорода, связанном с окислением ГЛ, Максимов наблюдал подкисление растворов.

В 1928 году Мюллер подтвердил данные Максимова и продолжил их изучение. Мюллер доказал, что потребление кислорода связано как с окислением ГЛ, так и с образованием кислоты [46]. В результате окисления ГЛ данным ферментом образуется кислота, которая является монокарбоновой ГК. Мюллер назвал полученный фермент глюкозооксидазой. Он показал, что GOx не содержит железа - ее активность не тормозится ни цианистым калием, ни окисью углерода. Дальнейшими исследованиями Мюллера было установлено, что GOx не катализирует окисления - дисахаридов.

При изучении специфичности действия сухих ацетоновых препаратов GOx из *A. niger* по отношению к различным моносахаридам было показано, что

с наибольшей скоростью GOx окисляет ГЛ, однако наблюдается и незначительное окисление маннозы и еще меньше — галактозы.

Активный препарат GOx из *A. niger* и *P. glaucum* выделили Франке и Лоренц. Проводя дальнейшую очистку GOx, авторы установили определенную зависимость между активностью различных препаратов GOx и содержанием в них флавина. Это позволило авторам высказать предположение, что протетической группой фермента является флавин [46].

### 1.2.1. Строение глюкозооксидазы

GOx полученная в кристаллическом виде, представляет собой димерный фермент, состоящий из 2 молекул флавинадениндинуклеотида (ФАД). Молекулярная масса субъединиц GOx по 80 килодальтон (кДа).

Каждая субъединица, или мономер, складывается в два домена: один домен привязывается к подложке, ГЛ, в то время как другой домен связывается нековалентно с кофактором, ФАД, которого он использует как мощного агента для окисления. На рисунке 1.7 представлена молекулярная модель GOx.

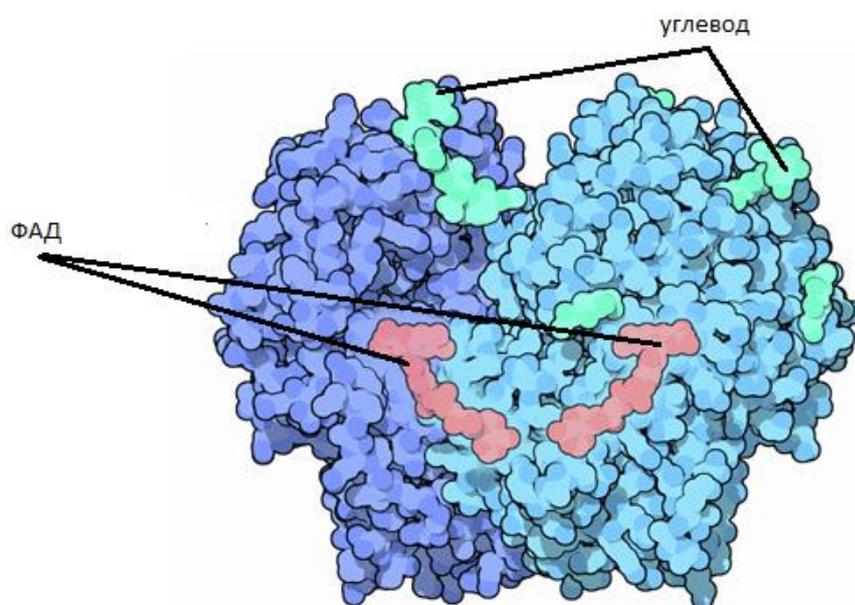


Рисунок 1.7. – Молекулярная модель глюкозооксидазы

Из рисунка видно, что GOx – это димерный белок, который содержит в качестве кофактора две тесно связанные молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД), распространённый компонент окислительно-восстановительных реакций. Каждая субъединица содержит 580 аминокислотных остатка, кофактор ФАД, шесть N-ацетилглюкозааминовых остатков, три остакманнозы и 152 молекулы растворителя. ФАД располагается недалеко от поверхности димера. Димер содержит два дисульфидных мостика, которые соединяют две субъединицы вместе. GOx представляет собой гликопротеин. Ферментативная глобула содержит 10-17% углеводов [47].

На основе литературных данных [48,49] оптимальные условия для GOx при 40°C и pH 5.0, это свидетельствует, что фермент проявляет максимальную активность при данной температуре и pH.

Фермент незаменим в медицине для диагностики ряда заболеваний, как ключевой индикатор углеводного обмена у больных. Это уникальный аналитический реагент, применяемый для определения содержания ГЛ в биологических жидкостях с помощью биохимических фотометров, автоматических анализаторов ГЛ, биосенсоров и тест-полосок. Кроме того, ферменты применяют в качестве аналитических реагентов ГЛ необходимы для определения содержания ГЛ в пищевых продуктах и для мониторинга биотехнологических процессов.

Практическая значимость GOx обусловила необходимостью разработки эффективных способов ее получения и поиска новых продуцентов с высокой биосинтетической активностью[50].

Наиболее распространенными микробными источниками для ферментативного продуцирования GOx являются виды *Aspergillus*, *Penicillium* и *Saccharomyces*. Большая часть коммерчески выпускаемого GOx выделяется из мицелия *Aspergillus niger*, выращенного главным образом для получения ГК или ее солей, таких как глюконат натрия или глюконат кальция. Соответственно, фермент получают в основном в виде побочного продукта или побочного продукта производства глюконата[51].

В работе [52] Накамура и Фуджикаки провели сравнительные исследования GOx *A. niger* и *P. amagasakiense* и обнаружили, что их молекулярные веса 152 и 150 кДа соответственно. GOx, продуцируемый двумя штаммами, имела сходные углеводы, которые состояли в основном из ГЛ, маннозы и гексозамина. GOx *A. niger* содержал больше маннозы и гексозамина, чем у *P. amagasakiense*, но меньше ГЛ. Было установлено, что общее содержание углеводов составляет 16% для *A. niger* и 11% для *P. amagasakiense*. Содержание аминокислот в двух ферментах показало, что *A. niger* GOx содержит больше гистидина, аргинина и тирозина и меньше лизина и фенилаланина, чем *P. amagasakiense* GOx. Было показано, что оптимальные диапазоны pH для GOx от *A. niger* и *P. amagasakiense* равны 3.5-6.5 и 4.0-5.5, соответственно. Очевидно, что GOx от *A. niger* имеет более широкий диапазон pH, чем у *P. amagasakiense* GOx.

#### 1.2.2. Механизм действия глюкозооксидазы

Схема механизма действия GOx представлена на рисунке 1.8.

Из представленной схемы видно, что оба водорода переносятся в виде протонов, а субстрат образует ковалентное соединение с системой колец фланина. Образование и расщепление промежуточных соединений предусматривает механизм транспорта электронов, который отражает суть протекаемой ферментативной реакции. Соответствующие места расположения на поверхности белка кислых и основных групп обеспечивают катализ дегидрирования и отвечают за быстроту ферментных реакций.

GOx катализирует окисление  $\beta$ -D-глюкозы до D-глюконо- $\delta$ -лактона и  $H_2O_2$  с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов. Эту реакцию можно разделить на восстановительную и окислительную стадию[52].

Схема окисления D-глюкозы до пероксида водорода и D-глюконо-1,5-лактона представлена на рисунке 1.9.

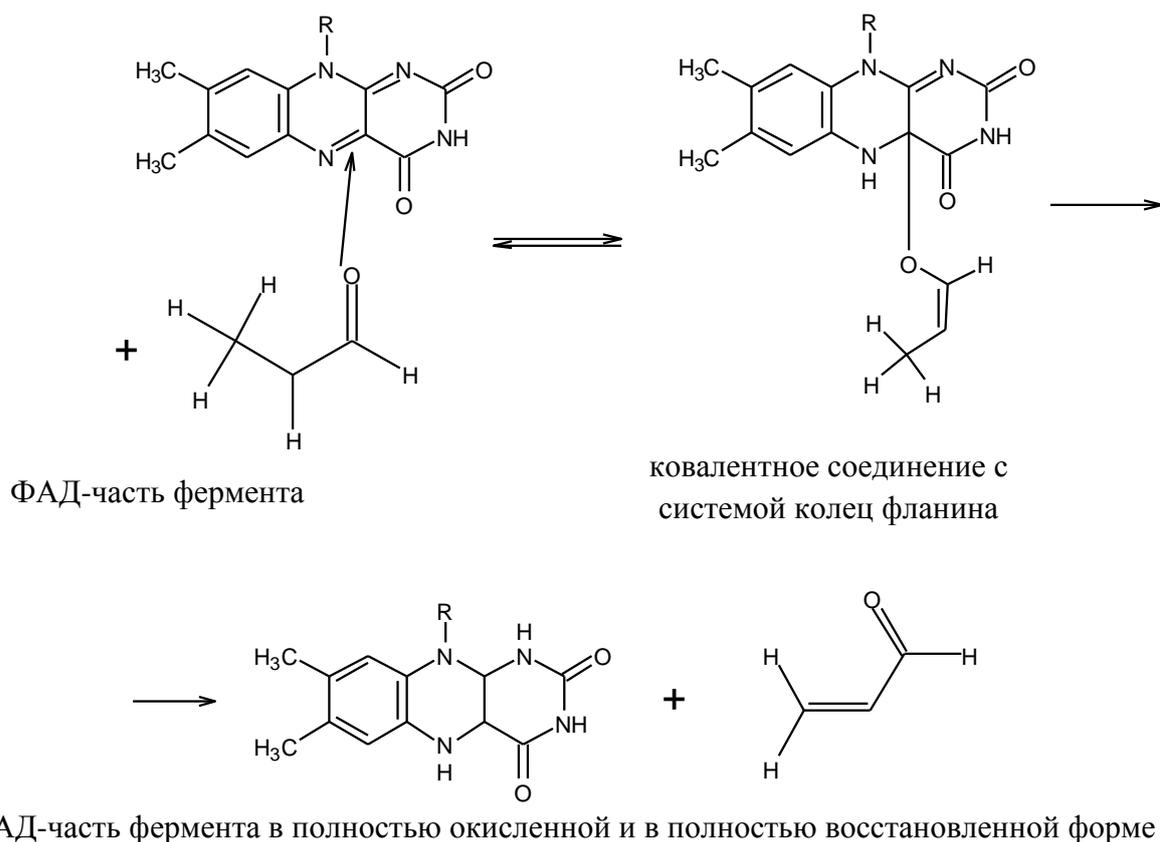


Рисунок 1.8. – Схема механизма действия глюкозооксидазы

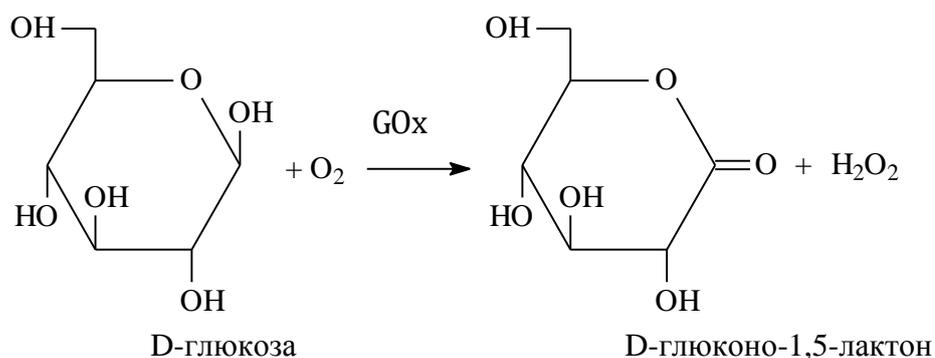


Рисунок 1.9. – Схема окисления D-глюкозы до пероксида водорода и D-глюконо-1,5-лактона

D-глюконо-1,5-лактон затем спонтанно гидролизуеться в D-глюконовую кислоту.

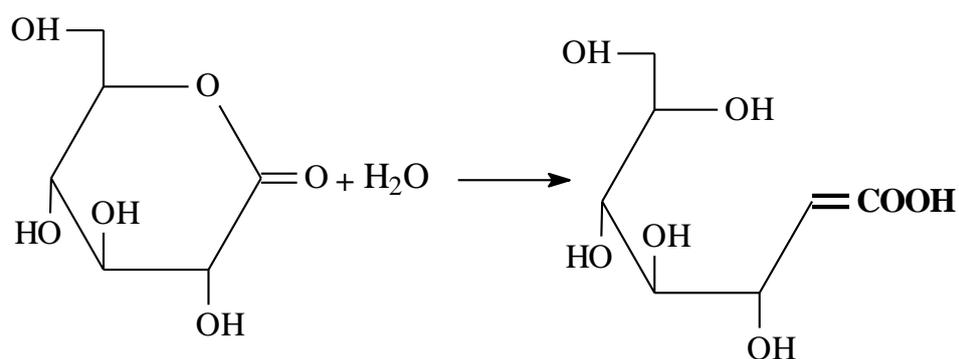


Рисунок 1.10. – Схема спонтанного гидролиза D-глюконо-1,5-лактона до D-глюконовой кислоты

В восстановительной половине реакции GOx катализирует окисление D-глюкозы до D-глюконо- $\delta$ -лактона, который гидролизуется до ГК. Впоследствии кольцо ФАД GOx восстанавливается до ФАДН<sub>2</sub>. В окислительной половине реакции GOx повторно окисляется кислородом с получением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[53].

### 1.2.3. Стабильность глюкозооксидазы

Лиофилизированная GOx чрезвычайно стабильна. При 0°C она сохраняет активность в течение 2 лет, а при -15°C - в течение 8 лет. В растворе стабильность фермента находится в зависимости от значения pH среды, причем наибольшая стабильность наблюдается при pH 5.0. Ниже pH 2.0 и выше pH 8.0 каталитическая активность фермента теряется быстро. Например, при pH 8.1 только 10% активности фермента сохраняется через 10 минут, а при pH 9.1 инактивация идет еще быстрее. Скорость инактивации GOx при высоких значениях pH понижается в присутствии ГЛ. GOx устойчива к протеолизу, а также к длительному воздействию трипсина, пепсина и папаина. Неионогенные ПАВ практически не влияют на активность GOx, однако ионные ПАВ, такие как до-децилсульфат натрия и гексадецилтриметиламмоний бромид инактивируют фермент. Анионные ПАВ, например додецилсульфат натрия

(ДСН), инактивируют GOx при низких значениях pH, в то время как катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ), например гексадецилтриметиламмоний бромид - при высоких значениях pH. При pH 3.65 и высокой концентрации ДСН образуется нерастворимый комплекс GOx и ПАВ за счет специфического связывания детергента со 120 положительно заряженными аминокислотными остатками фермента. Однако, уже при pH 4.3 и 6.0 комплексы (GOx -ДСН) становятся растворимыми. Кроме того при pH 6.0 не наблюдается диссоциации димера GOx на субъединицы. Частичная диссоциация фермента начинается при pH 5.0, а уже при pH 4.3 и 10 мМ ДСН происходит практически полная диссоциация GOx на субъединицы, сопровождающаяся потерей кофактора.

GOx имеет сравнительно низкую энтальпию денатурации ( $\Delta H = 450$  ккал/моль) и неустойчива при температуре выше  $40^{\circ}\text{C}$ . В некоторой степени фермент можно защитить от термоинактивации действием многоатомных спиртов типа глицерина [54].

#### 1.2.4. Ингибиторы глюкозооксидазы

Ингибиторами GOx являются катионы таких металлов, как ртуть, олово, серебро, взятые в микромолярных количествах. На восприимчивости GOx к этим металлам основано создание биосенсоров для детекции глюкозы. Миллимолярные количества гидразина, гидроксиламина и фенилгидразина частично ингибируют GOx. При концентрации реагента 10 мМ наблюдаются следующие степени ингибирования: гидрохинон (11%),  $\text{NaNO}_3$  (13%), семикарбазид (20%). Активность фермента падает в присутствии таких альдогексоз, как D-арабиноза, 2-дезоксид-глюкоза, действующих как конкурентные ингибиторы. Галогенид ионы ингибируют GOx при низких значениях pH. Например, при pH 3.0 GOx полностью ингибируется 0,1М KCl. Также отмечается возможность ингибирования GOx полиаминами [55].

### 1.3. Методы иммобилизации глюкозооксидазы

В настоящее время разработано множество методов иммобилизации ферментов. На рисунке 1.11 схематически изображен процесс иммобилизации фермента на носитель.

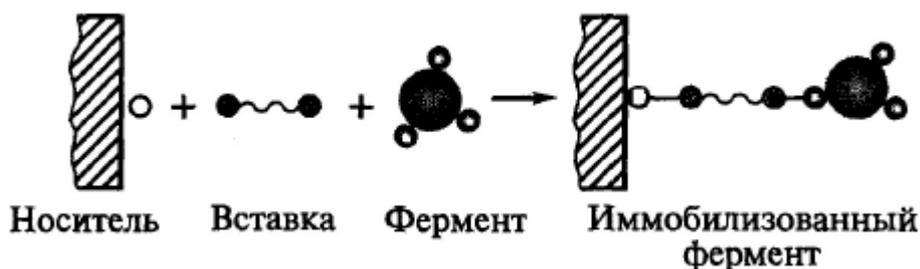


Рисунок 1.11. – Схема процесса иммобилизации фермента на носитель.

Основные методы иммобилизации ферментов описаны в литературных источниках [56-59]. Каждый из этих методов осуществляется различными способами, которые представлены на рисунке 1.12.

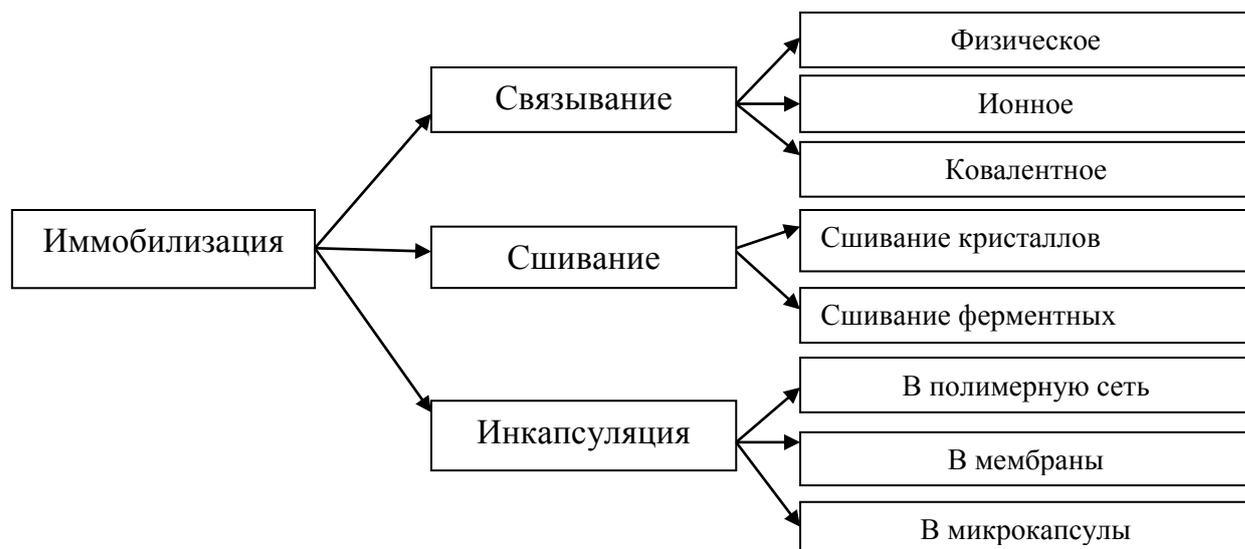


Рисунок 1.12. – Схема методов иммобилизации ферментов

На основании анализа литературы были получены данные об использовании основных методов иммобилизации GOx и применении иммобилизованных ферментов в пищевой и фармацевтической индустрии [60-66].

В работе [60] авторами проведены сравнительные исследования по окислению ГЛ различными методами иммобилизации GOx *A. niger*. Фермент был иммобилизован ковалентным методом и методом инкапсуляции в полимерную сеть. При первом способе иммобилизации, носителем является оксид этилена, а в качестве модифицирующего агента использовался полиакриламидный гель. При втором способе носителем является альгинат натрия. В сравнительном исследовании по окислению ГЛ для различных методов иммобилизации, способ ковалентного связывания оказался менее эффективен, фермент утратил активность, в сравнении с методом инкапсуляции в полимерную сеть.

В работах [61-63] иммобилизация GOx *A. niger* проводилась методом сшивания фермента с носителем. В качестве носителя авторы использовали наночастицы полученные из изотопа осмия. В качестве сшивающего агента карбоксиметилцеллюлоза. Метод иммобилизации является перспективным для применения в качестве окислителей ГЛ для биосенсоров.

Авторы в другой работе [64] получили GOx *Penicillium adametzii* и синтезировали наночастицы из благородных металлов (Au, Ag). Осуществлена иммобилизация GOx *P. adametzii* на поверхность золотых и серебряных наночастиц размером 5-6 нм с использованием в качестве модифицирующего агента полиакриламидного геля. Авторы установили, что наиболее эффективным является ковалентный способ иммобилизации GOx на золотые наночастицы. В исследовании получена уникальная по своим свойствам GOx *P. adametzii*, для использования в качестве компонента биорецепторного элемента в биосенсорах.

В работе [65] авторы получили биосенсор на основе GOx *A. niger*. GOx, выступает биорецептором в биосенсоре, которые используются для

распознавания целевых молекул с высокой точностью. В работе исследована активность GOx на золотых наночастицах. Для этого иммобилизация осуществлялась путем сшивания GOx на поверхности золотых носителей с помощью сшивающего агента: глутарового альдегида. Таким образом, был получен биосенсор для быстрого мониторинга уровня глюкозы в физиологических жидкостях.

В статье [66] авторы используют ковалентный метод иммобилизации GOx на поверхности платиновых электродов для получения биосенсоров. Для иммобилизации GOx поверхность платинового электрода покрывается модифицирующим агентом полианилин-поливинилсульфонатом. Полученный таким образом биокатализатор на основе GOx позволяет увеличить выход целевого продукта в результате сложных многостадийных биохимических превращений исходного субстрата.

Из данных литературы [60-66] следует, что основными методами иммобилизации GOx являются сшивание и ковалентное связывание на различные носители.

Для иммобилизации GOx используются как неорганические носители (Au, Ag, Pt, Os), так и магниторазделяемые системы.

Основные требования, предъявляемые к материалам, которые могут быть использованы в качестве носителя для иммобилизации:

- высокая механическая, химическая и биостойкость (устойчивость), обеспечивающая стабильность получаемых иммобилизованных веществ;
- возможность получения технологически удобных форм (гранул, мембран, листов и т.д.);
- носитель не должен затрагивать активность фермента при реализации конкретной технологии;
- следует исключить нежелательное влияние носителя (токсичность, температура, стресс и т. д.);
- надежное удержание фермента носителем;

- материал носителя не должен препятствовать обеспечению иммобилизованного вещества субстратами, газообмену и отводу продуктов жизнедеятельности;

- высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность реакций в водной среде;

- низкая стоимость носителя и легкость иммобилизации, т.е. экономическая оправданность

Весьма перспективны носители на основе металлов (Fe, Co, Ni) и их оксидов. Эти магнитные наночастицы (МНЧ) характеризуются высокой механической прочностью, относительной дешевизной, стабильностью, хорошими гидродинамическими свойствами. Металлические поверхности, используемые в качестве носителей, как правило, модифицируют, либо, создавая оксидную пленку на поверхности матрицы, либо покрывая их слоем полимера (производные полистирола, целлюлозы и т. д.). Это позволяет значительно повысить сорбционную емкость носителя.

#### 1.4. Биокаталитическое окисление D-глюкозы

Стремление к сочетанию достоинств и исключению недостатков традиционных каталитических методов привело к созданию иммобилизованных ферментативных систем.

Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными:

1. Биокатализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.
2. Процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.
3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении

макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук.
5. Иммобилизовать ферменты можно как путем связывания на нерастворимых носителях, так и путем внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными соединениями, а также путем присоединения к растворимому полимеру [67].

В работах [68-70] изучается окисление D-глюкозы в присутствии иммобилизованной GOx, в нейтральном водном растворе при комнатной температуре. Для иммобилизации глюкозооксидазы в качестве носителей использовались: Au/ZrO<sub>2</sub>, Au/ND, Au/La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Au/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Au/CeO<sub>2</sub>, Au/SnO<sub>2</sub>, Au/MnO<sub>2</sub>, Au/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Au/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Au/SiO<sub>2</sub>, Au/TiO<sub>2</sub>, Au/ZnO, Au/V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Au/NiO, Au/CuO. На рисунке 1.13 представлен биокатализатор на основе GOx иммобилизованной на наночастицах Au для окисления D-глюкозы.

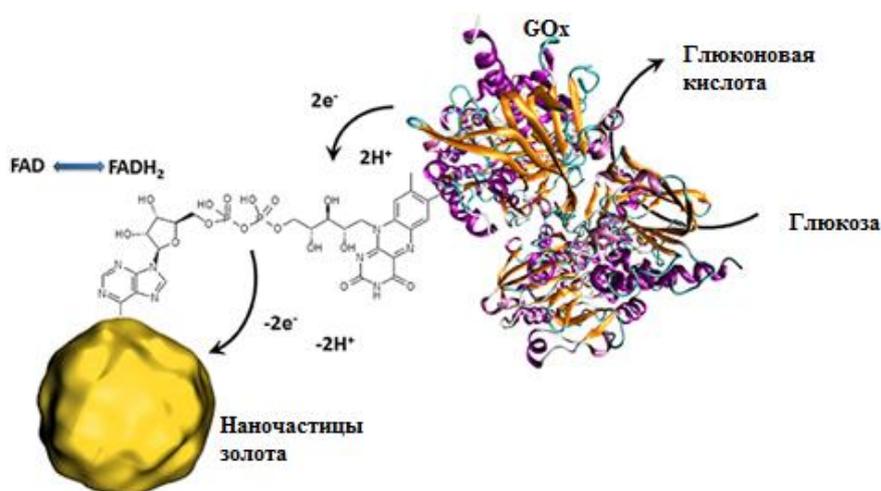


Рисунок 1.13. – Схематичное представление биокатализатора на основе GOx, иммобилизованной на наночастицах Au для окисления D-глюкозы

Для выбора каталитически активного биокатализатора на основе Au проводили тестирование в процессе окисления ГЛ. Полученные результаты процесса окисления в присутствии биокатализаторов представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1. – Активность GOx в сочетании с золотыми носителями, в процессе окисления D-глюкозы

№ опыта	Носитель	Выход глюконовой кислоты %, через 1ч.
1	Au/ZrO <sub>2</sub>	98±2
2	Au/ND(NanoDiamond)	98±2
3	Au/La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	98
4	Au/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	96
5	Au/CeO <sub>2</sub>	95
6	Au/SnO <sub>2</sub>	94
7	Au/MnO <sub>2</sub>	91
8	Au/Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	91
9	Au/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ,	88
10	Au/SiO <sub>2</sub> ,	87
11	Au/TiO <sub>2</sub>	86
12	Au/ZnO	84
13	Au/V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	83
14	Au/NiO	73
15	Au/CuO	42

Процесс окисления ГЛ осуществляли с использованием 2% глюкозы в водном растворе (31 мл), 0.13 г – GOx и 8.0 мг катализатора. Окисление проводили при 30<sup>0</sup>C, pH = 7.0 в течение часа при постоянном перемешивании. Скорость подачи кислорода составляла 60 мл/мин.

Из таблицы 1.1 видно, что фермент, иммобилизованный на Au/ZrO<sub>2</sub> и Au/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, проявляет наибольшую активность для окисления ГЛ, в отличие от других катализаторов.

В работе [71] авторы разработали модифицированные электроды на основе берлинской лазури и ферментов GOx и  $\gamma$ -амилазы, иммобилизованных в гель поперечно-сшитого бычьего сывороточного альбумина для определения содержания ГЛ и крахмала в бродильных средах. Определены основные аналитические и метрологические характеристики разработанных модифицированных электродов. С использованием разработанных модифицированных электродов был проведен анализ образцов бродильной массы, отобранных на разных этапах процесса брожения. Статистический анализ полученных результатов показал, что значения содержаний ГЛ и крахмала, определяемые с помощью модифицированных электродов, и полученные референтными методами, незначительно различаются между собой. Разработанные модифицированные электроды могут служить основой для создания биосенсоров с высокими аналитическими и метрологическими характеристиками, которые могут применяться при мониторинге бродильных процессов и для определения содержания компонентов бродильных масс и продуктов брожения.

В работе [72,73] изучалась совместная иммобилизация осмия и фермента GOx. Иммобилизация проводилась путем последовательного нанесения на полимерные пленки, затем на электроды. Ферментный электрод — это комбинация датчика, основанного на использовании ион-селективного электрода, с иммобилизованным (нерастворимым) ферментом, обеспечивающая высокоселективный и высокочувствительный метод определения данного субстрата. Оптимальное количество осмия и GOx в пленках совместно иммобилизованных на угольные электроды в присутствии многостенных углеродных нанотрубок и сшивающих агентов (25% р-р глутарового альдегида) обеспечивают высокоэффективное и стабильное окисление ГЛ. Выход ГК при данном методе составил более чем 70% при окислении ГЛ в течение 24 часов. Результаты исследования указывают на перспективное применение ферментативных топливных элементов.

Следует отметить достоинства данного способа:

- нет необходимости получать очищенные ферменты – можно непосредственно использовать целые клетки или срезы тканей без выделения и очистки белков;
- электрод можно регенерировать погружением в питательную среду, микроорганизмы сохраняют жизнеспособность довольно долго;
- целые клетки могут содержать несколько кофакторов и ферментов, катализирующих реакции, которые трудно, если вообще возможно, осуществить с помощью одного иммобилизованного фермента. Кроме того, кофакторы, необходимые для ферментативных реакций, находятся в естественно иммобилизованном состоянии.

Однако у таких электродов есть и недостатки:

1. низкая селективность, обусловленная присутствием в клетке микроорганизма ряда ферментов, которые могут катализировать побочные реакции;
2. часто наблюдается медленный отклик электрода, поскольку концентрации ферментов в клетках низки, а мембрана электрода довольно толстая и поэтому может замедлять диффузионные процессы [74].

В работе [75] проводили исследования GOx при ее взаимодействии с полиэлектролитами. Кинетические свойства GOx определяли по скорости реакции ферментативного окисления ГЛ, регистрируемой амперометрическим методом по снижению концентрации кислорода. Эксперименты показали, что комплексы фермент-полиэлектrolит и фермент-полиэлектrolитные капсулы формируются за счет электростатических взаимодействий. В этом случае наблюдаются конформационные изменения структуры GOx, а ее каталитическая активность возрастает. Образование комплексов ферментов с полиэлектролитами может способствовать стабилизации фермента и активировать его каталитические свойства. Помещение GOx в полиэлектролитные микрокапсулы и последующая иммобилизация капсул с ферментами на твердой поверхности позволяет создать полимерный биосенсор

ГЛ. Эти исследования важны при поиске путей увеличения стабильности и чувствительности фермента, применяемого в биосенсорах.

Интерес представляют исследования [76-78] посвященные изучению биокатализаторов на основе магниторазделяемых систем. Для получения таких биокатализаторов использовался фермент GOx в сочетании с МНЧ. В предлагаемой методике не используются токсичные реагенты или растворители. МНЧ, получали с помощью известного метода соосаждения [79]. Фермент иммобилизовали за счет адсорбции на наночастицы  $Fe_3O_4$  в водной среде без сшивающих агентов. Во-первых, из-за наноразмера частиц достигается большая площадь поверхности биокатализатора, и это значительно увеличивает вероятность контакта между реагентами и ферментом; в свою очередь эта особенность позволяет биокатализатору достигнуть показателей близких к нативному ферменту. Во вторых полученные магниторазделяемые системы могут быть легко отделены с помощью магнита от реакционной среды и не загрязнять продукт [80]. Недостатком представленных биокатализаторов является низкая стабильность и невозможность повторного использования.

Биокаталитический способ окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с использованием глюкозооксидазы иммобилизованной на неорганические носители и магниторазделяемые системы является перспективным направлением в области биотехнологии.

### 1.5. Способы синтеза магнитных наночастиц

Магнитные наночастицы (МНЧ) представляют собой частицы природных или синтетических материалов с размерами от 5 до 100 нм, обладающие магнитными свойствами. Активно применяют МНЧ в биомедицине, магнитно-резонансной томографии, системах хранения данных, технологиях восстановления окружающей среды, магнитоуправляемых жидкостях, различных детекторах и системах иммуноанализа. Для получения МНЧ, как правило, используются Fe, Ni, Co, и их оксиды. Недостатком чистых

металлов является то, что их намагниченность падает по мере окисления поверхности, находящейся в контакте с атмосферным кислородом. Однако есть подкласс веществ, лишенных этих недостатков – ферриты. К их преимуществам относятся:

- низкая восприимчивость к окислению;
- высокие магнитные свойства;
- низкая стоимость.

С уменьшением размера магнитного материала до однодоменного уровня (менее нескольких десятков нм) МНЧ приобретают свойства суперпарамагнетизма. Суперпарамагнитные частицы при удалении магнитного поля полностью теряют намагниченность, то есть возвращаются в исходное состояние и могут быть легко суспензированы в растворе.

Среди часто используемых методов синтеза МНЧ следует выделить [81-82]:

- соосаждение;
- золь–гельный метод
- полиольный метод
- гидротермальный метод получения МНЧ

#### 1.5.1. Метод синтеза МНЧ – соосаждение

Один из наиболее часто используемых способов синтеза МНЧ – это метод совместного соосаждения солей железа(II) и (III) (метод Массара) [79]. Суть метода заключается в синтезе наночастиц металлов, оксидов металлов, гидроксидов, солей и др. Процесс синтеза наночастиц оксидов железа ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  либо или  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) обычно проводят в водной фазе, путем смешения ферро- и ферри- солей железа. Реакция процесса синтеза:



Полное выпадение осадка происходит при значениях pH 8.0 – 14.0. Форма и состав частиц зависит от типа соли (хлориды, сульфаты, нитраты), соотношения  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  [63], температуры проведения реакции, pH [83], а также от типа основания и скорости перемешивания. Размер частиц, полученных этим методом, относительно однороден. Однако если наночастицы  $Fe_3O_4$  хранятся в водной среде, они могут агрегировать и выпадать в осадок [79].

Основные преимущества соосаждения – высокая производительность, простота исполнения и аппаратного оформления, доступность и дешевизна используемых реагентов. Однако, несмотря на популярность этого метода, вопросы оптимизации условий синтеза для получения МНЧ с узким распределением по размерам исследованы незначительно.

#### 1.5.2. Золь–гельный метод синтеза МНЧ

Золь-гельный метод первоначально был разработан для получения порошка железа. Он сочетает процесс химической очистки с процессом восстановления и основан на осаждении из водных растворов нерастворимых металлических соединений в виде геля, получаемого с помощью модификаторов (полисахаридов), с последующим их восстановлением. В частности, содержание Fe в порошке составляет 98,5 – 99,5 %. В качестве сырья можно использовать соли железа, а также отходы металлургического производства: лом металлов или отработанный травильный раствор [84].

Обычно золь-гель метод включает в себя формирование металлооксополимерных цепей – золя или геля из растворимых полигидрокомплексов, образовавшихся в результате гидролиза металлоорганических комплексных или неорганических соединений. Образующиеся гидратированные оксиды чрезвычайно химически активны. Их дегидратация происходит при весьма низких температурах, иногда непосредственно в процессе гидролиза, и сопровождается образованием кристаллических или аморфных оксидов с малым размером частиц ( $d=10$  нм)

и развитой поверхностью. При образовании зольей распределение МНЧ по размерам определяется временем образования зародышей. Как правило размер коллоидных частиц возрастает с увеличением времени реакции ( поскольку к поверхности нанокристалла поступает больше вещества) и с повышением температуры ( возрастает скорость роста существующих зародышей. Систематическое исследование реакционных параметров, таких как время реакции, температура, концентрация и химический состав реагентов позволяет контролировать размер, форму и качество нанокристаллов. Особенно важными для получения наноструктур с заданными характеристиками являются процессы образования конденсированных форм при гидролизе исходных прекурсоров. Очевидно, что именно эта стадия определяет морфологию и фазовый состав получаемых продуктов. Таким образом, для направленного получения МНЧ золь-гель методом необходимо знание механизмов гидролиза и поликонденсации. В реальности, синтез оксидов металлов золь-гель методом оказывается, сопряжен с рядом трудностей. Неполное протекание гидролиза часто негативно сказывается на химической и механической стабильности формируемых структур и их изменении этих параметров в процессе “полезной работы” материала.

### 1.5.3. Полиольный метод получения МНЧ

Полиольный метод получения МНЧ является универсальным химическим подходом для синтеза наночастиц с хорошо определяемыми формами и контролируемыми размерами. Растворители, такие как полиолы (например, этиленгликоль) имеют интересные свойства: благодаря их высокой диэлектрической проницаемости, они выступают в качестве растворителей, способных растворять неорганические соединения, и в связи с их относительно высокими температурами кипения, они имеют широкий диапазон рабочих температур (от 25 °С до температуры кипения) для приготовления

неорганические комплексов. Полиолы также служат в качестве восстановителей и стабилизаторов контроля роста частиц и предотвращения агрегации между частицами [85]. В полиольном процессе, полярность полиола позволяет растворять различные неорганические соли. Из-за высокой температуры кипения растворителя, полиол улучшает реакцию способность различных реагентов. Что еще более важно, он может сократить много видов металлических ионов для синтеза металлических и оксидных наночастиц металлов [86]. В этих процессах, исходный прекурсор суспендируют в жидком полиоле. Суспензию перемешивают и нагревают до заданной температуры, которая может достигать точки кипения полиола. Субмикронные частицы могут быть синтезированы путем увеличения температуры реакции или с помощью гетерогенной нуклеации, добавляя внешнее ядро. Последний способ является более приемлемым, так как повышение температуры приводит к термической деструкции полиола. Кроме того, гетерогенная нуклеация позволяет, в некоторой степени, контролировать размер частиц в субмикронном диапазоне. Полиольный метод имеет ряд преимуществ.

Во-первых, поверхность готовой наночастицы магнетита может быть покрыта гидрофильным полиольным биологическим агентом; таким образом, наночастицы могут быть легко диспергированы в водной среде и в других полярных растворителях.

Во-вторых, относительно высокая температура реакции этой системы способствует высокой степени кристалличности частицы и, следовательно, более высокой намагниченности.

Наконец, распределение по размерам наночастиц более мономодальное, чем для частиц, образующихся при использовании традиционных методов.

#### 1.5.4. Гидротермальный метод получения МНЧ

Среди методов получения МНЧ и подготовки исходных композиций для их синтеза широкое применение получил гидротермальный метод, описанный в литературе [87-91]. Гидротермальный синтез является перспективным для получения наноструктур различного состава, строения, морфологии. Зачастую, в качестве исходных прекурсоров при гидротермальном синтезе для получения сложных оксидов, используют смесь соосажденных гидроксидов соответствующих металлов. В этом случае бывает сложно сохранить требуемое соотношение между компонентами в связи с особенностями и наличием дополнительных технологических операций. В гидротермальных условиях процесс формирования МНЧ протекает через стадию разложения слоистого двойного гидроксида, который образуется при соосаждении гидроксида железа.

Сущность гидротермального метода получения МНЧ заключается в нагревании металлов в виде раствора или суспензии при повышенной температуре (обычно гидротермальный синтез ведется при температурах 110-360 °С) и давлении (100-300 МПа). В случае использования высококипящих растворителей температура синтеза может достигать 600 °С. При более высоких температурах синтез происходит в сверхкритических условиях. При этом в растворе происходят химические реакции, приводящие к образованию МНЧ. Гидротермальный синтез проводят в автоклавах, длительность обработки варьируется от 10 мин до 24 часов.

Преимуществами метода гидротермального синтеза МНЧ являются возможность синтеза кристаллов веществ, нестабильных вблизи температуры плавления, возможность синтеза крупных кристаллов высокого качества. Так же гидротермальный метод позволяет управлять геометрией и размером наночастиц в широком диапазоне (от 10 до 100 нм) посредством оптимизации экспериментальных параметров, таких, как время реакции, температура, концентрация и стехиометрический состав реагентов, вид растворителя.

Недостатком данного метода является необходимость использования повышенных температур и давлений.

## 1.6. Применение глюконовой кислоты

Глюконовая кислота (ГК) относится к группе альдоновых кислот и используется: фармацевтической, пищевой промышленностью.

ГК – это пентаоксигексановая кислота, образующая при окислении альдегидной группы D-глюкозы.

ГК и ее  $\delta$ -лактон представляют собой продукт дегидрогенизации  $\beta$ -D-глюкозы. В настоящее время ферментация является приоритетным направлением в промышленном производстве ГК, можно изменить направленность биотехнологического процесса в сторону увеличения выхода ГК.

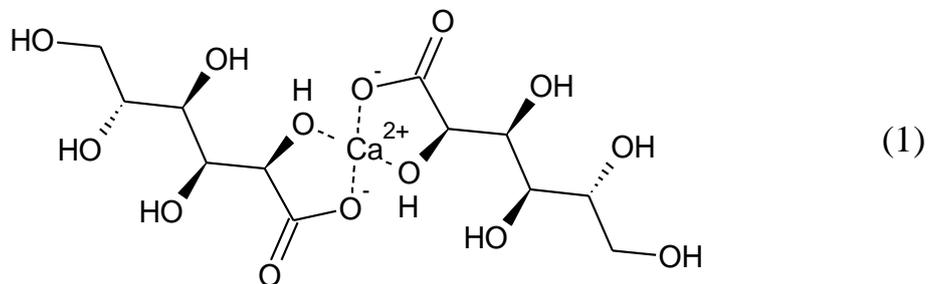
Благодаря своим свойствам ГК выступает в сфере производства продуктов в роли разрыхлителя, регулятора кислотности, комплексообразователя, подкислителя, усилителя действия антиоксидантов. ГК зарегистрирована как пищевая добавка E574. ГК часто применяется в порошках, желе, фруктовых соках. Кроме того, ГК используется для устранения проблем, вызванных осаждением фосфата кальция и иных кальциевых солей. Есть и иные сферы, в которых ГК нашла свое применение. Например, она используется в моющих средствах, в фармацевтической промышленности в качестве наполнителя для таблеток. Она активизирует обмен веществ, повышает работоспособность мышц и оказывает другие, положительные действия на организм.

В результате получения ГК искусственным путем получают белые или бесцветные кристаллы, не имеющие запаха и вкуса. Они хорошо растворяются в воде, образуя светло-желтый вязкий раствор. ГК образует соли-глюконаты.

Соли ГК применяются в медицине:

1. Минеральная добавка при гипокальциемии – глюконат кальция.

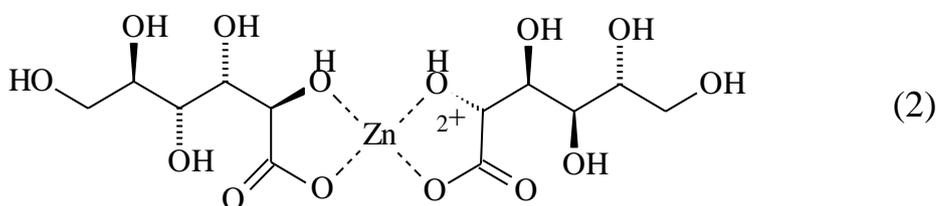
Глюконат кальция (1) представляет собой порошок белого цвета зернистый или кристаллический. Растворим в воде, практически нерастворим в спирте и эфире. Содержит до 9% кальция..



Глюконат кальция

2. Лечение малярии (внутримышечное введение) – хинин глюконат.
3. Лечение различных заболеваний, связанных с дефицитом цинка или его пониженным содержанием в организме, - глюконат цинка.

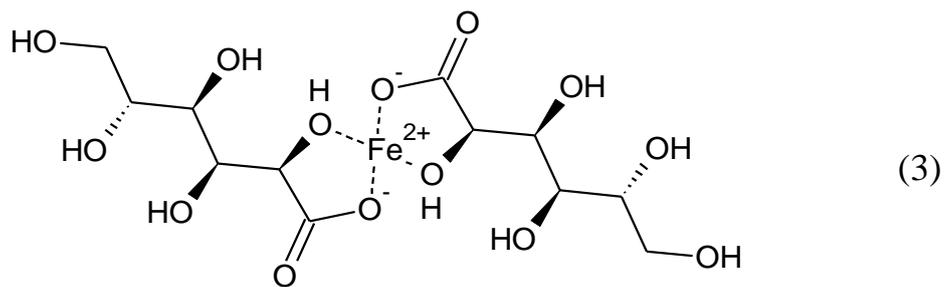
Глюконат цинка (2) - это минеральная соль, которая широко используется в косметике благодаря своей способности улучшать барьерную функцию кожи, улучшает тургор и гидробаланс. Глюконат цинка стимулирует выработку кератина, коллагена и эластина, помогает жирной коже и коже подверженной акне. Глюконат выполняет функции проводника цинка, помогает его усвоению клетками кожи, участвует в регенерации клеток.



Глюконат цинка

4. При лечении анемии – глюконата железа.

Глюконат железа (3) — препарат железа, восполняет нехватку железа в организме, восстанавливает гемоглобин. При курсовом лечении способствует регрессии клинических и лабораторных симптомов анемии. Является высоко абсорбируемой и хорошо переносимой формой железа. Глюконат железа представляет собой порошок жёлто-зелёного или тёмно-оливкового цвета.



Глюконат железа

В пищевой промышленности ГК используют в качестве пищевой добавки, как разрыхлитель, регулятор кислотности. Для подкисления ее используют редко, потому что она слабее лимонной кислоты.

Пищевая добавка E574 легко усваивается из пищеварительного тракта и хорошо переносится организмом. Она способна активизировать обмен веществ и повышать работоспособность организма.

В косметологии ГК применяют для пилинга и омоложения кожи. Благодаря своим свойствам, ГК очень бережно отшелушивает отмерший слой клеток эпидермиса, повышает защитные свойства кожи, омолаживает и защищает от фотостарения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ

На основании литературных данных в данной главе были проанализированы химический, электрохимический, ферментативный

каталитический, биокаталитический способы окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

Ферментативное окисление ГЛ в присутствии биокатализатора имеет ряд преимуществ: реакция протекает в мягких в отношении температуры, давления, рН условиях и не является энергоемкой; биокатализаторы имеют высокую селективность. Процесс получения ГК с помощью биокатализатора на основе иммобилизованной GOx отличается высоким выходом целевого продукта в экологически чистых условиях.

В качестве носителей для биокатализаторов предлагается использовать неорганические носители, в том числе МНЧ, так как, во-первых, из-за наноразмера частиц достигается большая площадь поверхности биокатализатора, и это значительно увеличивает вероятность контакта между носителем и ферментом; в свою очередь эта особенность позволяет биокатализатору достигнуть показателей близких к нативному ферменту. Во-вторых полученные магниторазделяемые системы могут быть легко отделены с помощью магнита и повторно использоваться в течение последовательных циклах.

В связи с вышеизложенным, можно утверждать, что биокаталитический способ окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с использованием неорганических носителей, в том числе магниторазделяемых, является актуальным и перспективным .

Целью работы является создание биокатализаторов, на основе GOx иммобилизованной на неорганические носители, в том числе магнитоотделяемые, выявление зависимости структуры синтезированных биокатализаторов и их поведения в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

## ГЛАВА ВТОРАЯ. МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ

### 2.1. Реактивы

Список реактивов, использованных в работе, представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 . – Список реактивов, использованных в работе

№	Реактив	Формула	Марка
Фермент			
1	Глюкозооксидаза, <i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> , 174.9 Ед/мг	«SIGMA-ALDRICH»,
Носители			
2	Оксид алюминия	$\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	«НПФ Химмедсервис»
3	Диоксид кремния	SiO <sub>2</sub>	«НПФ Химмедсервис»
Реактивы			
4	Хлорид железа (III) 6- водный	FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	«НПФ Химмедсервис», ГОСТ 4147-74, ч
5	Сульфат железа (II) 7- водный	Fe <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	«Нева реактив», ч.д.а.
6	Гидроксид натрия (гранулированный)	NaOH	«Нева реактив», 98 %, ГОСТ 4328-77, ч.д.а.
7	Этиленгликоль	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub>	«Компонент- реактив», ГОСТ 10164-75, ч.д.а.
8	Мочевина	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	«Индикатор», ГОСТ 6691- 77, ч.д.а.
9	Янтарная кислота	HOOC-CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -COOH	«Марбиофарм», ч.д.а.
10	3-аминопропилтритоксисилан	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> Si	«SIGMA-ALDRICH», >99 %
11	Глицерин	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (OH) <sub>3</sub>	«КУПАВНАРЕАКТИВ», ГОСТ 6259-75
12	Уксусная кислота	CH <sub>3</sub> COOH	«КУПАВНАРЕАКТИВ», ГОСТ 51-75
13	Тетраэтоксисилан	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> Si	«ЭКОС-1», ТУ 2637-187- 44493179-2014
14	Глутаровый альдегид	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	«BioChemika», 25%
15	Аммиак водный	NH <sub>4</sub> OH	«Сигма Тег», Гост 3760-79
Субстрат			
16	Глюкоза 1-водная	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	«НПФ Химмедсервис»
Фосфатный буфер			
17	Калий фосфорнокислый замещ.	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	«ГРАНХИМ» ТУ 6-09-01- 754-89

## 2.2. Методика получения биокатализатора на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на оксид алюминия и на диоксид кремния

Образцы носителей  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и  $\text{SiO}_2$  массой по 3 г прокаливали при  $300\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 12 ч. Далее проводили модификацию поверхности носителей. Для этого, навеску 3 г носителя, предварительно смоченного водой суспендировали в растворе 80 мл воды и уксусной кислоты  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( $\text{pH}=4.0$ ), после чего, к раствору добавляли 10% (v/v объемные) APTES. В полученный раствор вводили в раствор 40 мл глицерина и перемешивали 5 часов на магнитной мешалке при  $90^\circ\text{C}$ . Полученные модифицированные образцы носителя отфильтровывали, промывали дистиллированной водой 3 раза, этанолом 5 раз и сушили при комнатной температуре 48 ч. Для ковалентного связывания фермента с носителем, высушенные образцы обрабатывали раствором глутарового альдегида (GA) и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Для приготовления раствора GA требовалось 0.8 мл 25% GA (оптимальное количество), растворенного в 20 мл фосфатного буфера ( $\text{pH}$  7). Затем образцы промывались дистиллированной водой пять раз. К полученным модифицированным образцам носителя (0.10 г) добавляли GOx (0.01 г), растворенную в 20 мл фосфатного буфера и перемешивали в течение 1 ч на магнитной мешалке (200 об/мин). Затем промываем 3 раза фосфатным буфером и сразу загружали в реактор для проведения опыта.

В результате данного способа иммобилизации GOx, были получены следующие биокатализаторы:  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$ ), и  $\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  ( $\text{SiO}_2/\text{GOx}$ ). Схема синтеза биокатализатора представлена на рисунке 2.1.

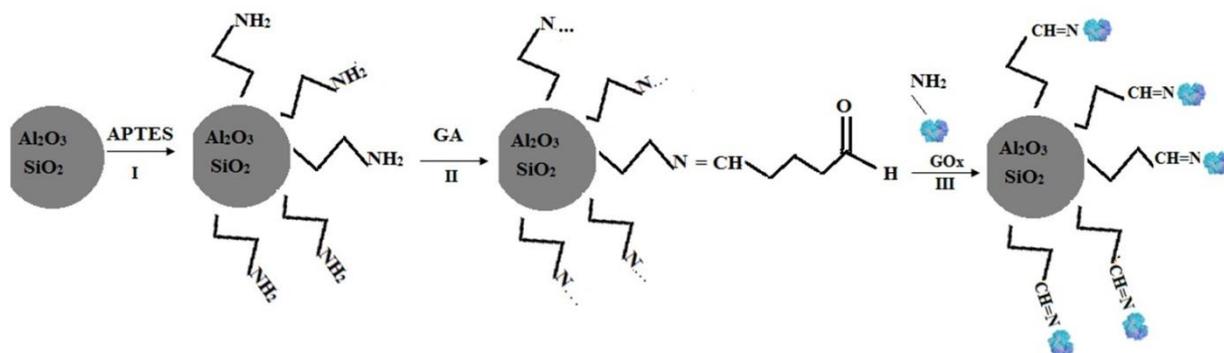


Рисунок 2.1. – Схема биокатализатора  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$ ,  $\text{SiO}_2/\text{GOx}$ :

Из схемы, представленной на рисунке 2.1. представлены стадии формирования биокатализатора. I стадия – модификация поверхности носителя аминогруппами (APTES), II стадия – нанесение на поверхность модифицированного носителя сшивающего агента (GA), III стадия – ковалентное связывание GOx с носителем, за счет образования азометиновой связи ( $-\text{CH}=\text{N}-$ ) между сшивающим агентом и ферментом.

### 2.3. Методика получения биокатализатора на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитные наночастицы

Для получения магнитоотделяемых биокатализаторов, проводили синтез магнитных наночастиц, а именно магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) с применением различных методов.

#### 2.3.1. Методика синтеза магнетита

##### 2.3.1.1. Метод соосаждения

Метод соосаждения заключается в приготовлении раствора солей железа +3 и +2 в молярном соотношении 2:1 при интенсивном перемешивании с щелочным раствором с  $\text{pH} > 11.0$  при комнатной температуре в соответствии с

методикой представленной в литературе [92, 93]. К полученному раствору (25 мл) из смеси солей железа (2.9 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и 5.8 г  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) добавляли по каплям  $\text{NaOH}$  (250мл, 1.5М) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Полученный осадок  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  черного цвета отделяли от реакционной среды, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения рН. Операции по разделению МНЧ от раствора проводили с помощью неодимового магнита. Магнитоотделяемый носитель, полученный методом соосаждения, обозначен как  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (1).

### 2.3.1.2. Полиольный метод

Преимуществом полиольного метода получения МНЧ по сравнению с методом соосаждения, является высокая намагниченностью частиц [94, 95]. В этом случае для синтеза частиц магнетита используется не смесь солей железа +2 и +3, как для метода соосаждения, а соли  $\text{Fe}^{+3}$ . В процессе синтеза происходит частичное восстановление  $\text{Fe}^{+3}$  до  $\text{Fe}^{+2}$  и формирование частиц смешанных оксидов  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) [94]. Схема протекающих реакций может быть представлена следующим образом:



В данной работе для получения МНЧ варьировали условия, а именно время синтеза и количество полиола.

Для первого способа получения МНЧ (дальнейшее обозначение  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ ) в химическом стакане готовили следующий раствор: к 30 мл этиленгликоля добавляли  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (3 ммоль), янтарную кислоту (1 ммоль) и мочевины

(30 ммоль). Затем раствор перемешивали на магнитной мешалке 200 об/мин в течении 30 минут. Полученный раствор переносили в тефлоновый стакан (объемом 50 мл) автоклава из нержавеющей стали и выдерживали при 200 °С в течении 2-х часов. После охлаждения до комнатной температуры, магнитом отделяли осадок Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> черного цвета, который промывали этанолом 5-7 раз до прозрачного раствора. Затем высушивался при комнатной температуре в течение 48 часов. Схема образования МНЧ, синтезированных полиольным способом представлена на рисунке 2.2.

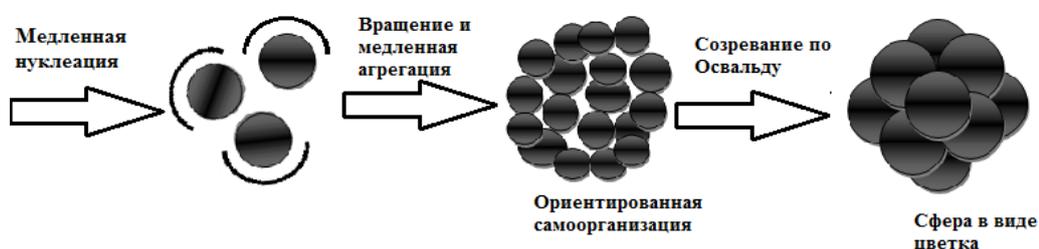


Рисунок 2.2. – Схема образования МНЧ полиольным методом

Синтез кластеров наночастиц оксидов железа вторым способом (последующее обозначение Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)) проводили в соответствии с предыдущей процедурой. В химическом стакане смешивали 0,8109 г FeCl<sub>3</sub> × 12H<sub>2</sub>O (3 ммоль), 0,1181 г янтарной кислоты (1 ммоль) и 1,8018 г мочевины (30 ммоль) полностью растворяли в 30 мл этиленгликоля. В случае третьего способа (последующее обозначение Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)) для растворения использовали 20 мл этиленгликоля. Полученный раствор (и для 2-го и 3-го способа получения) интенсивно перемешивали, помещали в автоклав из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием, нагревали и выдерживали до 200 °С в течение 48 часов. Реакционная смесь остывала до комнатной температуры и трижды промывали водой и 3 раза этанолом. Образец высушивали в вакуумной печи при 60 °С в течение 12 часов. В отличие от первого способа второй и третий

способы получения кластеров наночастиц оксидов железа выдерживались в автоклаве из нержавеющей стали с тефлоновым покрытием не 2 часа, а 48 часов. В случае третьего способа, изменяли количество полиола по сравнению с первым и вторым способом.

### 2.3.2. Модификация поверхности наночастиц магнетита

Модификация МНЧ осуществлялась взаимодействием функциональных групп органических веществ с поверхностью наночастиц методом силанизации. Метод силанизации предложен Вайтхедом в 1985 г. МНЧ непосредственно покрывали силанизирующими связующими, что обеспечивало высокую плотность функциональных групп. Для получения функциональных групп формируют оболочку, например, из 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES) или тетраэтоксисилана (TEOS). Органосиланы – бифункциональные молекулы, включающие триалкокси- или трихлорсилановые группы, которые используют для ковалентного модифицирования поверхности функциональными группами, например,  $-\text{O}_3\text{SiCH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  [96-98].

В данной работе предложена более сложная схема создания модифицированных МНЧ «ядро-оболочка». На первой стадии с помощью TEOS формируют  $\text{Si}(\text{OH})_4$  -оболочку, а на второй стадии с помощью APTES образованная  $\text{Si}(\text{OH})_4$  -оболочка модифицируется с  $\text{NH}_2$ -группами. Наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  способны адсорбировать ионы и молекулы в растворе из-за большого количества свободных связей на их поверхности. Наночастицы, диспергированные в нейтральном водном растворе имеют на поверхности атомы Fe и O, способные адсорбировать группы OH- и H- соответственно, в результате чего поверхность наночастиц обильно покрывается OH- группами [99].

Полученные, просушенные МНЧ обрабатывали ультразвуком в течении 20 минут при 30 °С, затем высушивали при комнатной температуре. Затем к 3 г полученных МНЧ добавили 10 мл 25% раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$  и 3,5 мл

тетраэтоксисилана (TEOS). Смесь перемешивали в течении 12 часов при температуре 40 °С. Покрытые TEOS МНЧ промывали несколько раз водой, затем 3 раза этанолом и высушивали в течении 24 ч при комнатной температуре.

После этого, поверхность полученных частиц модифицировали АPTES следующим образом: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TEOS были суспензированны в 80 мл раствора (H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>COOH (pH 4)) и 10% (v/v) АPTES в стеклянном реакторе при перемешивание на магнитной мешалке. Затем вводили в раствор 40 мл глицерина. Полученный раствор перемешивали при 90 °С 5ч.

Для ковалентного связывания фермента, с носителем высушенные образцы обрабатывали раствором GA и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Для приготовления раствора GA потребовалось 0,8 мл 25% GA растворенного в 20 мл фосфатного буфера. Затем образцы промывали дистиллированной водой пять раз. И сразу направлялись для связывания с GOx.

На рисунке 2.3 представлена схема модификации МНЧ.

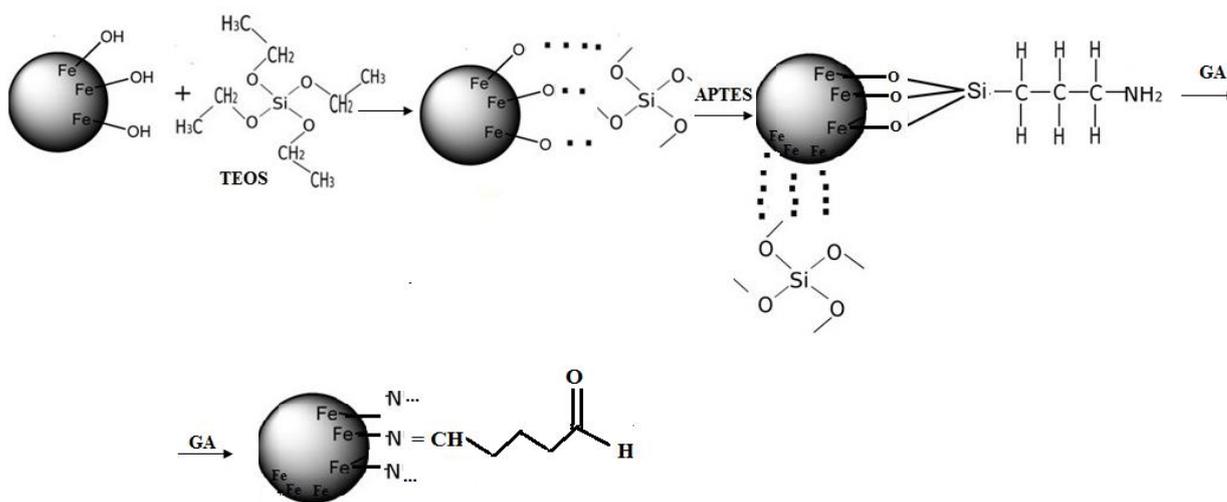


Рисунок 2.3. – Схема модификации МНЧ

### 2.3.3. Иммуобилизация глюкозооксидазы на магнитные наночастицы

Навеску GOx массой 0.01 г растворили в 20 мл фосфатного буфера и добавили к модифицированным МНЧ в количестве 0.10 г. Для ковалентного связывания GOx проводили перемешивание смеси в течение 1 часа. Промывку полученного биокатализатора осуществляли 3 раза дистиллированной водой, до получения отрицательной реакции на пептиды с раствором нингидрина.

На рисунке 2.4 представлено схематическое изображение химической структуры биокатализатора на основе GOx иммобилизованной на магнитные наночастицы.

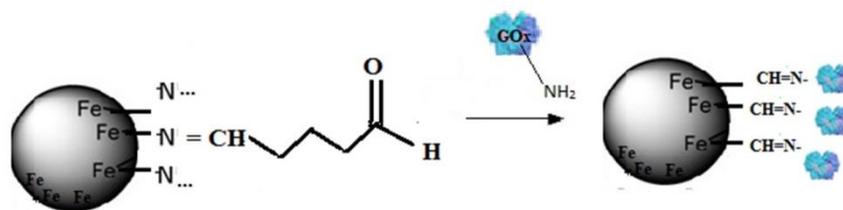


Рисунок 2.4. – Схема биокатализатора Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TEOS/APTES/GA/GOx.

В результате такого способа иммобилизации были получены следующие биокатализаторы: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/TEOS/APTES/GA/GOx (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS/APTES/GA/GOx (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/TEOS/APTES/GA/GOx (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/TEOS/APTES/GA/GOx (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx).

### 2.4. Методика окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты

Реакция окисления D-глюкозы с использованием полученных биокатализаторов осуществлялась по схеме, представленной на рисунке 2.5.

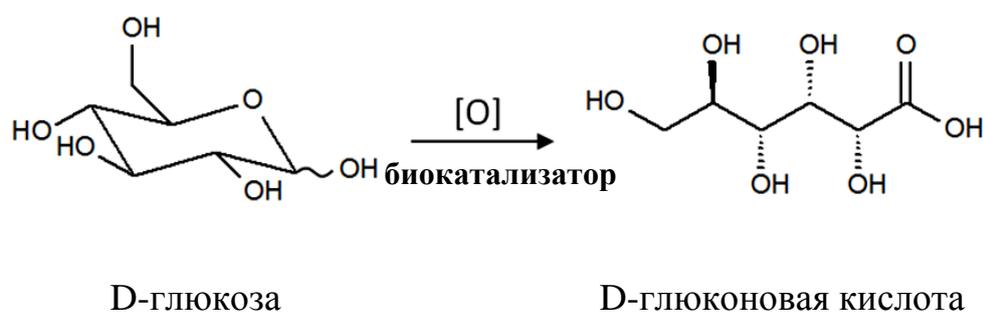


Рисунок 2.5. – Схема окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии биокатализатора

#### 2.4.1. Методика окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов на основе диоксида кремния и оксида алюминия

Процесс окисления D-глюкозы проводился при атмосферном давлении. Стекланный реактор термостатировали до температуры 40-80 °С и через штуцер загружали 15 мл фосфатного буфера + D-глюкозы (1г), затем добавляли биокатализатор ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$  или  $\text{SiO}_2/\text{GOx}$ ) массой 0.11 г. Температуру реакционной смеси поддерживали с помощью термостата. Скорость подачи кислорода составляла 400-410 мл/мин. Устанавливали перемешивание реакционной смеси на магнитной мешалке со скоростью вращения 350 об/мин (рисунок 2.6).

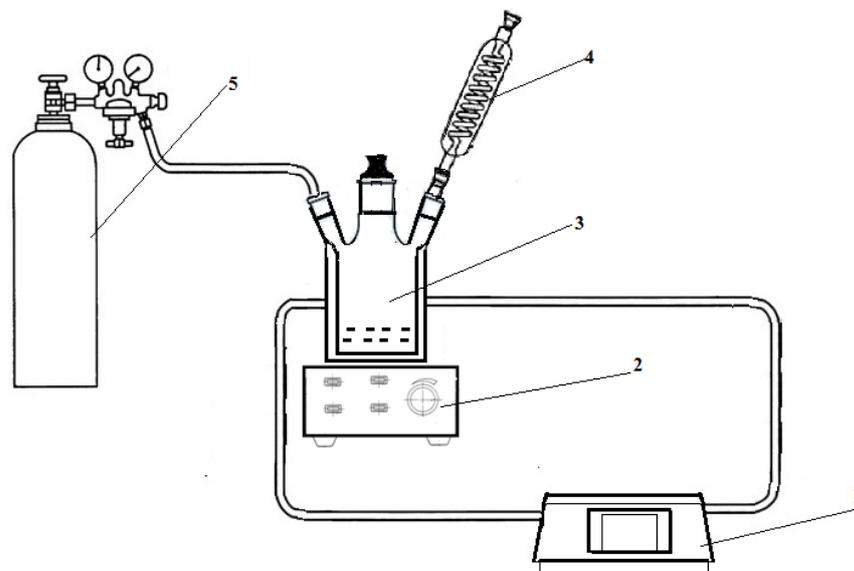


Рисунок 2.6. – Схема установки для проведения процесса окисления D-глюкозы: 1 - термостат, 2 – магнитная мешалка , 3 – стеклянный реактор 4 – холодильник мотор стеклянной мешалки , 5 –баллон с кислородом

#### 2.4.2. Методика окисления D-глюкозы в присутствии магнитоотделяемых биокатализаторов

Процесс окисления D-глюкозы проводили при атмосферном давлении в течение одного часа в термостатированной круглодонной трехгорлой колбе в присутствии магнитных биокатализаторов. Температуру поддерживали 40-80<sup>0</sup>С с помощью термостата с помощью подачи теплоносителя в рубашку колбы. В круглодонную трехгорлую колбу загружали 15 мл фосфатного буфера + D-глюкозу (1.0 г), затем добавляли полученный биокатализатор (0,11г). Скорость подачи кислорода составляла 400-410 мл/мин. Устанавливали перемешивание реакционной смеси стеклянной мешалкой со скоростью вращения 80 об/мин (Рисунок 2.7).

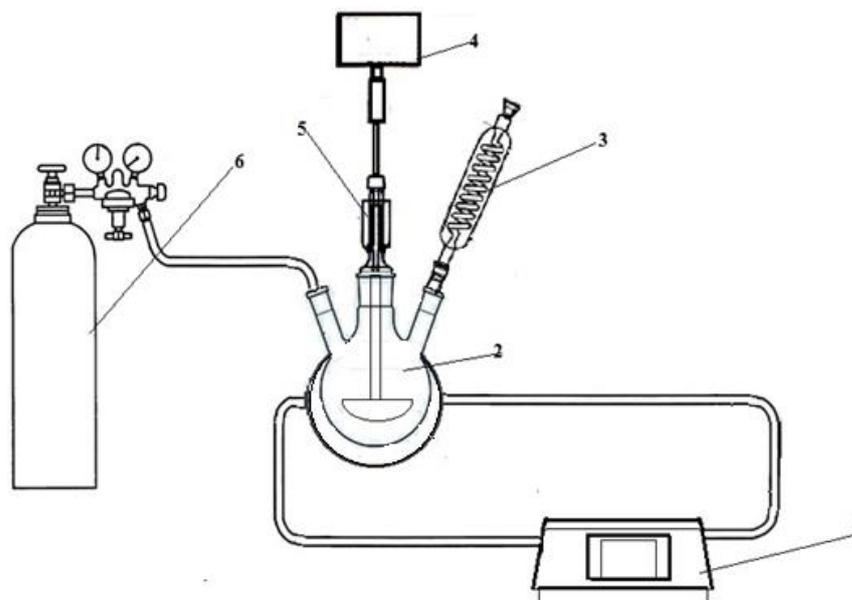


Рисунок 2.7. – Схема установки для проведения процесса окисления D-глюкозы: 1 - термостат, 2 – круглодонная трехгорлая колба , 3 - холодильник 4 – мотор стеклянной мешалки , 5 – стеклянная мешалка, 6 – баллон с кислородом

## 2.5. Методика анализа реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Анализ реакционной смеси проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В ходе анализа использовали ВЭЖХ установку Ultimate 3000 (Dionex), оборудованную ультрафиолетовым датчиком, масспектрометром – API-2000 (Applied Biosystems), аналитической колонкой Luna C18 (7 мкм) с теоретическим числом тарелок 40000 и размером 150 мм. Детектирование осуществлялось УФ детектором на длине волны 254 нм. Температура колонки составляла 25 °С. Раствор серной кислоты (500 мкмоль/л) с давлением 6.5 МПа и расходом 0.5 мл/мин применяли в качестве элюента. Время проведения анализа для одной пробы составляло 40 минут.

На рисунке 2.8. показана полученная хроматограмма продуктов при окислении D-глюкозы с помощью полученных биокатализаторов на основе GOx

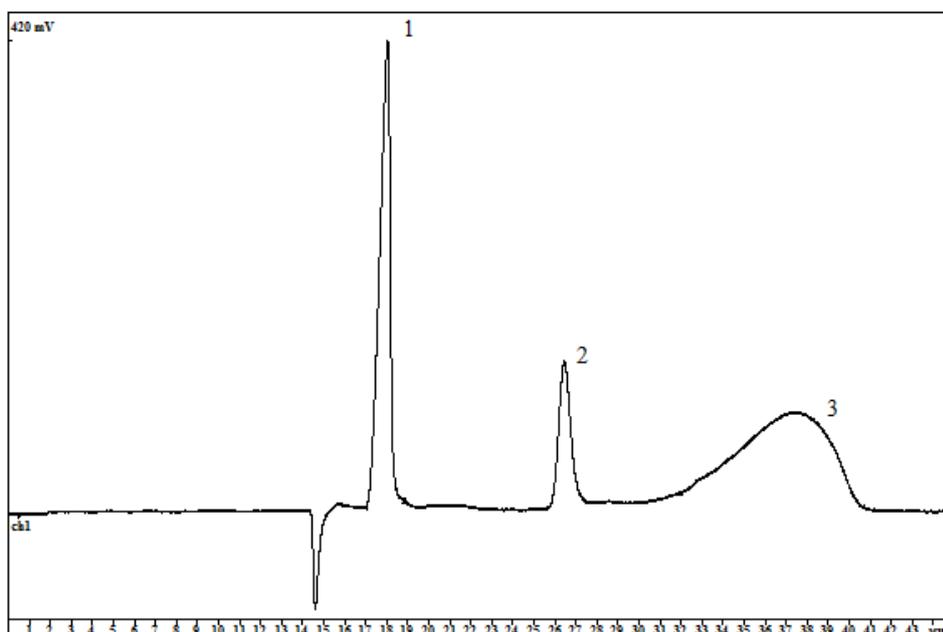


Рисунок 2.8. – Хроматограмма полученных продуктов при окислении D-глюкозы (1-пик глюкозы, 2 – пик фосфатного буфера, 3 пик – глюконовой кислоты)

Дополнительные продукты и промежуточные продукты реакции не были обнаружены в реакционной смеси, что может быть объяснено высокой субстратной специфичностью GOx.

## 2.6. Методика расчета кинетических параметров

Для осуществления каталитического действия фермент должен вступить в соединение с субстратом. Образующиеся промежуточные соединения ферментов с субстратами крайне неустойчивы; образование их может быть показано с помощью спектральных методов: изучением спектров поглощения одного фермента и того же фермента в присутствии субстрата, на который он

действует. Образование промежуточного соединения между ферментом и субстратом вызывает значительное изменение спектра поглощения. Суждение об образовании промежуточного соединения фермент-субстрат было развито Михаэлисом Л. и его сотрудницей Ментен М.

Из гипотезы, что одна молекула субстрата реагирует с одной молекулой фермента было получено уравнение Михаэлиса-Ментен.

$$V = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

где  $V$  – начальная скорость реакции,  $V_{max}$  – максимальная скорость реакции при бесконечно большой концентрации субстрата;  $K_m$  – константа Михаэлиса;  $[S]$  – начальная концентрация субстрата. Данное уравнение является уравнением Михаэлиса-Ментен.

Лайнуивером и Берком уравнение Михаэлиса-Ментен было преобразовано с помощью метода двойных обратных величин.

В таком случае уравнение Михаэлиса-Ментен преобразовано следующим образом:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Данное уравнение является уравнением Лайнуивера-Берка или уравнением Михаэлиса-Ментен, преобразованным методом двойных обратных величин.

Обработывая экспериментальные данные методом двойных обратных величин, можно получить зависимость между скоростью реакции и концентрацией субстрата в виде прямых, имеющих разный наклон и, в соответствии с условиями протекания реакции, отсекающих разные отрезки от оси абсцисс и от оси ординат.

Константа Михаэлиса может быть представлена графически, как это показано на рисунке 2.9.

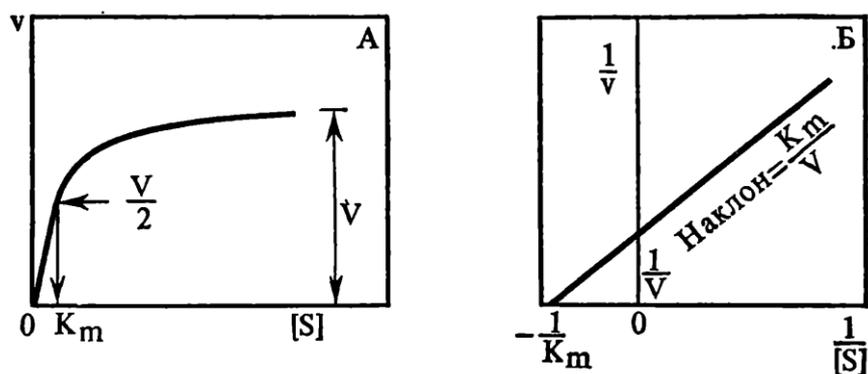


Рисунок 2.9. – Графическое изображение константы Михаэлиса (А) и графический способ нахождения константы Михаэлиса методом Лайнуивера-Бёрка (Б)

Из рисунка видно, что на оси абсцисс размещают концентрация субстрата, а по оси ординат — скорость реакции. Если отметить на этом графике скорость, равную половине максимальной, то соответствующий отрезок на оси абсцисс будет равен константе Михаэлиса. Пользуясь подобным графиком, можно найти значение  $K_m$  того или иного фермента.

Метод Лайнуивера-Берка часто используется для получения кинетических параметров, характеризующих ферменты, так уравнение Михаэлиса-Ментен используют при самых коротких сроках действия фермента [100].

## 2.7. Физико-химические методы исследования образцов биокатализаторов

### 2.7.1. Методика измерения намагниченности

Исследования процессов перемагничивания, а также измерение магнитных характеристик объектов исследования было проведено в открытой магнитной цепи методом вибрационного магнитометра. В основу измерительной схемы вибромагнитометра положен индукционно-непрерывный

метод, который основан на измерении ЭДС индукции, возникающей в системе специальных измерительных катушек при изменении магнитного потока, создаваемого образцом. Изменение магнитного потока достигается путем вибрации образца относительно измерительных катушек.

Для измерения магнитных характеристик и кривых намагничивания образцов исследования была использована установка, созданная на кафедре физики конденсированного состояния ТвГУ на основе вибрационного магнитометра.

Измерения намагниченности образцов на вибрационном магнитометре проводятся путем сравнения с намагниченностью эталонного образца. В данной работе использовался эталон из отожденного никеля массой  $100 \pm 1$  мг, для которого магнитный момент единицы массы известен с достаточной точностью –  $55,3 \text{ Гс} \cdot \text{см}^3/\text{г}$  в поле  $10 \text{ кЭ}$  при комнатной температуре.

Максимальная погрешность измерения магнитного момента единицы массы определяется как:

$$\delta M = \delta CO + \delta ИУ,$$

где  $\delta CO$  – погрешность аттестации эталонного образца, а  $\delta ИУ$  – погрешность измерительного устройства. В связи с отсутствием аттестованных стандартных образцов магнитного момента, погрешность измерения оценивается по отношению к эталонному образцу, не превышает  $1,5 \%$ .

Точность измерения перемагничивающего поля определяется в основном параметрами преобразователя Холла и не превышает  $2,5 \%$ .

Источником постоянного магнитного поля являлся электромагнит с максимальной величиной поля  $\pm 26 \text{ кЭ}$  в рабочем зазоре  $30 \text{ мм}$ , питание электромагнита позволяло плавно регулировать величину поля. С помощью данной установки возможно определение величины удельной намагниченности образцов, измерение полных и частных петель гистерезиса, кривых возврата и кривых намагничивания под произвольными углами к направлению оси легкого намагничивания образцов.

Установка позволяла измерять величину удельной намагниченности, полные и частные петли гистерезиса, кривые возврата и кривые намагничивания образцов. Температурная приставка к вибрационному магнитометру позволяла осуществлять магнитные измерения при температурах от  $-190^{\circ}\text{C}$  до  $500^{\circ}\text{C}$ . Шток вибрационного магнитометра, к которому крепились исследуемые образцы, представлял собой кварцевую трубку диаметром 4,9 мм. Поскольку исследуемые образцы представляли собой порошки, то была изготовлена специальная насадка на измерительный шток установки, в которую засыпался образец и фиксировался заглушкой. Масса образцов составляла  $60 \pm 20$  мг. Регистрация результатов измерения на установке происходила автоматически с помощью специального программного обеспечения, позволяющего проводить измерения зависимостей удельной намагниченности от напряженности внешнего магнитного поля при различных постоянных температурах и от температуры во внешнем постоянном магнитном поле.

#### 2.7.2. Исследование образцов биокатализаторов методом инфракрасной спектроскопии

Изучение структуры многокомпонентных биокатализаторов проводилось с использованием ИК-Фурье спектрофотометра нового поколения IR Prestige 21, снабженный приставкой диффузного отражения, позволяющей анализировать неоднородные образцы с высокой точностью в спектральном диапазоне  $7800\text{-}350\text{ см}^{-1}$ .

Высокая чувствительность обеспечивалась за счет специального керамического источника излучения, интерферометра с позолоченными зеркалами и термостабилизированного детектора DLATGS для средней инфракрасной области. Переключение рабочих областей инфракрасного излучения (NIR – MIR – FIR) осуществлялось путем установки программно – распознаваемых светоделителей с автоматической сменой источников излучения и детекторов. Программное обеспечение IRsolution осуществлялось

путем установки программно – распознаваемых светоделителей с автоматической сменой источников излучения и детекторов.

Для анализа многокомпонентных образцов биокатализаторов использовали следующие характеристики ИК-Фурье спектрометра: интерферометр – интерферометр Майкельсона со смежным углом в 30 град. с электромагнитным приводом и цифровой динамической юстровкой, оптическая система – однолучевая, светоделители – германиевое покрытие KBr пластин в средней области ИК-спектра, источник излучения – высокоинтенсивный керамический для Middle/Far IR, галогеновая лампа. В качестве фонового спектра применяли спектр образца в виде порошка KBr (марки «чистый для анализа», ЧДА), измельченного до фракции менее 2 мкм.

Программное обеспечение IRsolution автоматически распознает используемые приставки с включением меню параметров измерений и соответствует требованиям GLP / GMP, FDA 21 САР Part 11 и ISO 9000.

Программа IRSolution включает функции настройки прибора, сбора и обработки данных, количественный анализ, формирование собственных библиотек спектров, возможности идентификации соединений по собственным или стандартным библиотекам спектров и конвертации форматов спектральных файлов для использования различных поисковых систем. Кроме того, программа автоматически распознает используемые приставки с включением необходимых меню и параметров измерений. [101]

### 2.7.3. Исследование поверхности биокатализаторов методом низкотемпературной адсорбции азота

Исследование полученных биокатализаторов проводились методом низкотемпературной адсорбции.

Сущность метода низкотемпературной адсорбции азота состоит в анализе сорбции газа твердым телом при постоянной криогенной температуре и постепенном повышении давления.

Образец исследуемого вещества предварительно очищается путем нагрева в условиях вакуума либо путем продувки в динамической газовой атмосфере. После очистки в ячейку с образцом подается небольшое количество газа-адсорбата, молекулы которого конденсируются на поверхности образца, постепенно образуя монослой. По количеству газа, ушедшего на образование монослоя, зная поперечное сечение его молекул и массу образца, можно судить о величине удельной поверхности этого материала. Результат анализа представляется в виде графика изотермы адсорбции. Для расчёта удельной поверхности, используется теория БЭТ (Brunauer, Emmet, Teller) [102].

Исследование поверхности биокатализаторов методом низкотемпературной адсорбции азота проводят на следующем оборудовании:

1. Анализатор площади поверхности и распределения пор по размерам: BECKMAN COULTER™ SA 3100™ (COULTER CORPORATION, Miami, Florida).
2. Прибор подготовки образцов: BECKMAN COULTER™ SA-PREP™ (COULTER CORPORATION, Miami, Florida).
3. Весы электронные GX-200 (A&D Company, Limited, Tokyo, Japan).

Исследование поверхности твердых образцов включают следующие работы:

1) Стандартизация образца

Промывка образцов последовательно дистиллированной водой и этиловым спиртом. Время каждой промывки ~ 15 мин. Перемешивание – качание со скоростью 150 кач/мин. Промывная жидкость сливается декантацией. Сушка в термощкафу при температуре до + 200°C. Время сушки обычно 60 – 120 мин.

Стандартизованный образец поступает на A-PREP™.

2) Подготовка образца на SA-PREP™

Навеска стандартизованного образца (0.1 – 3.0 г) помещается в кварцевую предварительно взвешенную кювету, которая устанавливается в прибор подготовки образца SA-PREP™. Сушка проводится в токе азота особой

чистоты (99,999%, ГОСТ 9293-74), при температуре до + 400 °С. Время сушки обычно составляет 60 – 180 мин.

Подготовленный образец поступает в порт дегазации прибора SA 3100™.

3) Дегазация образца на приборе SA 3100™.

Кварцевая кювета с образцом устанавливается в порт дегазации SA-PREP™.

Температура – до + 350 °С; вакуум – 0. 00 мм. рт. ст.

По истечении указанного времени и охлаждения кювета взвешивается.

Далее кювета с образцом устанавливается в аналитический порт.

4) Анализ на приборе SA 3100™

Исследование поверхности образца включает несколько последовательных анализов.

А) Предварительный анализ. Для определения типа образца (микро-, мезо- или макропористый) проводятся измерения в диапазоне относительных давлений от 0 – 0.995.

Распределение пор 3 до 200 нм. Толщина пленки на t-графике средняя 0.4 – 0.6 нм. На основании полученной изотермы и данных по пористости делается вывод о типе образца.

Получение некорректного описания из данных t-графика свидетельствует о значительной доле микропор в образце.

Результат – графический и текстовый материал, изотерма адсорбции-десорбции; зависимость Ленгмюра; зависимость БЭТ; t-график; распределение пор по объему; распределение пор по площади.

Б) Если образец содержит значительную долю микропор проводятся измерения в диапазоне относительных давлений 0.005 – 0.05. Толщина пленки 0.5 – 0.7 нм. Распределение пор в диапазоне 3 – 200 нм.

Результат: графический и текстовый материал: изотерма адсорбции-десорбции; зависимость Ленгмюра; зависимость БЭТ; t-график; распределение пор по объему; распределение пор по площади.

В) Если образец мезо-, макропористый и получены некорректные данные (БЭТ, Ленгмюр, t-график) проводятся измерения в диапазоне относительных давлений 0.05 – 0.2. Толщина пленки 0.35 – 0.5 нм.

Результат: графический и текстовый материал: изотерма адсорбции-десорбции; зависимость Ленгмюра; зависимость БЭТ; t-график; распределение пор по объему; распределение пор по площади.

Г) Для получения более подробных данных по распределению пор, проводятся измерения в одном из диапазонов: 3 – 10, 3 – 20, 3 – 40, 10 – 100, 3 – 200 нм.

Результат: графический и текстовый материал: изотерма адсорбции-десорбции; зависимость Ленгмюра; зависимость БЭТ; t-график; распределение пор по объему; распределение пор по площади.

#### 2.7.4. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия образцов биокатализаторов

Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС) основана на явлении фотоэффекта с использованием монохроматического рентгеновского излучения и позволяет определять энергии электронных уровней на основании измеренных кинетических энергий фотоэлектронов. Распределение эмитированных фотоэлектронов по кинетическим энергиям представляет собой фотоэлектронный спектр. Спектры рентгеновской фотоэмиссии несут в себе ценную информацию о природе химической связи изучаемых элементов и соединений. Интенсивность фотоэлектронных линий в спектре отражает плотность занятых электронных состояний в приповерхностном слое.

В результате взаимодействия с налетающим квантом в одной из внутренних или внешних оболочек атома или молекулы образуется электронная вакансия ("дырка"), а вне системы появляется выбитый электрон. С помощью РФЭС можно исследовать без разрушения образца поверхность твердых тел, адсорбированные на ней молекулы, поверхностные процессы

(коррозия, адсорбция, катализ и т. п.). Глубина выхода фотоэлектронов из образца составляет не более 5 нм (500 Å) или 10-15 монослоев атомов, поэтому метод чувствителен только к верхнему поверхностному слою. Важно, чтобы вещество не было покрыто чужеродной пленкой.

На основании зависимости энергии связи от эффективного заряда, степени окисления и характера химической связи изучаемого атома с соседними атомами можно изучать электронные и геометрические характеристики химических соединений.

Метод РФЭС позволяет исследовать и определять в химическом соединении все элементы, кроме водорода и гелия, в любом агрегатном состоянии. Обычно эксперимент проводят с твердыми веществами в виде порошков или пластин. Для исследования легколетучих образцов или жидкостей прибегают к замораживанию. Если для возбуждения фотоэлектронов используется рентгеновское излучение, то спектры фотоэлектронов называются рентгеноэлектронными спектрами (РЭС) или рентгенофотоэлектронными спектрами (РФЭС).

Выявление тонких деталей в изменении электронной структуры проводится измерением химических сдвигов (химсдвигов) уровней электронных оболочек, обусловленных изменением плотности состояний в энергетических зонах. Являясь основной практической ценностью РФЭС, химсдвиги фотоэлектронных линий порождаются различным химическим и электронным окружением атомов и обуславливаются эффектом начального состояния, а также эффектом релаксации.

Анализ химических сдвигов помогает изучать адсорбцию веществ и позволяет судить о протекании различных стадий соответствующих химических реакций. РФЭС используется для исследования хемосорбции и катализа на металлах, как один из способов определения элементного состава поверхности. Так как частицы, взаимодействующие с поверхностью, часто подвергаются химическим превращениям, важной проблемой в анализе

хемосорбционных систем является определение молекулярного состава адсорбатов.

Физические принципы, лежащие в основе интерпретации экспериментально наблюдаемых химических сдвигов, сводятся к различным моделям, учитывающим добавление или удаление заряда в валентной оболочке.

Фотоэлектронные спектры были получены с предварительно дегазированных в вакууме образцов с помощью модернизированного электронного спектрометра ЭС – 2403 СКБ АП РАН, оснащенного анализатором энергии PNOIBOS 100-5MCD (производство Specs GmbH, Германия) и рентгеновским источником MgK $\alpha$ /AlK $\alpha$  XR-50 (производство Specs GmbH, Германия). Для фотоэлектронного возбуждения использовалось характеристическое излучение MgK $\alpha$  мощностью 250 Вт. Спектры записаны при давлении не выше  $3 \cdot 10^{-6}$  Па. Обзорные спектры были получены в диапазоне 1100-0 эВ с шагом по энергии 0.5 эВ и выдержкой в точке 0.4 с; энергия пропускания анализатора составляла 40 эВ, что соответствует 1.4 эВ ПШПВ фотоэлектронной полосы стандарта Ag 3d $_{5/2}$ . Спектры высокого разрешения получены с шагом по энергии 0.05 эВ; энергия пропускания анализатора составляла 7 эВ, что соответствует 0.85 эВ ПШПВ фотоэлектронной полосы стандарта Ag 3d $_{5/2}$ . Спектры получены с использованием стандартного программного обеспечения SpecsLab2. Для анализа спектров был применен программный пакет CasaXPS.

Модельное разложение спектров высокого разрешения с целью выделения индивидуальных состояний проводилось с учетом таких характеристик фотоэлектронных подуровней как энергия связи компонентов, соотношение площадей компонентов, внутридублетное расщепление. В качестве модельного фона был выбран фон по Ширли. Минимизация проводилась по методу Левенберга-Марквардта.

### 2.7.5. Просвечивающая электронная микроскопия образцов биокатализаторов

Анализ образцов биокатализаторов методом просвечивающей электронной микроскопии был выполнен на химическом факультете университета Индианы (США) на приборе JEOL JEM1010. Образцы для трансмиссионной электронной микроскопии были приготовлены путем размещения капли образца на подложке из сетки Cu с углеродом. Изображения были получены с ускоряющим напряжением 80 кВ. Для оценки диаметров наночастиц изображения были проанализированы с помощью пакета обработки изображений ImageJ.

### 2.7.6. Сканирующая электронная микроскопия образцов биокатализаторов

Анализ образцов биокатализаторов методом сканирующей электронной микроскопии был выполнен на химическом факультете университета Индианы (США). Для сканирующей электронной микроскопии (SEM) образцы подвергались каплеобразованию на алюминиевых SEM-пластинах. Образцы покрывали распылением с использованием Polaron Equipment Ltd., SEM-покрытия E5100, с использованием золота/палладия (Au 60%, Pd 40%) в течение 2 мин при 20 мА для покрытия приблизительно 30 нм. Результаты были отображены на приборе FEI Quanta 600F с помощью детектора Everhart Thornley с ускоряющим потенциалом 10 кВ.

## ГЛАВА ТРЕТЬЯ. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Результаты физико-химического исследования носителей и биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Синтез магнитных частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  осуществлялся по методикам, представленным в разделе 2.3 данной работы. Методом соосаждения был синтезирован образец  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ , другие образцы ( $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ ) получены полиольным способом (в качестве полиола использовался этиленгликоль). Носитель  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$  отличается от  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$  временем выдерживания при 200 °С, 2 часа и 48 часов соответственно. Образец  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$  отличается от  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$  количеством этиленгликоля (стабилизатора МНЧ), 30 и 20 мл соответственно.

#### 3.1.1. Данные просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей микроскопии образцов $\text{Fe}_3\text{O}_4$

В результате использования просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) были получены микрофотографии синтезированных наночастиц магнетита  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . На рисунке 3.1. представлены микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии магнитных наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , полученных различными методами.

МНЧ синтезированные методом соосаждения  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$  (изображение ПЭМ, рисунок 3.1 (а)) имеют смешанную структуру, частицы имеют неоднородную форму без четких границ. Частицы магнетита, полученные полиольным способом ( $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ ), в отличие от МНЧ, полученных методом соосаждения имеют сферическую форму, но различаются между собой по размеру при варьировании параметров синтеза (изображение ПЭМ, рисунок 3.1(б-г)).

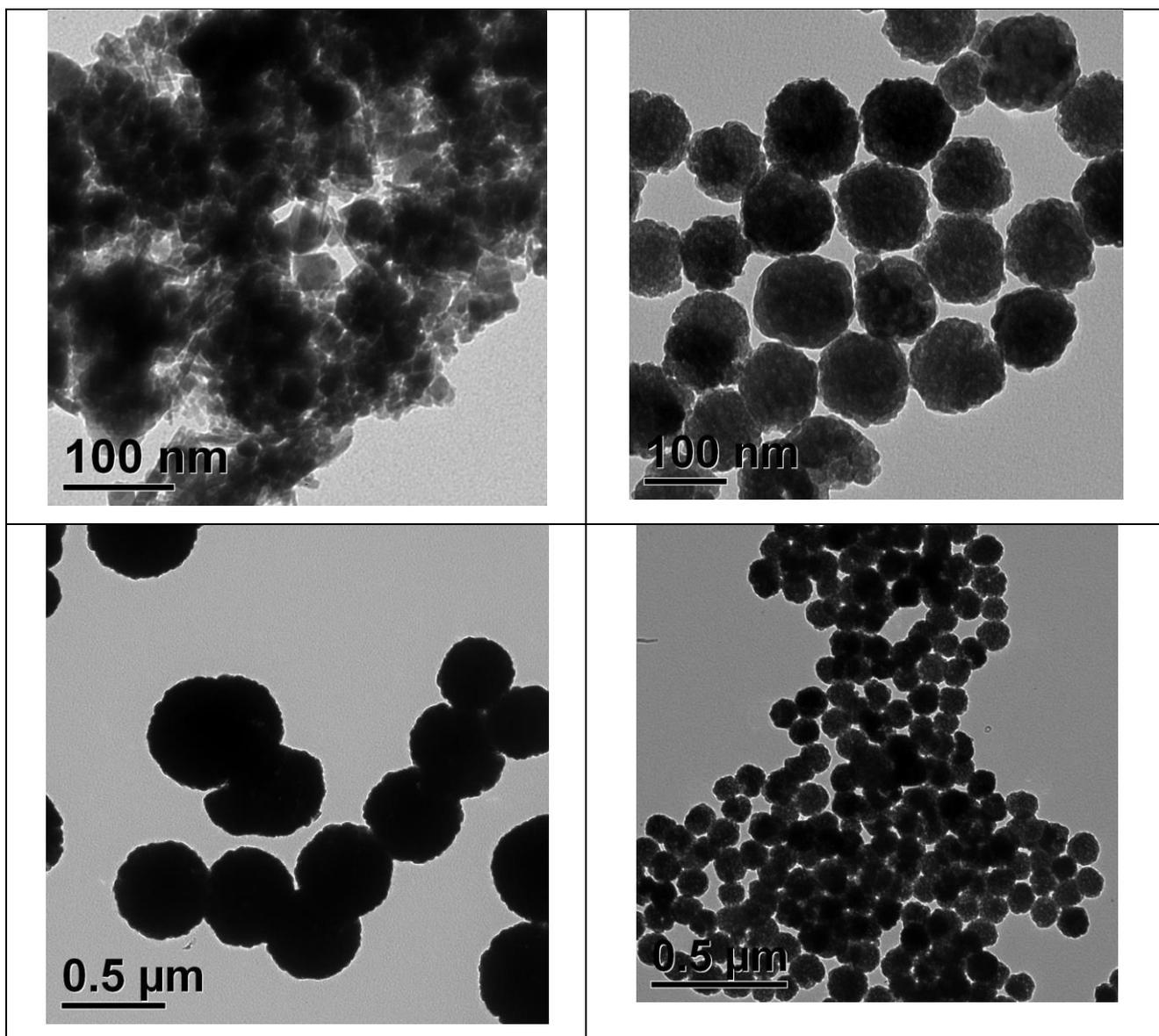


Рисунок 3.1. – Микрофотографии магнитных наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии: а)  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$  б)  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$  в)  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$  г)  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ .

Наночастицы синтезированные полиольным методом  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$  с этиленгликолем, в качестве полиола (изображение ПЭМ, рисунок 3.1(б)) имеют сферообразную форму, в виде «ежиков» (игольчатое очертание поверхности) со средним размером частиц  $111 \pm 5$  нм. Время выдерживания при  $200^\circ\text{C}$  в синтезе  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$  составляло 2 часа. При увеличении времени выдерживания до 48 часов

(образцы  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ ) размер МНЧ увеличивается и поверхность имеет более сглаженные очертания (изображение ПЭМ, рисунок 3.1(в, г)). В случае полиольного синтеза, формируются наночастицы оксидов железа, с последующей агрегацией в более крупные частицы. Варьируя количество этиленгликоля, т.е, изменяя мольное соотношение  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : этиленгликоль, изменяется размер агрегатов наночастиц оксидов железа. Изображения ПЭМ на рисунке 3.1 (в, г). показывают агрегаты наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  с диаметром  $430 \pm 60$  нм ( $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ ) и диаметром  $285 \pm 71$  нм ( $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ ). Изображение ПЭМ (рисунок 3.1 (в, г)) ясно показывает, что агрегаты состоят из отдельных наночастиц диаметром  $\sim 42$ - $45$  нм. Таким образом, были определены оптимальные условия для синтеза МНЧ полиольным способом, а именно выдерживание МНЧ 48 часов при  $200^\circ\text{C}$ . Из представленных данных видно, что при уменьшении количества этиленгликоля, размер частиц уменьшается. Видимо, большее содержание полиола способствует агрегации наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Известно, что МНЧ обладают суперпарамагнитными свойствами, при размерах до 500 нм, тогда как частицы размера больше, чем 500 нм – ферромагнитными свойствами. Полученные в работе наночастицы оксида железа имеют размер менее 500 нм, а значит, все образцы обладают суперпарамагнитными свойствами [103].

### 3.1.2. Данные просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии образцов $\text{Fe}_3\text{O}_4$ после модификации TEOS и APTES

Полученные частицы магнетита модифицировали 1) TEOS для увеличения гидроксильных групп 2) APTES для формирования аминогрупп, на поверхности МНЧ. Модификация проводилась в соответствии с методикой, представленной в разделе 2.3.2. Полученные образцы модифицированных частиц магнетита исследовали методами ПЭМ и СЭМ. Результаты представлены на рисунке 3.2 на примере модифицированных образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ .

Изображения СЭМ и ПЭМ образцов наночастиц магнетита, покрытых TEOS, а затем модифицированных с помощью APTES, представлены на рисунке 3.2. (a,b). СЭМ-изображение  $Fe_3O_4(3)$  (рис. 3.2. a) показывает, что после нанесения  $Si(OH)_4$ , поверхность становится гладкой. Слой гидроксида кремния хорошо виден в изображении ПЭМ этого образца (рис. 3.2.с) и имеет толщину приблизительно 27 нм. СЭМ-изображение модифицированного образца  $Fe_3O_4(4)$  (рис. 3.2.b), показывает, что толщина слоя оксида кремния возрастает до  $\sim 32$  нм (рис. 3.2. d), а это способствует увеличению количества аминогрупп на поверхности, после дальнейшей модификации APTES образца  $Fe_3O_4(4)$ .

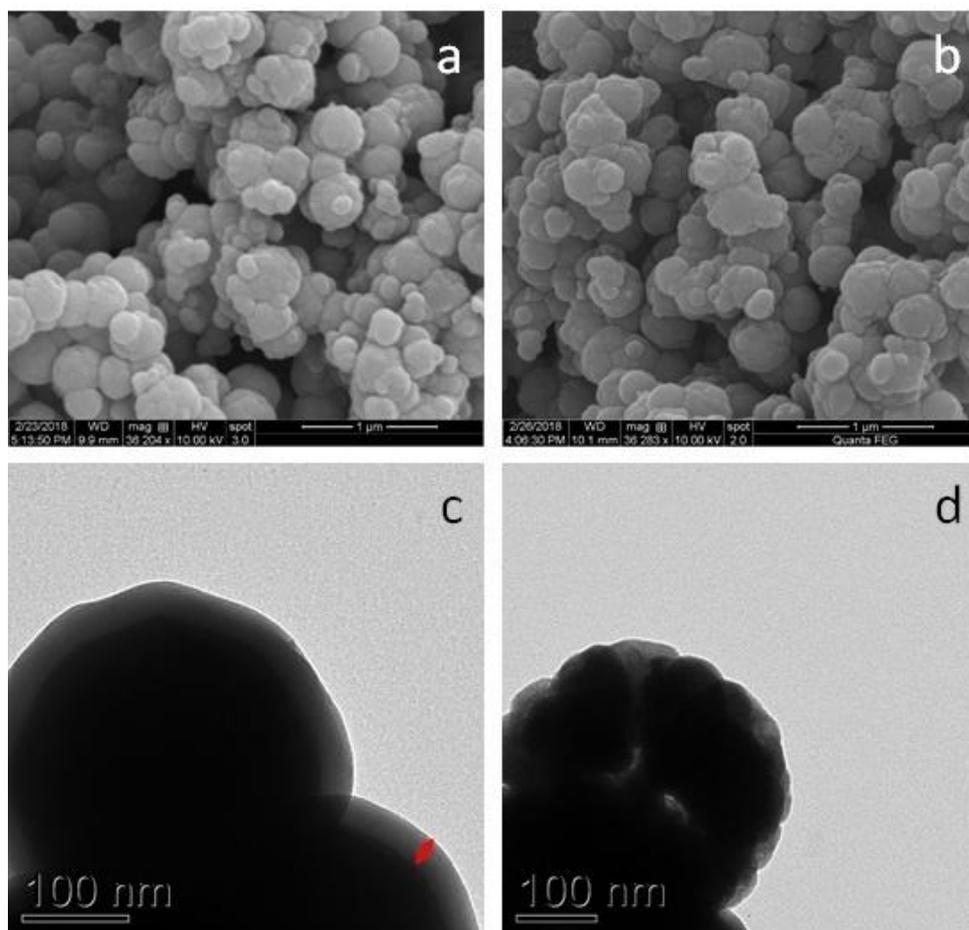


Рисунок 3.2. – Микрофотографии магнитных наночастиц, модифицированных TEOS и APTES, СЭМ (a,b) и ПЭМ (c,d): a, c  $Fe_3O_4(3)$  b,d  $Fe_3O_4(4)$

### 3.1.3. Данные энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS) биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Ковалентное связывание фермента GOx на поверхности магнитоотделяемого носителя проводили с использованием сшивающего агента – глутарового альдегида в соответствии с методикой, представленной в разделе 2.3.2. Схема модификации носителя представлена на рис. 2.3. Пришивка фермента осуществляется в результате смешивания в течение 1 часа с уже модифицированным носителем, в соответствии с методикой, представленной в разделе 2.3.3. Фермент GOx ковалентно связывается на поверхности модифицированного носителя (рис.2.4.), в результате взаимодействия между функциональными группами GOx и носителя. STEM-изображение темного поля и карты EDS биокатализатора  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$ , представлены на рисунке 3.3.

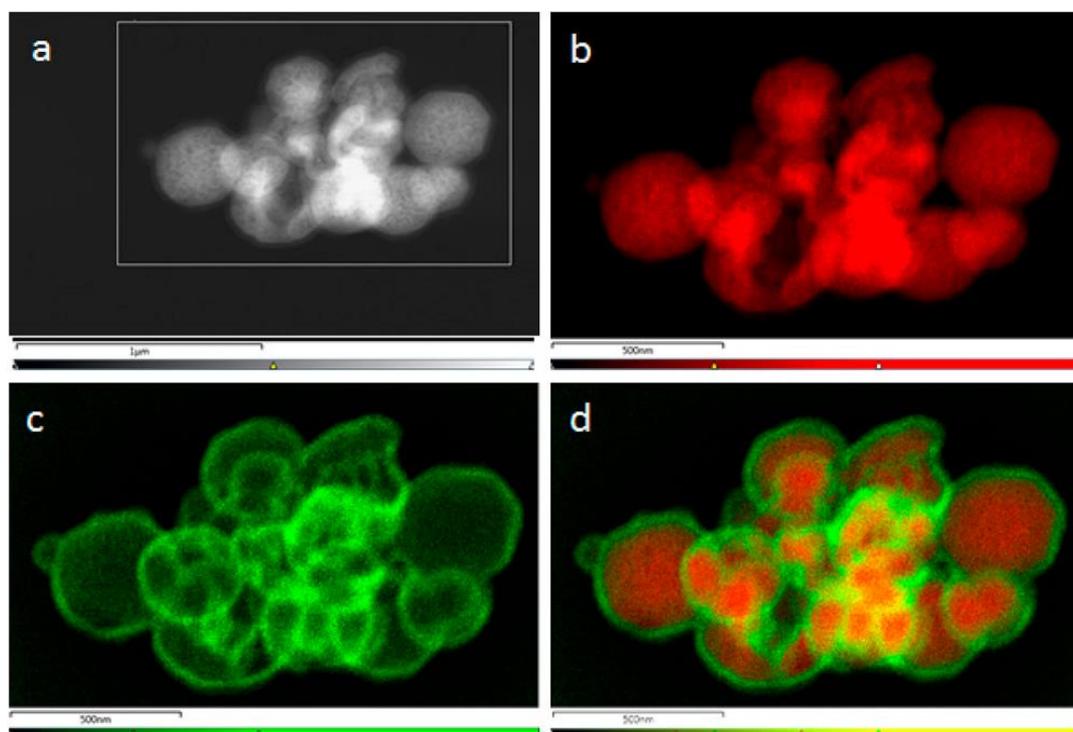


Рисунок 3.3. – STEM -изображение темного поля (a) и карты EDS агрегатов наночастиц оксидов железа для Fe (b), Si (c) и их смесь (d)

Карта EDS Fe показывает, что наночастицы оксидов железа, объединены в агрегаты (аналогично изображению темного поля). Карта EDS Si отображает оболочку из оксида кремния в той же форме, что и агрегаты наночастиц оксида железа. Наложение карт Fe и Si ясно показывает, что частицы содержат ядра Fe и Si оболочки.

### 3.2. Анализ кривых намагничивания исходных носителей и биокатализаторов на основе $Fe_3O_4$

Методом вибрационного магнитометра были определены магнитные свойства исходных носителей и биокатализаторов на основе  $Fe_3O_4$ . Полученные кривые намагничивания исходных носителей и биокатализаторов представлены, как зависимость удельной намагниченности  $M$  магнитных наночастиц  $Fe_3O_4$  от величины магнитного поля  $H$ . Измерения проводили при температуре 295,15 К (рис.3.4 а).

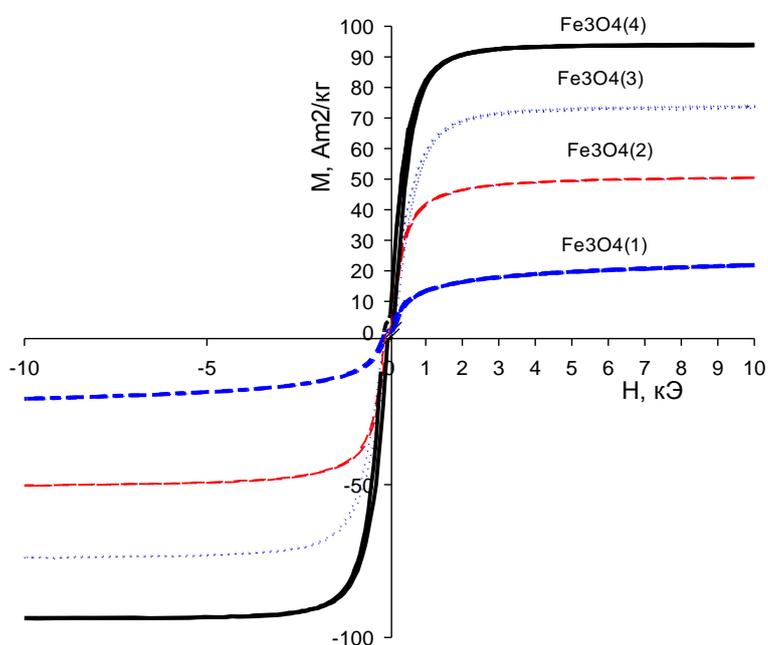


Рисунок 3.4 (а). – Кривые намагничивания и размагничивания при  $T=295,15K$  для исходных МНЧ  $Fe_3O_4$ , полученных разными методами.

Полученные данные, свидетельствуют о том, что исследованные образцы исходных носителей является магнитомягкими ферромагнетиками, т.к. на кривых полностью отсутствует гистерезис. Кривые намагничивания подтверждают, что полученные наночастицы  $Fe_3O_4$ , независимо от способа получения обладают суперпарамагнитными свойствами.

Определены кривые намагничивания носителей на основе  $Fe_3O_4$  при температуре  $40\text{ }^{\circ}C$  ( $313,15\text{ K}$ ), т.к. процесс окисления ГЛ проводился в условиях данной температуры (рис.3.4 б).

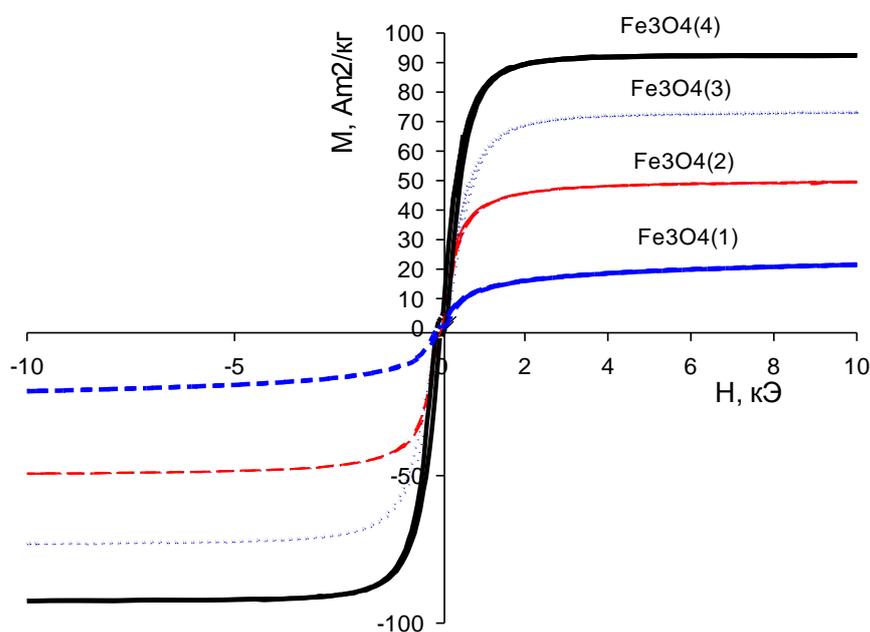


Рисунок 3.4 (б). – Кривые намагничивания и размагничивания при  $T = 313.15\text{ K}$

Результаты намагниченности и величины магнитного поля приведены в таблице 3.1.

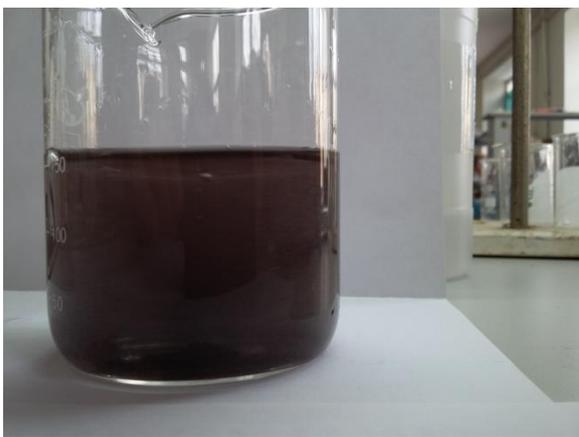
Из полученных данных видно, что при повышении температуры до  $40\text{ }^{\circ}C$  намагниченность и величина магнитного поля незначительно снижаются, так как при постепенном повышении температуры хаотическое тепловое движение магнитных моментов приводит к тому, что их параллельность нарушается. Анализ результатов показывает, что наиболее высокой намагниченностью характеризуются МНЧ, синтезированные полиольным методом, при

повышении температуры обнаруживается незначительное снижение намагниченности и величины магнитного поля. Намагниченность образцов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  при повышении температуры снижается на 1-2,5% , величина магнитного поля – снижается на 0,2-1,2%, но такое незначительное снижение не влияет на суперпарамагнитные свойства образцов.

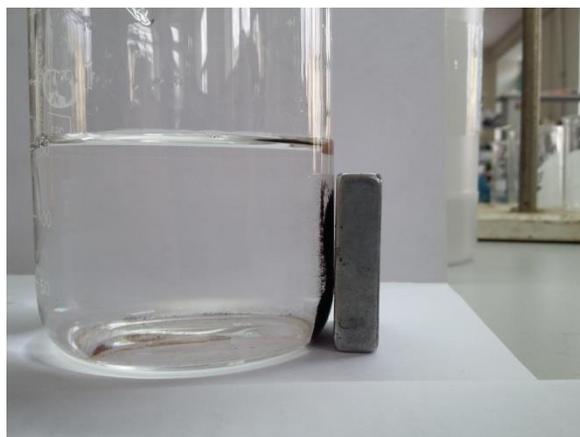
Таблица 3.1. – Результаты намагниченности и величины магнитного поля для носителей на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Образец	Намагниченность М ( $\text{Am}^2/\text{кг}$ ), при температуре 295,15 К	Величина магнитного поля Н, (кЭ) 295,15 К	Намагниченность М ( $\text{Am}^2/\text{кг}$ ), при температуре 313,15К	Величина магнитного поля Н, (кЭ) 313,15 К
$\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$	23,69	19,77	23,28	19,72
$\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$	50,96	14,74	49,64	14,57
$\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$	74,24	20,01	73,72	19,97
$\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$	94,15	20,26	92,80	20,21

Кривые намагничивания были сняты и для биокатализаторов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Для биокатализаторов получены результаты, аналогичные исходным носителям. Полученные данные позволяют сделать вывод, что модификация носителя и пришивка фермента GOx не оказывает влияние на магнитные свойства материала. Таким образом, в данной работе, предложен синтез магнитоотделяемых биокатализаторов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  , которые можно легко отделять от реакционной среды в магнитном поле без применения сложной системы фильтров, что очень важно для проведения процессов в промышленных масштабах. На рисунке 3.5 представлено отделение биокатализатора на основе GOx, иммобилизованной на  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$  от реакционного раствора с помощью неодимового магнита.



а)



б)

Рисунок 3.5. – Отделение биокатализатора на основе GOx, иммобилизованной на  $Fe_3O_4(4)$  от реакционного раствора с помощью неодимового магнита: а) реакционный раствор до отделения биокатализатора, б) реакционный раствор после отделения биокатализатора

### 3.3. ИК-Фурье спектроскопия биокатализаторов

Для изучения образования ковалентной сшивки фермента с носителями проводили исследование полученных биокатализаторов с помощью метода ИК-Фурье спектроскопии диффузного отражения. Для сравнения физико-химических показателей, а затем и каталитических свойств изучались как магнитоотделяемые биокатализаторы на основе  $Fe_3O_4/GOx$ , так биокатализаторы на основе неорганических носителей  $Al_2O_3$  и  $SiO_2$ . Синтез биокатализаторов  $Al_2O_3/APTES/GA/GOx$  ( $Al_2O_3/GOx$ ), и  $SiO_2/APTES/GA/GOx$  ( $SiO_2/GOx$ ), проводили в соответствии с методикой, представленной в разделе 2.2 данной работы.

#### 3.3.1. ИК - Фурье спектроскопия биокатализаторов на основе $Al_2O_3$ , $SiO_2$

На рисунках 3.6-3.7 представлены ИК-спектры следующих образцов:  $Al_2O_3$ ,  $Al_2O_3/APTES$ ,  $Al_2O_3/APTES/GA/GOx$ .

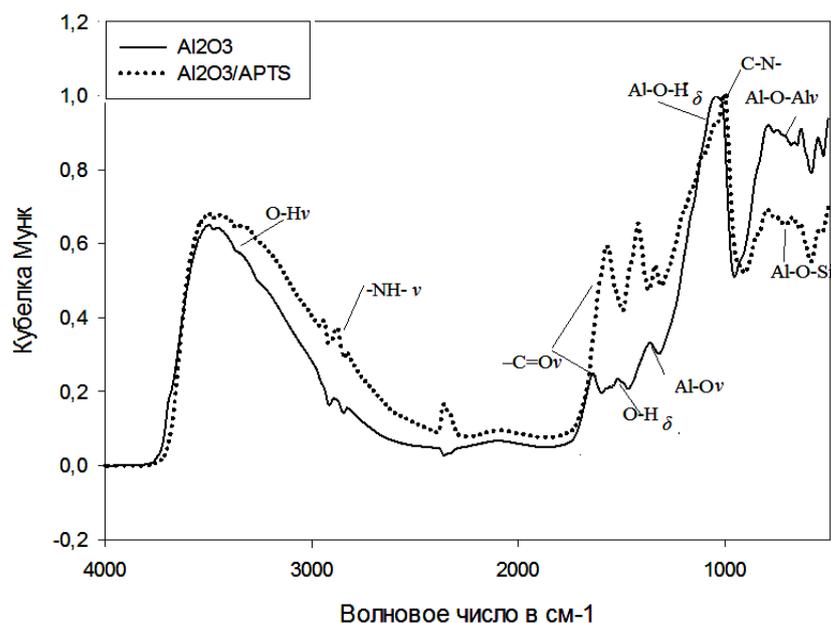


Рисунок 3.6. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}$

В полученном спектре поглощения для образца  $\text{Al}_2\text{O}_3$  отмечаются интенсивные полосы в  $800\text{-}550\text{ см}^{-1}$ , которые указывают на валентные колебания алюмоокислородных мостиков Al-O-Al. Полоса поглощения с волновым числом  $1361\text{ см}^{-1}$  указывает на валентные колебания связи Al-O. Пик в области  $1051\text{ см}^{-1}$  означает наличие деформационных колебаний Al-OH группы. Полосы поглощения в области  $3600\text{-}3490\text{ см}^{-1}$  и  $1500\text{ см}^{-1}$  характерны для  $\text{Al}_2\text{O}_3$  относят к валентным и деформационным колебаниям, которые указывают на свободные OH-группы связанным с двумя октаэдрическими ионами алюминия. Валентные колебания  $\text{-C=O}$ , наблюдаются при  $1650\text{ см}^{-1}$ .

У образца  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}$ , в области полос поглощения в  $800\text{-}550\text{ см}^{-1}$ , происходит замещение на валентную связь Al-O-Si. Вследствие нанесения на поверхность оксида алюминия APTES образуется пик  $1002,98\text{ см}^{-1}$ , который обусловлен вибрацией растяжения C-N- связи. Происходит увеличение полос поглощения области OH-групп  $3600\text{-}3490\text{ см}^{-1}$  и  $1500\text{ см}^{-1}$ . И образование пиков в области  $3000\text{-}2900\text{ см}^{-1}$  обусловлены наличием  $\text{-NH}_2$  группы. Все эти полосы

поглощения доказывают присутствие АРТЕS на поверхности образца  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{АРТЕS}$ .

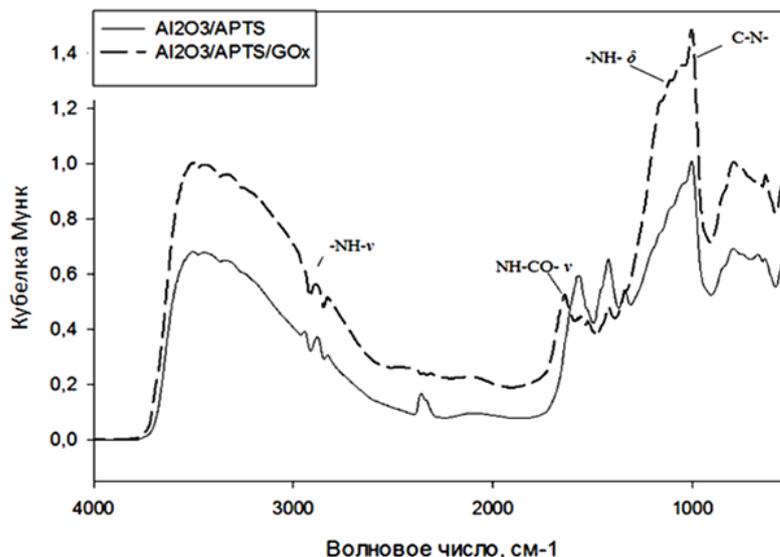


Рисунок 3.7. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{АРТЕS}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{АРТЕS}/\text{GA}/\text{GOx}$

После нанесения GA и связывания GOx видно, что в образце  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{АРТЕS}/\text{GA}/\text{GOx}$  появляются полосы поглощения в области  $3000\text{-}2900\text{ см}^{-1}$  и  $1110\text{-}1050\text{ см}^{-1}$ , вызванные соответственно, валентными и деформационными колебаниями  $\text{-NH-}$  групп фермента GOx. Появляются полосы поглощения в области  $1660\text{-}1639\text{ см}^{-1}$  доказывающие пептидную связь  $\text{NH-CO-}$ , которые перекрывают полосы поглощения валентных колебаний  $\text{-C=O}$ , наблюдаются при  $1650\text{ см}^{-1}$ , что доказывает ковалентное связывание фермента GOx на поверхности  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{АРТЕS}$ .

На рисунках 3.8-3.9 представлены ИК-спектры образцов  $\text{SiO}_2$ :  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2/\text{АРТЕS}$ ,  $\text{SiO}_2/\text{АРТЕS}/\text{GA}/\text{GOx}$ .

В полученном спектре для образца  $\text{SiO}_2$  образуются полоса поглощения  $600\text{-}500\text{ см}^{-1}$ , соответствующая валентным симметричным колебаниям  $\text{Si-Si}$ . Пик в области  $810\text{-}800\text{ см}^{-1}$  обозначает наличие валентных структурных мостиков  $\text{Si-O-Si}$ . Пик в области  $1003\text{ см}^{-1}$  указывает на наличие валентных

симметричных деформационных колебаний Si-O-H. Полосы поглощения в области  $3500-3300\text{ см}^{-1}$  и  $1200\text{ см}^{-1}$  характерны для  $\text{SiO}_2$  относят к валентным и деформационным колебаниям, которые указывают на свободные OH-группы. Полоса поглощения с волновым числом  $1360\text{ см}^{-1}$  указывает на валентные колебания связи Si-O. В образце проявилась полоса поглощения в области  $1900-1850\text{ см}^{-1}$  Si-H. Валентные колебания  $\text{-C=O}$ , наблюдаются при  $1650\text{ см}^{-1}$ .

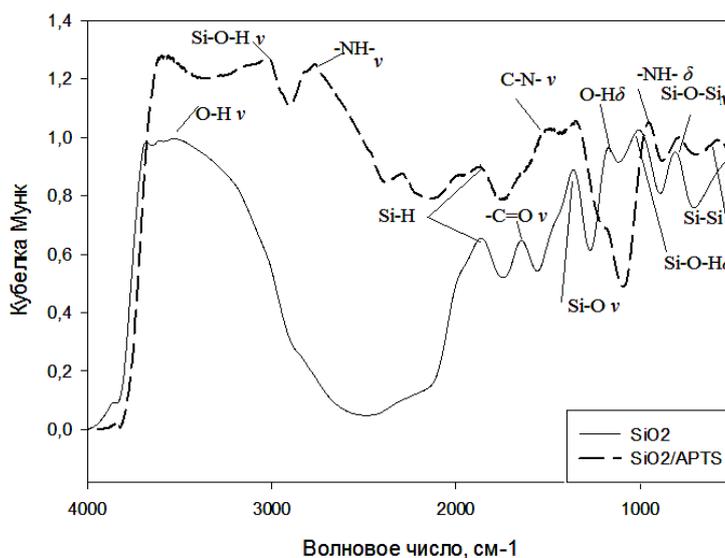


Рисунок 3.8. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2/\text{APTES}$

В образце  $\text{SiO}_2/\text{APTES}$ , в области  $600-500\text{ см}^{-1}$ , происходит увеличение пика отвечающего за симметричные колебания Si-Si. Вследствие нанесения APTES на поверхность образца  $\text{SiO}_2$  образуется пик  $1500\text{ см}^{-1}$  обусловлен вибрацией растяжения C-N- связи. Происходит замещение полос поглощения области OH-групп  $3500-3300\text{ см}^{-1}$  на валентные колебания Si-O-H. И образование пиков в области  $2800-2700\text{ см}^{-1}$  и  $950\text{ см}^{-1}$  валентными и деформационными колебаниями -NH- соответственно, обусловлены наличием  $\text{-NH}_2$  группы. Все эти полосы поглощения доказывают присутствие APTES на поверхности образца  $\text{SiO}_2/\text{APTES}$ .

После модификации  $\text{SiO}_2/\text{APTES}$  глутаровым альдегидом и связывания GOx, на ИК - спектрах видно, что в образце  $\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  появляются

полосы поглощения в области  $3000-2900\text{ см}^{-1}$  и  $1110-1050\text{ см}^{-1}$ , вызванные соответственно, валентными и деформационными колебаниями  $\text{-NH-}$  групп фермента GOx. Появляются полосы поглощения в области  $1660-1600\text{ см}^{-1}$  доказывающие пептидную связь  $\text{NH-CO-}$ , данный факт доказывает ковалентное связывание фермента GOx на поверхность образца  $\text{SiO}_2/\text{APTES}$  при синтезе биокатализатора  $\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$ .

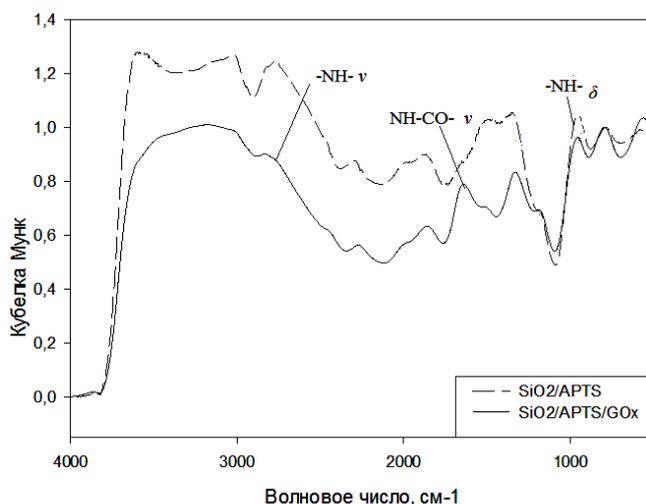


Рисунок 3.9. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{SiO}_2/\text{APTS}$ ,  $\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GOx}$

### 3.3.2. ИК-Фурье спектроскопия биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$

#### 3.3.2.1. ИК-Фурье спектроскопия биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ синтезированных методом соосаждения

Образцы на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , в отличие от образцов на основе  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и  $\text{SiO}_2$  модифицировались TEOS для формирования  $\text{SiO}_2$ -оболочки.

На рисунках 3.10-3.12 представлены ИК-спектры следующих образцов:  
 $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{APTES}$ ,  
 $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$ .

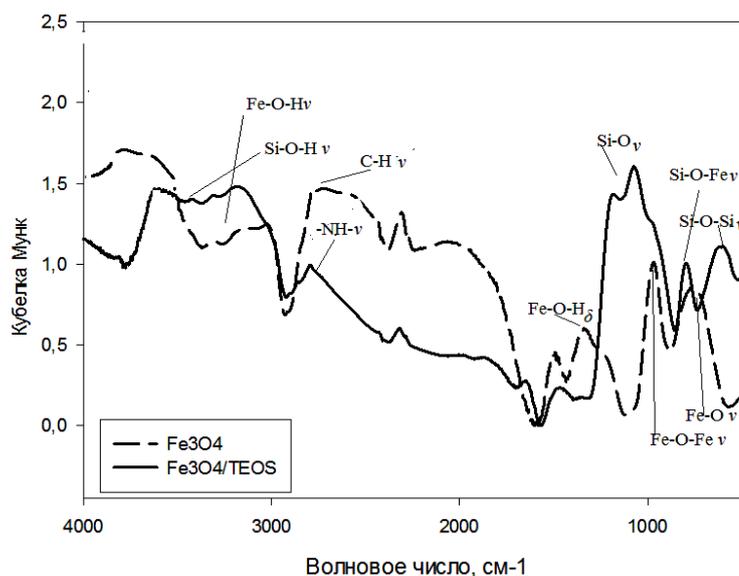


Рисунок 3.10. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}$

В полученном спектре для образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$  отмечаются интенсивные полосы валентные в диапазоне  $3400\text{--}3025\text{ см}^{-1}$  и заметное уменьшение интенсивности линий, соответствующих колебаниям, обусловленным колебанием ОН-групп, а также исчезновение линий, характерных для FeOH и деформационные ( $1332\text{ см}^{-1}$ ) колебаний связей Fe–O–H, что указывает на наличие свободных ОН-групп на поверхности  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Пик в области  $850\text{--}700\text{ см}^{-1}$  обусловлен валентными колебаниями связи Fe–O, а пик  $970\text{ см}^{-1}$  означает наличие валентных структурных мостиков Fe–O–Fe наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

После модификации поверхности образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$  TEOS в ИК-спектре  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}$  образуется пик в области  $700\text{ см}^{-1}$  обозначает наличие валентных структурных мостиков Si–O–Si. А пик в области  $970\text{ см}^{-1}$  отвечающий за колебание связей Fe–O–Fe, в ИК-спектре  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}$  перекрывается колебаниями связей Si–O–Fe. В области  $1070\text{ см}^{-1}$  появляются колебания, отвечающие за валентные колебания Si–O. А образование пика в области  $2800\text{--}2700\text{ см}^{-1}$  обозначает появление валентных колебаний –NH–. Наблюдается образование дополнительных ОН-групп, это доказывает

увеличение колебания полосы поглощения в области 3500-3000  $\text{см}^{-1}$ . Образование поверхностных ОН-групп на наночастицах  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  создает предпосылки к формированию связей Si-O при конденсации силанольных групп в процессе модификации образца TEOS.

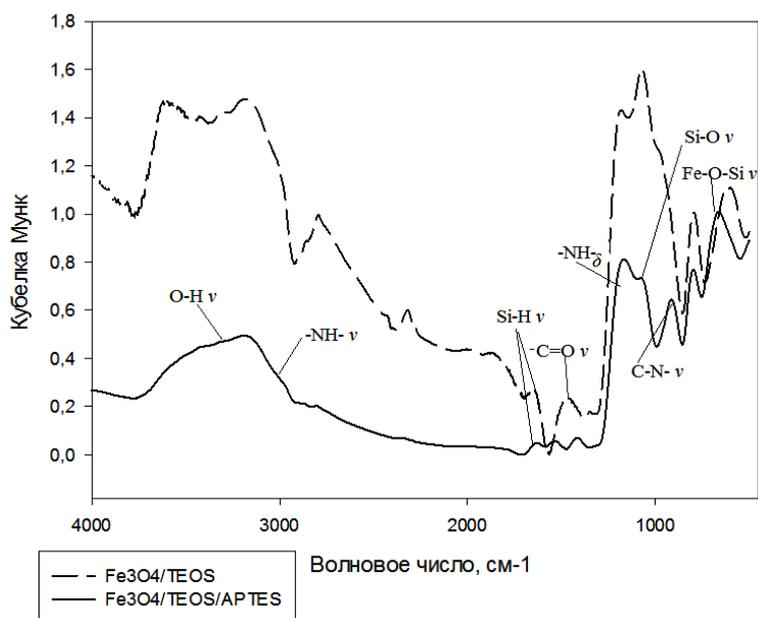


Рисунок 3.11. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS/APTES}$

После модификации образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}$  APTEС, ИК-спектр образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS/APTES}$  появляется перекрытие колебаний в области 800–600  $\text{см}^{-1}$  сформированных связей Si-O-Fe, которые заменены на Fe-O-Si(O-).

Валентные колебания карбоксильной группы  $-\text{C}=\text{O}$ , наблюдаются в области 1650-1550  $\text{см}^{-1}$  уменьшаются. Вследствие нанесения на поверхность  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}$  APTEС образуется пик 990  $\text{см}^{-1}$ , обусловленный вибрацией растяжения C-N- связи, колебание вблизи 1165  $\text{см}^{-1}$  отвечающие валентным колебаниям Si-O-связи уменьшаются.

Происходит уменьшение пика в области 2800-2700  $\text{см}^{-1}$  валентными и появление пика 1110  $\text{см}^{-1}$  и деформационными колебаниями -NH-

соответственно, обусловлены наличием  $\text{-NH}_2$  группы. Все это доказывает присутствие АРТЕS на поверхности образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{АРТЕS}$ .

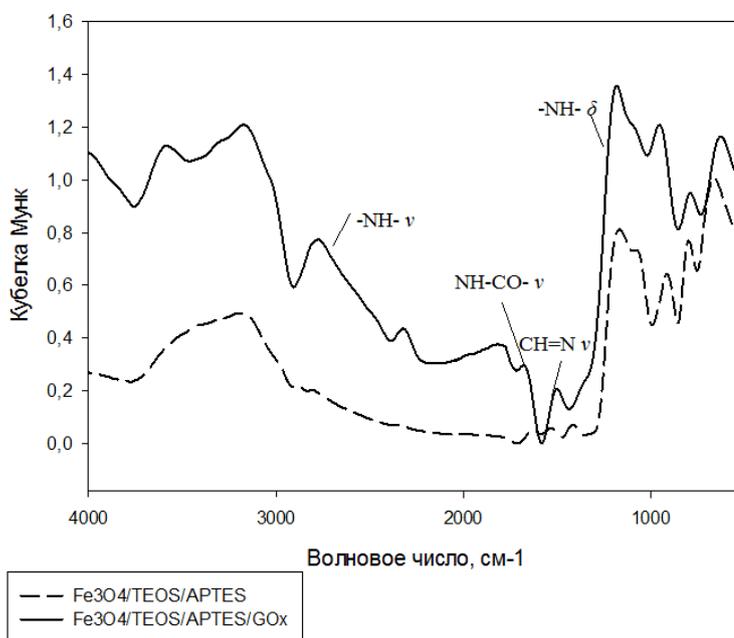


Рисунок 3.12. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{АРТЕS}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{АРТЕS}/\text{GA}/\text{GOx}$

В образце с  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{АРТЕS}/\text{GA}/\text{GOx}$ , полосы поглощения в областях  $2900\text{-}2700\text{ см}^{-1}$ ,  $1250\text{-}1150\text{ см}^{-1}$ , вызваны соответственно, валентными и деформационными колебаниями  $\text{-NH-}$  группы фермента. Пик в области  $1680\text{ см}^{-1}$  свидетельствуют о пептидной связи  $\text{-NH-CO-}$  фермента.

Появление полосы поглощения в области  $1550\text{-}1500\text{ см}^{-1}$  доказывает образование азометиновой связи  $\text{CH=N}$  между ферментом  $\text{GOx}$  и образцом  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{TEOS}/\text{АРТЕS}$ .

### 3.3.2.2. ИК-Фурье спектроскопия биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4$ синтезированных полиольным методом

На рисунках 3.13-3.15 были представлены полученные ИК-спектры следующих образцов:  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  (полиольный способ получения).

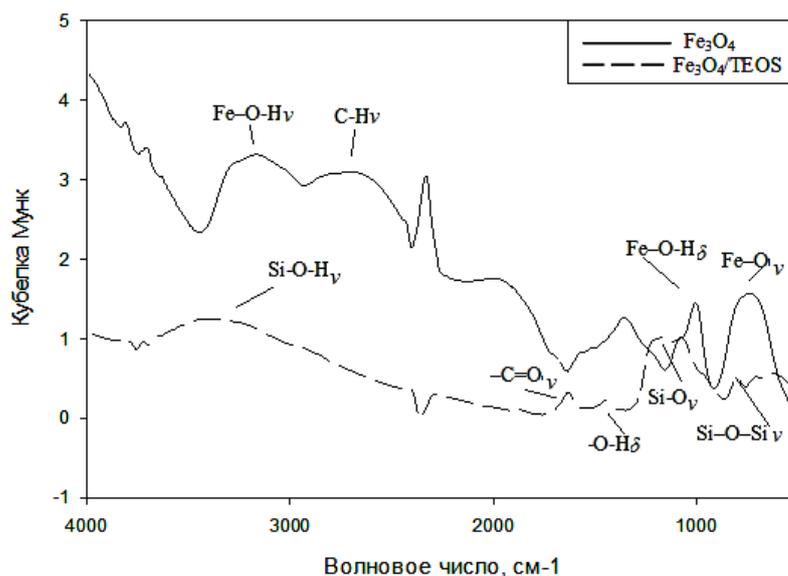


Рисунок 3.13. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$

В полученном спектре поглощения (рисунок 3.13) для образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$  отмечаются интенсивные валентные ( $3172,90 \text{ см}^{-1}$ ) и деформационные ( $1002,98 \text{ см}^{-1}$ ) колебаний связей Fe-O-H, что указывает на наличие свободных OH-групп на поверхности  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Пик в области  $800\text{-}700 \text{ см}^{-1}$  обусловлены валентными колебаниями связи Fe-O наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Кроме того наблюдаются полосы поглощения в области  $1588\text{-}1355 \text{ см}^{-1}$ , которые обусловлены наличием адсорбированных форм  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$ . Следует отметить, что большое разнообразие и количество адсорбированных форм характерно для низкотемпературной формы оксида железа. Полоса поглощения в области  $2900\text{-}2600 \text{ см}^{-1}$  следует отнести, к валентным колебаниям связей C-H

которые возникают на стадии отмывки МНЧ. После обработки поверхности  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  TEOS интенсивность отмеченных полос существенно уменьшается.

Наличие TEOS на образце  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$ , подтверждается данными ИК-спектроскопии на графике  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$ , так в области  $800\text{-}630\text{см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям связи к валентным симметричным колебаниям  $\text{Si-O-Si}$ , формирующие связи  $\text{Fe-O-Si}$ , которые полностью перекрывают связи  $\text{Fe-O}$ . Полосы поглощения  $1165\text{-}1070\text{ см}^{-1}$  отвечает валентным колебаниям  $\text{Si-O}$  связи.

Связи  $\text{Si-O-H}$  образуются в области  $3000\text{см}^{-1}$ , которые замещают связи  $\text{Fe-O-H}$  с поверхности МНЧ.

Валентные колебания  $\text{-C=O}$ , наблюдаемые при  $1650\text{-}1600\text{ см}^{-1}$  и полоса поглощения  $1450\text{ см}^{-1}$  соответствующая деформационным колебаниям  $\text{OH-}$  групп. Наблюдается увеличение полосы поглощения  $\text{OH-}$  групп в области  $3500\text{-}3400\text{ см}^{-1}$ .

После модификации образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$  APTES, ИК-спектр образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}$  (рисунок 3.14) содержит увеличение колебания в области  $800\text{-}600\text{ см}^{-1}$  сформированные связи  $\text{Fe-O-Si}$ , заменены  $\text{Fe-O-Si-O}$ .

Валентные колебания карбоксильной группы  $\text{-C=O}$ , наблюдаемые на образце  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$  при  $1650\text{-}1600\text{ см}^{-1}$  уменьшаются. Вследствие нанесения на поверхность  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$  APTES образуется пик  $1072\text{ см}^{-1}$ , обусловленный вибрацией растяжения  $\text{C-N-}$  связи, колебание вблизи  $1165\text{ см}^{-1}$  отвечающие валентным колебаниям  $\text{Si-O-}$ связи уменьшаются.

В образце с  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  (рисунок 3.15) полосы поглощения в областях  $3870\text{-}3300\text{ см}^{-1}$ ,  $1150\text{-}1050\text{ см}^{-1}$ , вызванны соответственно, валентными и деформационными колебаниями  $\text{-NH-}$  группы фермента. Полосы поглощения в области  $1640\text{-}1600\text{ см}^{-1}$  свидетельствуют о пептидной связи  $\text{-NH-CO-}$  фермента.

Появление полосы поглощения в области  $1580\text{-}1500\text{ см}^{-1}$  доказывает образование азометиновой связи  $\text{CH=N}$  между ферментом GOx и образцом  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}$ .

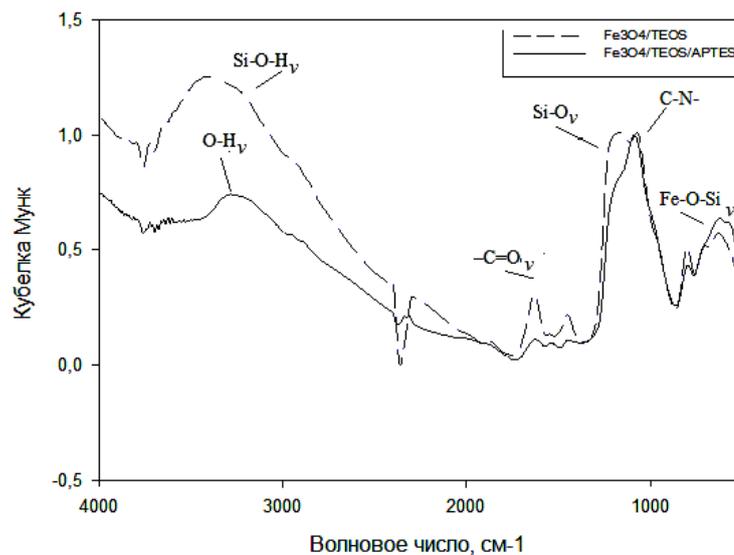


Рисунок 3.14. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS/APTES}$

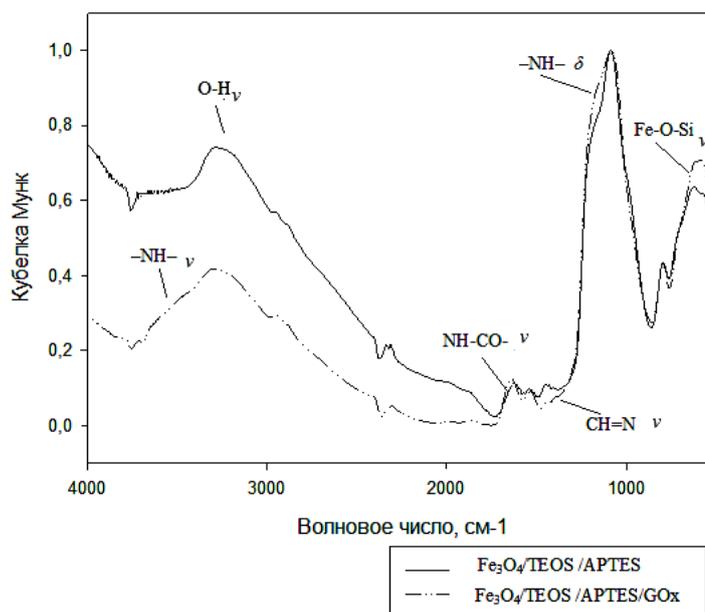


Рисунок 3.15. – Инфракрасные спектры образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$

### 3.4. Анализ поверхности биокатализаторов методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии

#### 3.4.1. Анализ поверхности биокатализаторов на основе $\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{SiO}_2$ методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии

В ходе получения биокатализаторов на основе оксида алюминия был проведен анализ природы и состава поверхности образцов  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии. Для установления элементного состава были зарегистрированы обзорные спектры (рисунки 3.16).

Расчитанный состав поверхности и соотношение элементов представлен в таблицах 3.2 и 3.3.

Поверхность исходного образца  $\text{Al}_2\text{O}_3$  состоит из алюминия, кислорода, углерода, натрия и фтора. В ходе нанесения APTES приводит к удалению с поверхности образца  $\text{Al}_2\text{O}_3$  части фтора и натрия с одновременным увеличением содержания на поверхности образца, кислорода.

После нанесения GOx на поверхности наблюдается появление калия, азота, увеличение углерода, натрия и фосфора, что объясняется использованием фосфатного буфера в ходе нанесения.

Анализ соотношения углерода к алюминию в исследуемом ряду свидетельствует, что в ходе модификации APTES и пришивки GOx происходит последовательное увеличение этого соотношения. Для этих же образцов наблюдается увеличение соотношения азота к алюминию, что свидетельствует об образовании азотсодержащих соединений на поверхности образца, при нанесении фермента. Таким образом, наблюдаемые изменения в элементном составе поверхности позволяют утверждать, что фермент был закреплен на поверхности оксида алюминия.

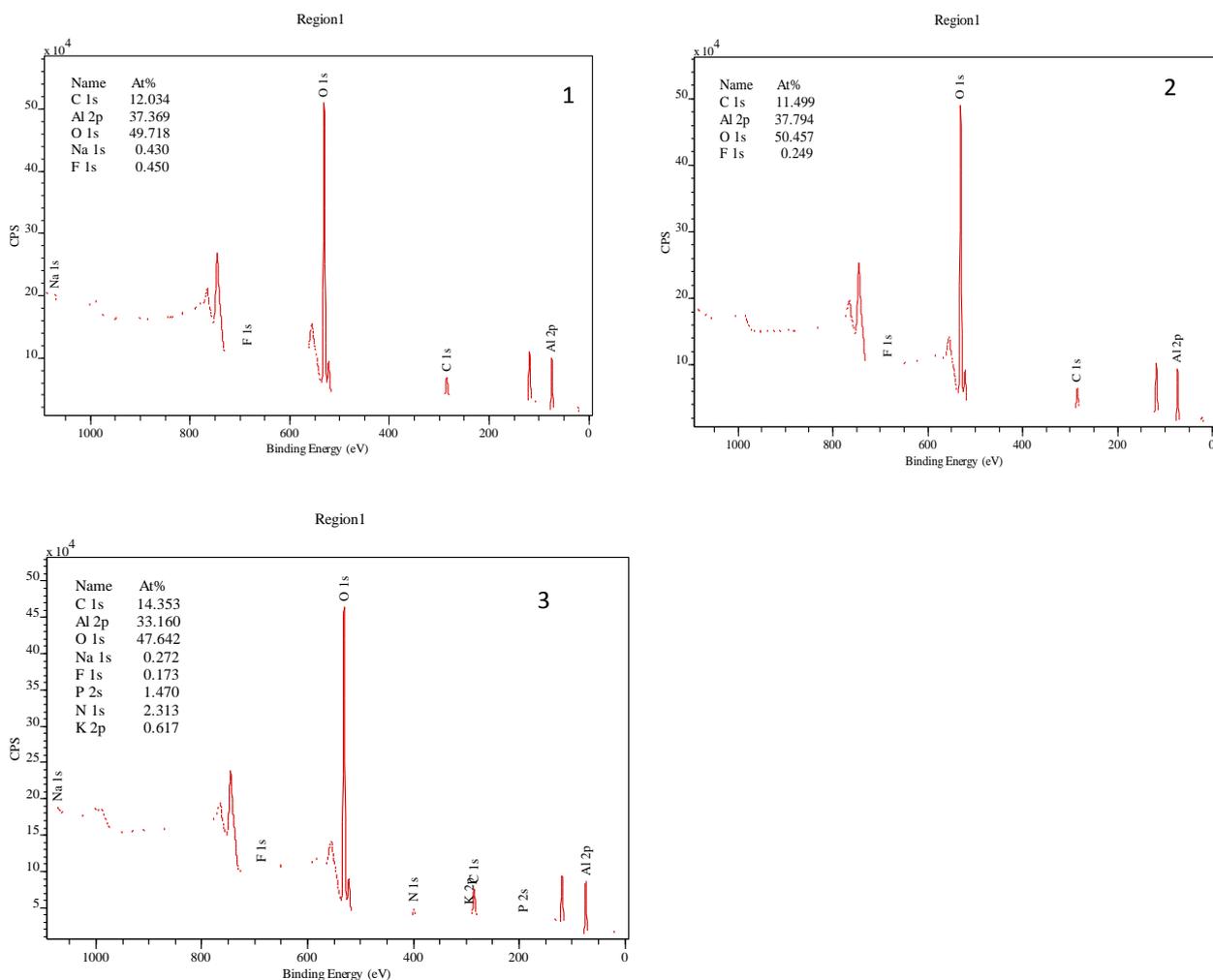


Рисунок 3.16. – Обзорные фотоэлектронные спектры образцов: 1.  $\text{Al}_2\text{O}_3$   
2.  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}$  3.  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$

Таблица 3.2. – Элементный состав поверхности образцов, атомные проценты

АТОМЫ	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}$	$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$
C 1s	12.034	11.499	14.353
Al 2p	37.369	37.794	33.160
O 1s	49.718	50.457	47.642
Na 1s	0.430	0.000	0.272
F 1s	0.450	0.249	0.173
P 2s	0.000	0.000	1.470
N 1s	0.000	0.000	2.313
K 2p	0.000	0.000	0.617

Таблица 3.3. – Соотношение содержания элементов на поверхности

Атомы	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /APTES	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /APTES/ GA/GO <sub>x</sub>
C/ Al	0.32	0.364	0.402
N/Al	0	0	0.069
O/Al	1.33	1.33	1.43

Для установления природы алюминия, углерода, азота и кислорода были зарегистрированы фотоэлектронные спектры высокого разрешения подуровней Al 2p, O 1s, N 1s (рисунок 3.17-3.19).

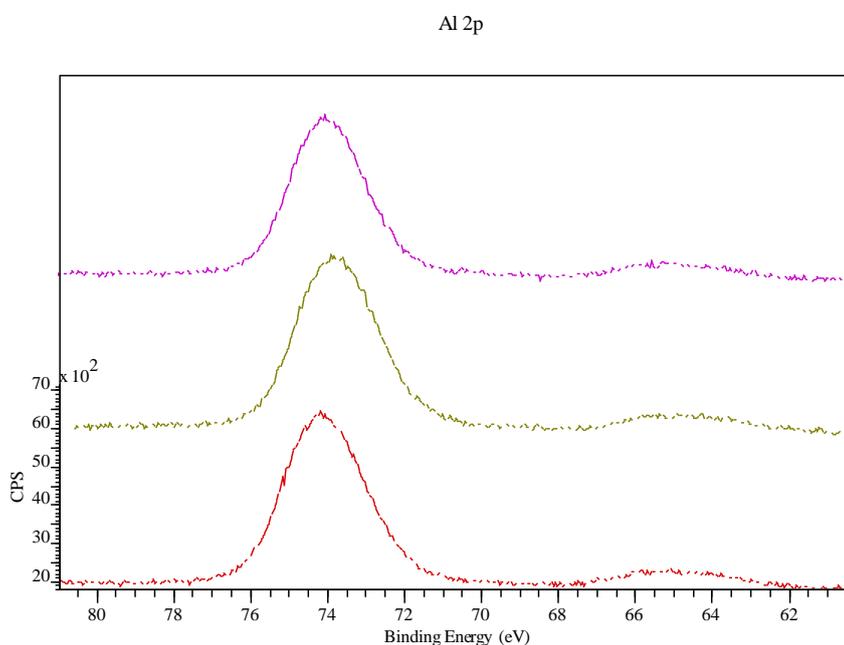


Рисунок 3.17. – Фотоэлектронные спектры высокого разрешения подуровня Al 2p образцов: красный – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, зелёный Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/APTES, сиреневый - Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/APTES/GA/GO<sub>x</sub>

Анализ химических состояний подуровня Al 2p позволяет утверждать, что поверхность всех образцов содержит одно химическое состояние алюминия образца Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Образец Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/APTES/GA/GO<sub>x</sub> содержит аминогруппы (N 1s 399.24 эВ).

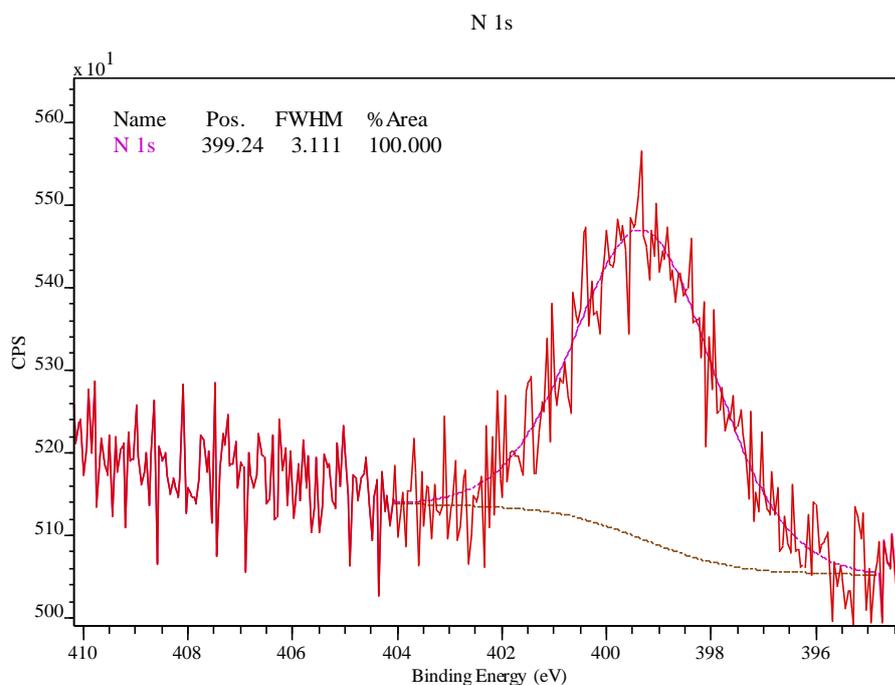


Рисунок 3.18. – Фотоэлектронный спектр высокого разрешения подуровня N 1s для образца  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$

Из полученных данных рисунка видно, что фотоэлектронные пики N 1s подуровня с энергией связи около 399.24 эВ соответствуют ионизованным аминогруппам,  $>\text{CO-NH-}$  и  $>\text{C=NH}$  группам. Таким образом, при нанесении APTES на поверхности формируется соединения азота, имеющее, в том числе, либо ионизированную аминогруппу, либо группы  $>\text{CO-NH-}$  или  $>\text{C=NH}$ . При нанесении фермента характер фотоэлектронной полосы N 1s меняется: полоса становится широкой, т.е. описывает сумму состояний азота в белке.

Анализ фотоэлектронного спектра высокого разрешения подуровня O 1s (рисунок 3.19) образца  $\text{Al}_2\text{O}_3$  показывает наличие на поверхности кислорода 530.7 эВ (ОН-группы поверхности оксида алюминия). Нанесение APTES приводит к возникновению состояний кислорода 529.3 эВ ( $>\text{C=O}$ ). Нанесение фермента приводит к увеличению вклада компонент с энергией 530.7 в который дают вклад также группы  $\text{O=C-N}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ . Следовательно, можно утверждать, что

в ходе проведения синтеза происходит закрепление фермента на поверхности  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}$ .

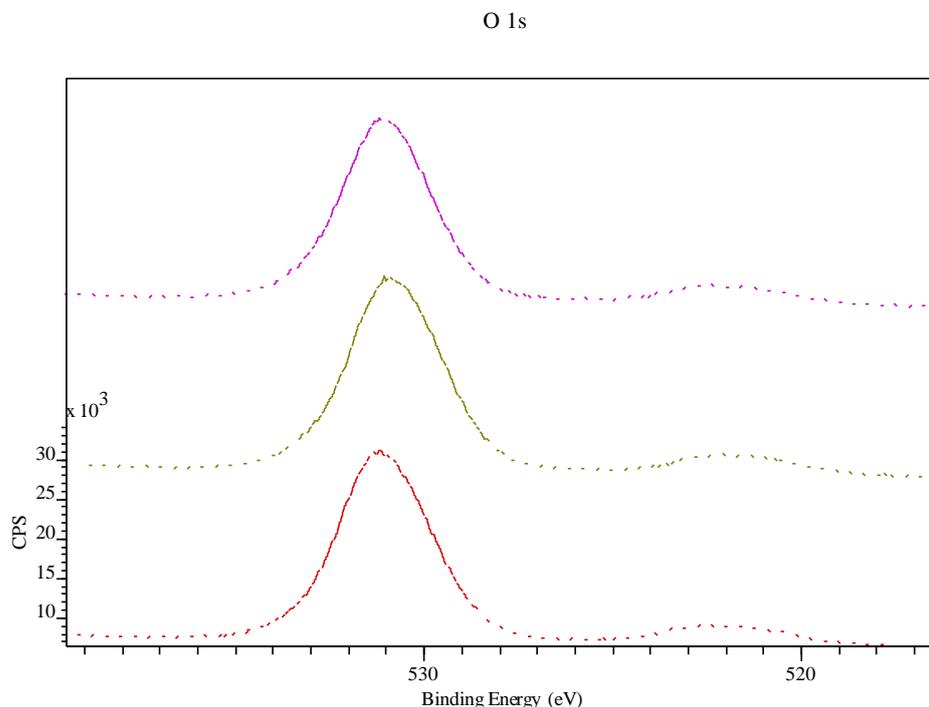


Рисунок 3.19. – Фотоэлектронные спектры высокого разрешения подуровня O 1s образцов: красный –  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , зелёный  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}$ , сиреневый -  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$

А также методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии в ходе синтеза биокатализатора на основе  $\text{SiO}_2$  был проведен анализ природы и состава поверхности образцов  $\text{SiO}_2$ :  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2/\text{APTES}$ ,  $\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$ . Для установления элементного состава были зарегистрированы обзорные спектры (рисунок 3.20)

Рассчитанный состав поверхности и соотношение элементов представлены в таблицах 3.4 и 3.5.

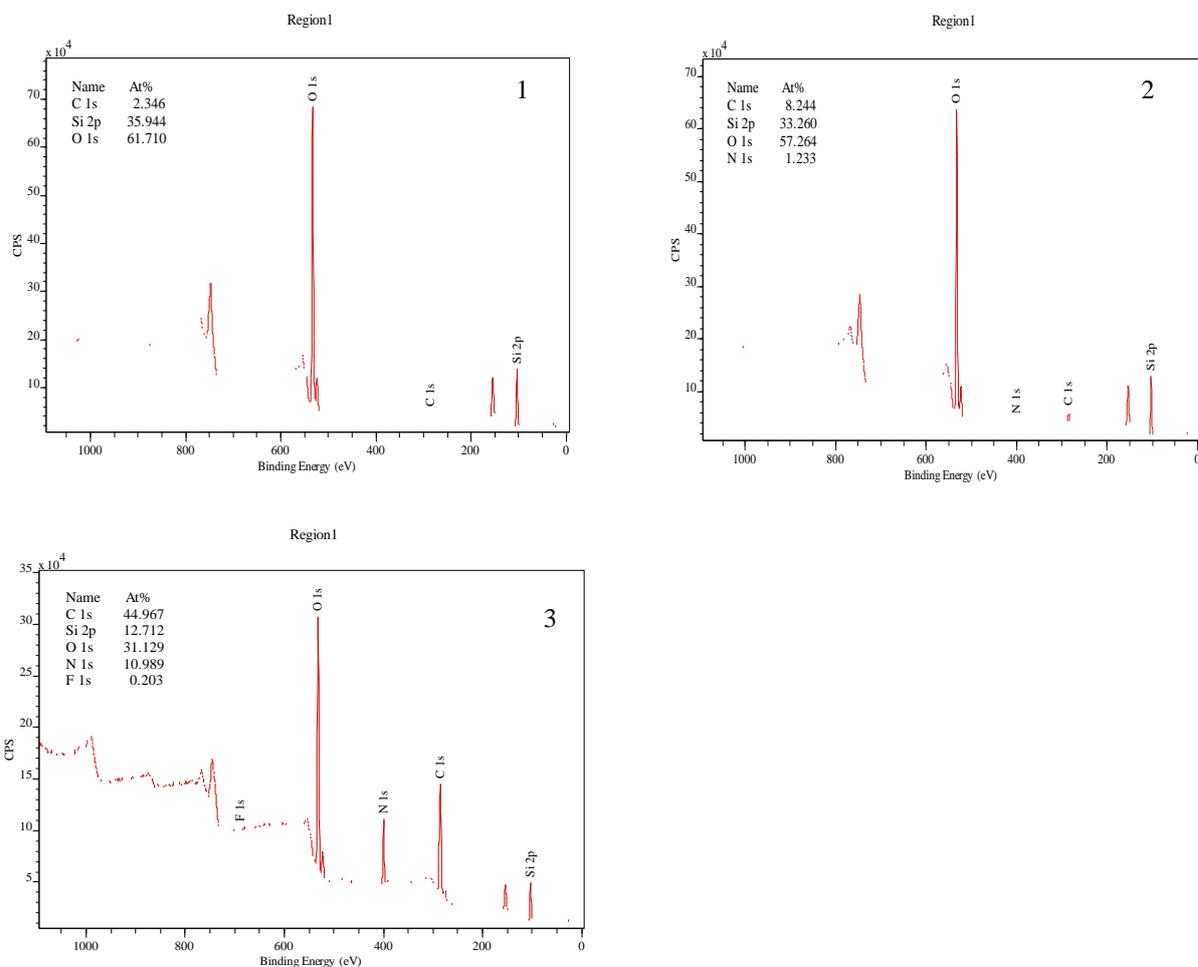


Рисунок 3.20. – Обзорные фотоэлектронные спектры образцов: 1. SiO<sub>2</sub>, 2. SiO<sub>2</sub>/APTS, 3. SiO<sub>2</sub>/APTS/GA/GO<sub>x</sub>

Таблица 3.4. – Элементный состав поверхности образцов, атомные проценты

АТОМЫ	SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> /APTES	SiO <sub>2</sub> /APTES/GA/GO <sub>x</sub>
C 1s	2.346	8.244	44.967
N 1s	0.000	1.233	10.989
O 1s	61.710	57.264	31.129
Si 2p	35.944	33.260	12.712
F 1s	0.000	0.000	0.203

Поверхность исходного образца SiO<sub>2</sub> состоит из кремния, кислорода, углерода. Нанесение APTES приводит к появлению азота и увеличению

углерода, что свидетельствует о появлении азотсодержащего органического соединения.

После нанесения GOx на поверхности наблюдается увеличение углерода, азота. Появляется фосфор, объясняется использованием фосфатного буфера в ходе нанесения. Также наблюдается уменьшение содержания.

Таблица 3.5. – Соотношение содержания элементов на поверхности

Атомы	SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> /APTES	SiO <sub>2</sub> /APTES/GA/GOx
C/ N	0	6.68	4.09
N/ Si	0	0.04	0.87
Si/O	0.58	0.58	0.41

Анализ соотношения углерода к азоту в исследуемом ряду свидетельствует, что в ходе пришивки APTES и GOx происходит последовательное уменьшение этого соотношения, что объясняется содержанием азота в молекулах в обоих соединениях. Для этих же образцов наблюдается увеличение соотношения азота к кремнию, что свидетельствует об увеличении азотсодержащих соединений на поверхности образца, особенно при нанесении фермента.

Таким образом, наблюдаемые изменения в элементном составе поверхности позволяют утверждать, что фермент был закреплен на поверхности.

Для установления природы азота и кислорода были зарегистрированы фотоэлектронные спектры высокого разрешения подуровней O 1s, N 1s.

Образец SiO<sub>2</sub>/APTES содержит аминогруппы (N 1s 399.17 эВ). Нанесение GOx приводит к возникновению компонента 1s подуровня азота 399.64 эВ.

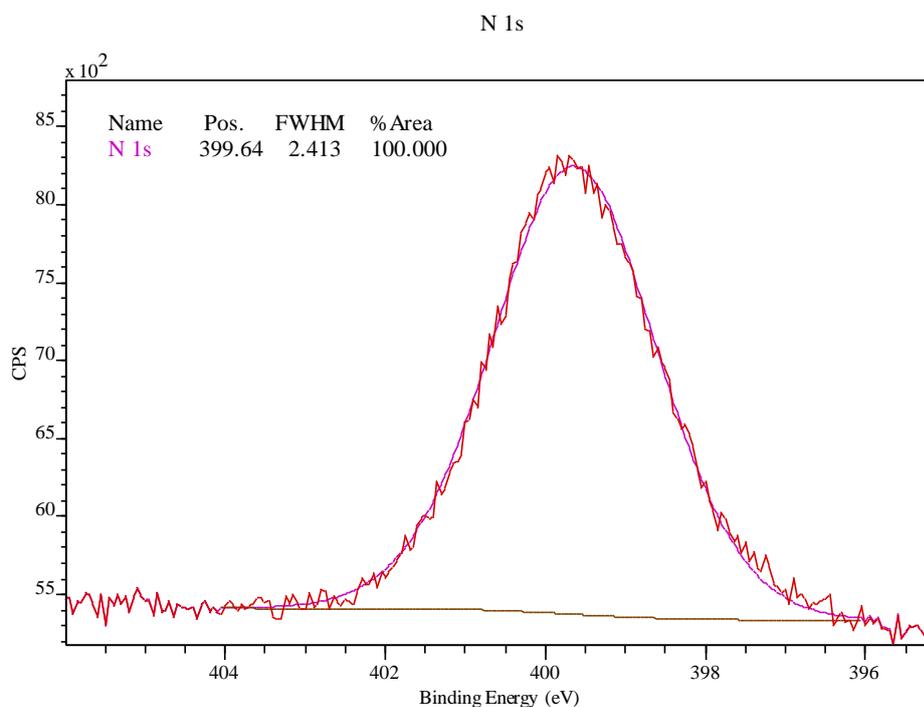


Рисунок 3.21. – Фотоэлектронный спектр высокого разрешения подуровня N 1s для образца: SiO<sub>2</sub> /APTS/GA/GOx

Из полученных данных рисунка видно, что фотоэлектронные пики N 1s подуровня с энергией связи около 399.17 эВ соответствуют аминогруппам поверхности, в то время как компонент 399.64 эВ соответствует ионизованным аминогруппам, >CO-NH- и >C=NH группам. Таким образом, при нанесении APTES на поверхности формируется соединения азота, а при нанесении фермента фотоэлектронные полосы N 1s становится широкой, это означает наличие азота в белке.

Анализ фотоэлектронного спектра высокого разрешения подуровня O 1s (рисунок 3.22) образца показывает наличие на поверхности кислорода 533.0 эВ (кислород оксида кремния) Нанесение APTES приводит к возникновению состояний кислорода 532.9 эВ (O-Si). Нанесение фермента приводит к уменьшению вклада компонента 532.9 эВ (O-Si).

Следовательно, можно утверждать, что в ходе проведения синтеза закрепление фермента на поверхности образца произошло.

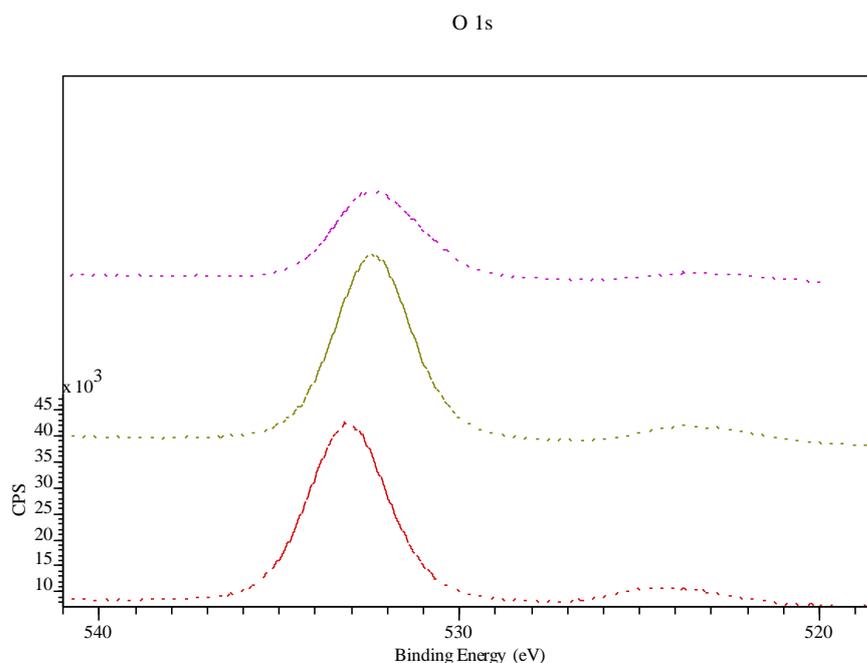


Рисунок 3.22. – Фотоэлектронный спектр высокого разрешения подуровня O 1s для образцов: красный – SiO<sub>2</sub>, зелёный SiO<sub>2</sub>/APTES, сиреневый – SiO<sub>2</sub>/APTES/GO<sub>x</sub>

Из полученных данных, можно сделать вывод, что фермент ковалентно закрепляется на поверхности Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и SiO<sub>2</sub>, из этого следует, что полученные биокатализаторы на основе GO<sub>x</sub> Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/APTES/GA/GO<sub>x</sub> и SiO<sub>2</sub>/APTES/GA/GO<sub>x</sub> можно использовать в процессе окисления ГЛ.

### 3.4.2. Анализ поверхности биокатализаторов на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии

В ходе нанесения фермента на поверхность МНЧ был проведен анализ природы и состава поверхности образцов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2) (полученных полиольным методом), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS/APTES, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS/APTES/GA/GO<sub>x</sub> методом рентгенофотоэлектронной спектроскопии. Для установления элементного состава были зарегистрированы обзорные спектры (рисунок 3.23).

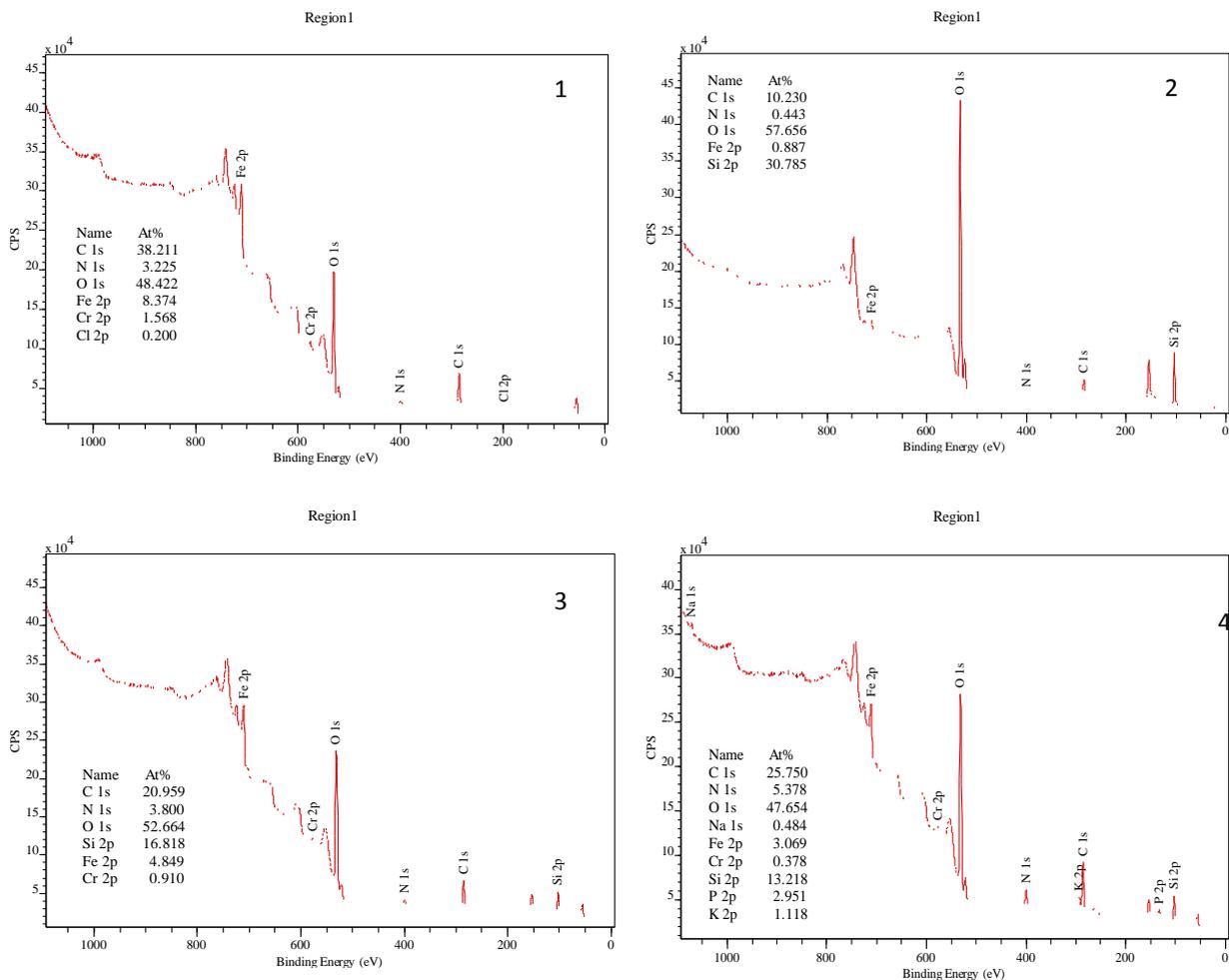


Рисунок 3.23. – Обзорные фотоэлектронные спектры образцов: 1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2), 2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS, 3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS/APTS, 4. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS/APTS/GA/GOx

Расчитанный состав поверхности и соотношение элементов представлен в таблицах 3.6 и 3.7.

Поверхность исходных МНЧ состоит из железа, кислорода, углерода, азота, хрома и хлора. В ходе нанесения TEOS происходит резкое уменьшение содержания на поверхности частиц железа, хрома, углерода, азота и хрома и наблюдается увеличение содержания на поверхности кислорода и появление кремния (более 30 % ат), что свидетельствует о значительном покрытии поверхности магнитных железосодержащих наночастиц кремний и кислород - содержащим продуктом реакции.

Таблица 3.6. – Элементный состав поверхности образцов, атомные проценты

АТОМЫ	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS/APTES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS/APTES/GO <sub>x</sub>
C 1s	38,211	10,230	20,959	25,750
N 1s	3,225	0,443	3,800	5,378
O 1s	48,422	57,656	52,664	47,654
Fe 2p	8,374	0,887	4,849	3,069
Cr 2p	1,568	0,000	0,910	0,378
Cl 2p	0,200	0,000	0,000	0,000
Si 2p	0,000	30,785	16,818	13,218
Na 1s	0,000	0,000	0,000	0,484
P 2p	0,000	0,000	0,000	2,951
K 2p	0,000	0,000	0,000	1,118

Дальнейшее нанесение APTES приводит к удалению с поверхности МНЧ части кремния и кислорода с одновременным увеличением содержания на поверхности железа, хрома, азота и углерода, что свидетельствует о значительном удалении кремнийкислородного продукта реакции с поверхности МНЧ и одновременном закреплении на поверхности МНЧ азотсодержащего органического соединения.

После нанесения GO<sub>x</sub> на поверхности наблюдается увеличение калия, натрия и фосфора, что объясняется использованием фосфатного буфера в ходе нанесения. Также наблюдается уменьшение содержания всех элементов, кроме углерода и азота.

Таблица 3.7. – Соотношение содержания элементов на поверхности

АТОМЫ	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS/APTES	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS/APTES/GA/GO <sub>x</sub>
C/N	11,8	23,1	5,5	4,8
N/Fe	0,4	0,5	0,8	1,8
O/(Fe+Si)	5,8	1,8	2,4	2,9
Si/O	0,0	0,5	0,3	0,3

Анализ соотношения углерода к азоту в исследуемом ряду свидетельствует, что в ходе пришивки АРТЕS и GOx происходит последовательное уменьшение этого соотношения, что объясняется содержанием азота в молекулах в обоих соединениях. Для этих же образцов наблюдается увеличение соотношения азота к железу, что свидетельствует об увеличении азотсодержащих соединений на поверхности МНЧ, особенно при нанесении фермента.

Таким образом, наблюдаемые изменения в элементном составе поверхности позволяют утверждать, что фермент частично был закреплен на поверхности, однако поверхность МНЧ покрыта ферментом не полностью.

Для установления природы железа, азота и кислорода были зарегистрированы фотоэлектронные спектры высокого разрешения подуровней Fe 2p и O 1s, N 1s (рисунок 3.24).

Анализ химических состояний подуровня Fe 2p позволяет утверждать, что поверхность всех образцов содержит одно химическое состояние железа – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Образец исходных МНЧ содержит аминокруппы (N 1s 399.8 эВ) и группы CN- или нитридный азот (N 1s 398.3 эВ). После нанесения TEOS, продукт его реакции почти полностью закрывает поверхность МНЧ, что приводит к исчезновению сигнала азота. Нанесение АРТЕS приводит к возникновению двух компонент 1s подуровня азота: 339.1 эВ и 400.6 эВ.

Из полученных данных рисунка видно, что фотоэлектронные пики N 1s подуровня с энергией связи около 399.1 эВ соответствуют аминокруппам поверхности, в то время как компонент 400.6 эВ соответствует: ионизованным аминокруппам, >CO-NH- и >C=NH группам. Таким образом, при нанесении АРТЕS на поверхности формируется соединения азота, имеющее, в том числе, либо ионизированную аминокруппу, либо группы >CO-NH- или >C=NH. При нанесении фермента характер фотоэлектронной полосы N 1s меняется: полоса становится широкой, т.е. описывает сумму состояний азота в белке.

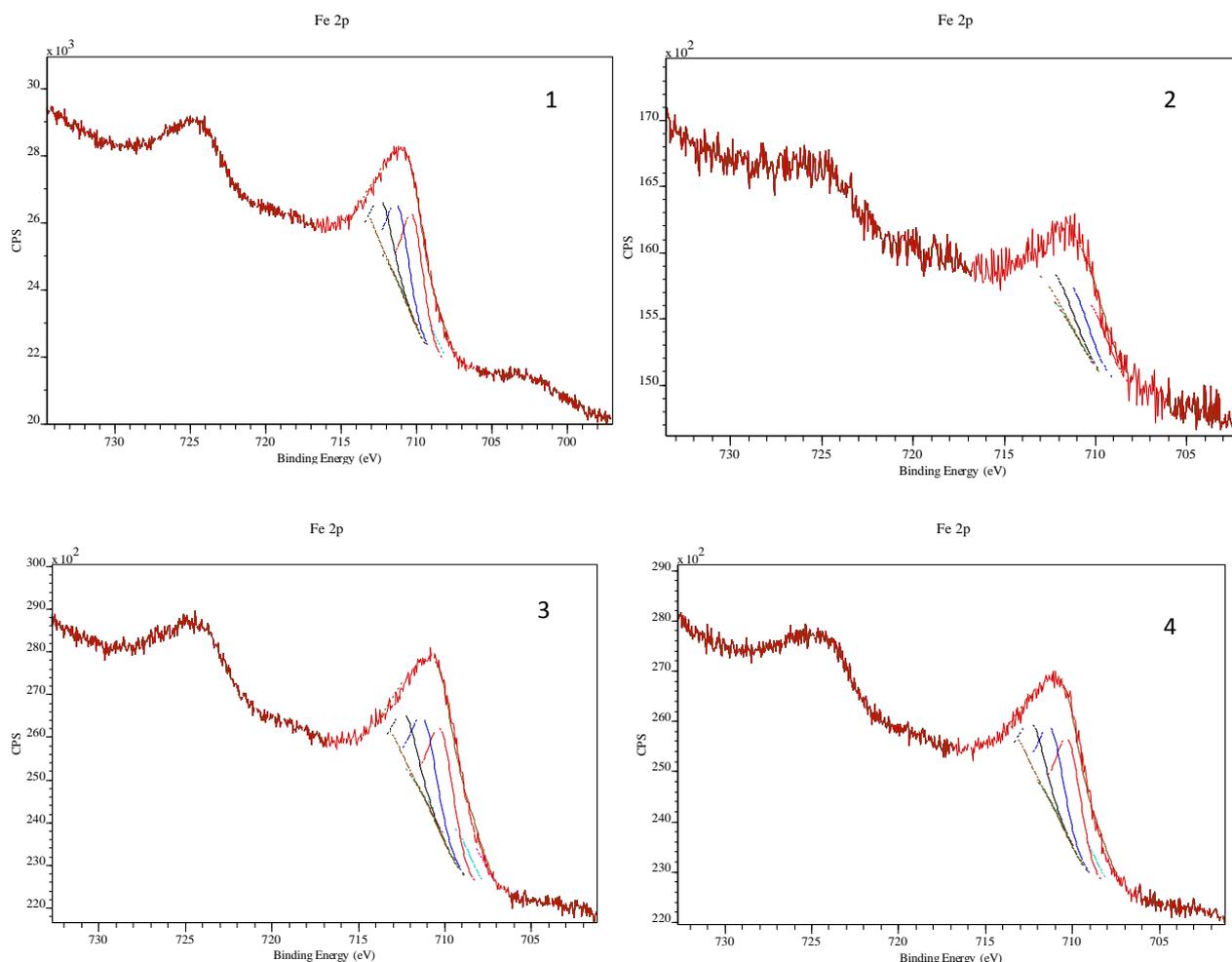


Рисунок 3.24. – Фотоэлектронные спектры высокого разрешения подуровня Fe 2p образцов: 1.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ , 2.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$ , 3.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}$ , 4.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$

Анализ фотоэлектронного спектра высокого разрешения подуровня O 1s (рисунок 3.26) образца МНЧ показывает наличие на поверхности двух химических состояний кислорода 529.9 эВ (кислород оксида железа) и 531.5 эВ (ОН-группы поверхности оксида железа). Нанесение TEOS приводит к возникновению формы кислорода с энергией связи 533.4 эВ, отвечающей связи Fe-O-Si. Нанесение APTES приводит к возникновению состояний кислорода 532.4 эВ ( $>\text{C}=\text{O}$ ) и 533.2 эВ (Fe-O-Si). Нанесение фермента приводит к увеличению вклада компонент с энергией 531.4 в который дают вклад также

группы O=C-N, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 532.4 эВ, и также уменьшение вклада компонента 533.2 эВ (Fe-O-Si).

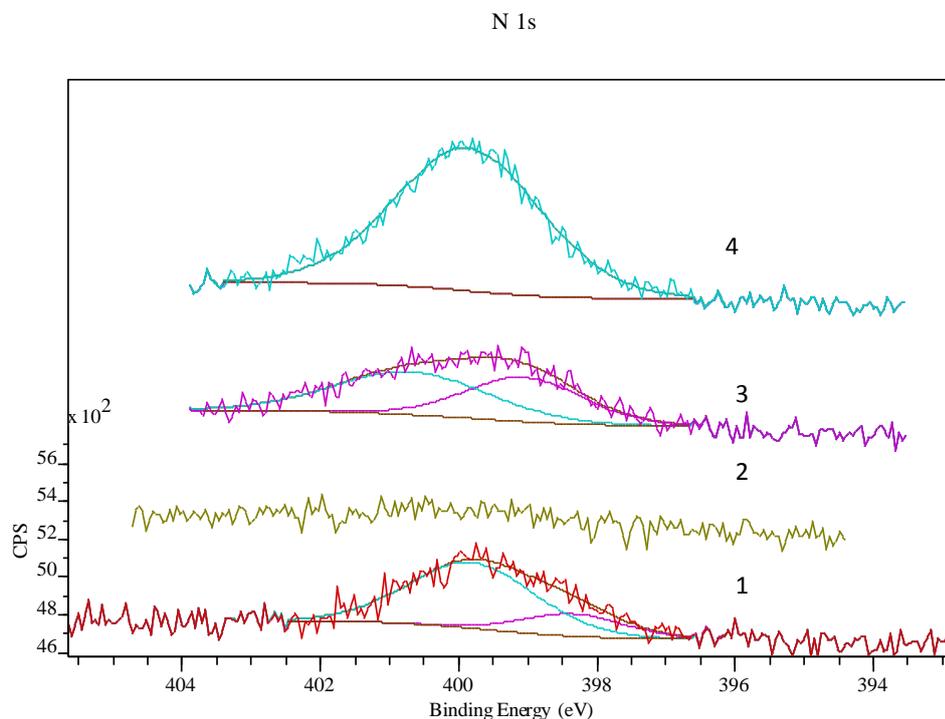


Рисунок 3.25. – Фотоэлектронный спектр высокого разрешения подуровня N 1s для образцов: 1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2), 2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS, 3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS/APTES, 4. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/TEOS/APTES/GA/GOx

Из выше перечисленного, можно однозначно утверждать, что в ходе проведения синтеза закрепление фермента на поверхности МНЧ произошло.

Из полученных данных, можно сделать вывод, что фермент закрепляется на МНЧ, из этого следует, что получен следующий биокатализатор на основе GOx, который в дальнейшем можно использовать в процессе окисления ГЛ.

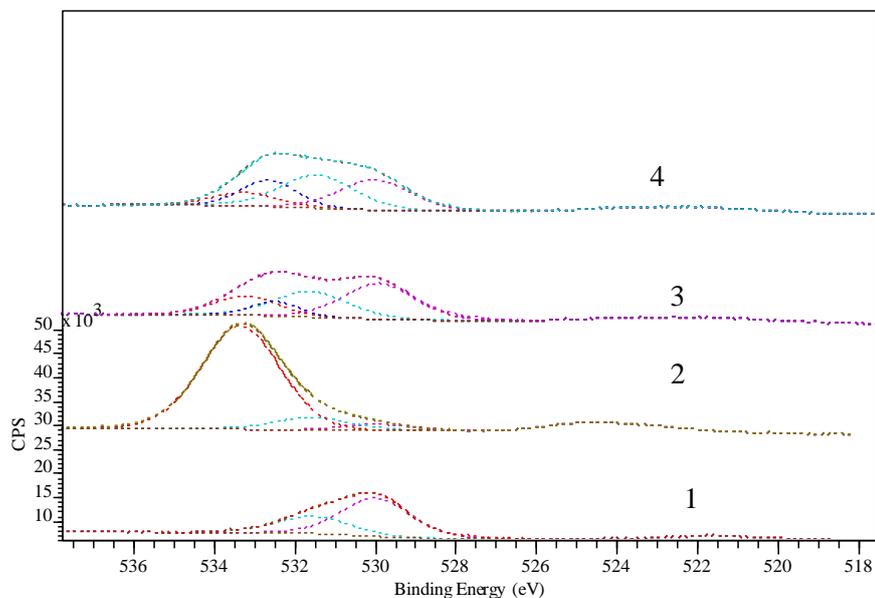


Рисунок 3.26. – Фотоэлектронный спектр высокого разрешения подуровня O 1s для образцов: 1.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ , 2.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$ , 3.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}$ , 4.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$

### 3.5. Характеристика поверхности биокатализаторов методом низкотемпературной адсорбции азота

Исследование полученных биокатализаторов проводилось методом низкотемпературной адсорбции азота с целью изучения пористости и удельной поверхности образцов.

#### 3.5.1. Характеристика поверхности биокатализаторов на основе $\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{SiO}_2$ методом низкотемпературной адсорбции азота

Данным методом были исследованы образцы на основе  $\text{SiO}_2$  и на основе  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . На основе полученных данных были построены изотермы адсорбции-десорбции, которые представлены на рисунках 3.27 и 3.29.

Из полученных данных видно, что все представленные изотермы адсорбции-десорбции можно отнести к изотермам IV типа (характерный

признак изотерм типа IV – петля гистерезиса). Форма гистерезиса обусловлена типом и формой пор. Де Бур идеализировал форму пор, выделил пять типов петель гистерезиса, которые относятся к различным формам пор. Петлю гистерезиса образцов на основе  $\text{SiO}_2$  можно отнести к А типу. Гистерезис типа А относится к порам цилиндрической формы. Этот тип изотерм отличают крутые и узкие ветви адсорбции и десорбции. По классификации IUPAC данные петли гистерезиса относят к H2, характерным для мезопористых материалов. В петлях типа H2, ветвь десорбции имеет довольно большой горизонтальный участок.

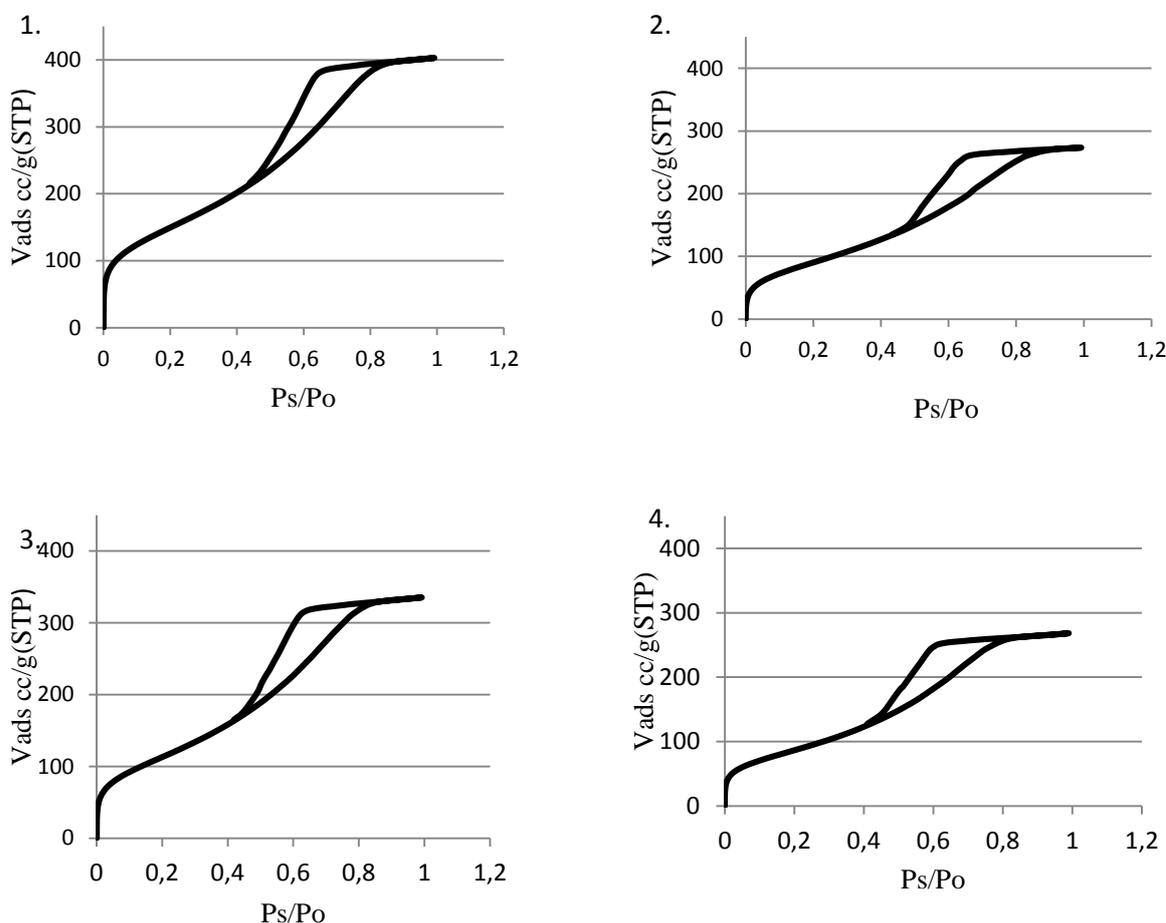


Рисунок 3.27. – Сравнение изотерм адсорбции-десорбции 1. $\text{SiO}_2$ , 2.  $\text{SiO}_2/\text{APTES}$ , 3.  $\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  до эксперимента, 4. $\text{SiO}_2/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  после эксперимента

Изотермы адсорбции-десорбции были обработаны с применением модели мономолекулярной адсорбции Ленгмюра, полимолекулярной адсорбции Брунауэра-Эммета-Тейлора (модель БЭТ) и модели t-графика. Значения удельных площадей поверхности исследуемых биокатализаторов по каждой модели представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8. – Значения удельной площади поверхности исследуемых образцов на основе SiO<sub>2</sub>

Образец	Площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г		
	Ленгмюр	БЭТ	t-график
SiO <sub>2</sub>	500	547	576
SiO <sub>2</sub> /APTES	293	337	403
SiO <sub>2</sub> /APTES/GA/GO <sub>x</sub> до эксперимента	377	417	475
SiO <sub>2</sub> /APTES/GA/GO <sub>x</sub> после эксперимента	289	318	369

Из полученных данных таблицы видно, что при нанесении на образец на основе SiO<sub>2</sub> модифицирующего агента APTES удельная площадь образца уменьшается. После введения сшивающего агента GA и пришивки GO<sub>x</sub> удельная площадь увеличивается за счет поверхности молекул фермента.

На основании модели БЭТ получено распределение пор по объему для биокатализатора на основе GO<sub>x</sub> иммобилизованной на SiO<sub>2</sub> и приведено в таблице 3.9.

Из данных таблицы видно, что диаметр пор у образцов на основе SiO<sub>2</sub> преобладает до 6 нм, а это означает, что образцы обладают микропорами. После нанесения APTES количество микропор в образце не снижается. В микропорах благодаря близости стенок пор потенциал взаимодействия с адсорбированными молекулами значительно больше, величина адсорбции при данном относительном давлении соответственно тоже больше.

Таблица 3.9. – Распределение пор по объему в зависимости от их диаметра

Распределение пор по объему, %								
Диаметр пор, нм	< 6	6 – 8	8 – 10	10 – 12	12 – 16	16 – 20	20 – 80	80 <
<b>SiO<sub>2</sub></b>								
Адсорбция	50.75	24.59	10.83	7.36	3.52	1.23	1.49	0.24
Десорбция	91.87	3.11	1.19	0.87	0.74	0.64	1.37	0.22
<b>SiO<sub>2</sub>/APTES</b>								
Адсорбция	46.97	23.79	10.55	8.72	5.04	2.67	2.08	0.19
Десорбция	92.31	3.36	0.84	0.95	0.69	0.51	1.15	0.18
<b>SiO<sub>2</sub>/APTES/GA/GOx до эксперимента</b>								
Адсорбция	51.93	24.54	10.61	6.81	3.26	1.11	1.51	0.23
Десорбция	92.48	2.44	1.11	0.82	0.76	0.67	1.49	0.23
<b>SiO<sub>2</sub>/APTES/GA/GOx после эксперимента</b>								
Адсорбция	54.51	25.77	9.18	5.51	2.03	0.93	1.81	0.28
Десорбция	92.32	2.44	0.91	0.84	0.77	0.73	1.68	0.32

Исходя из полученных данных, построен график распределения объема пор в зависимости от их диаметра, который представлен на рисунке 3.28.

На основании полученных данных, можно сделать вывод о том, что все представленные образцы имеют мезопористую структуру. Средний диаметр мезопор составляет в среднем 3-5 нм. Из представленного распределения объема пор в зависимости от их диаметра, видно, что объем пор снижается после введения APTES (происходит заполнение мезопор). Затем объем пор увеличивается после введения сшивающего агента и ковалентного связывания GOx, что свидетельствует о формировании новой поверхности. Необходимо отметить, что после проведения эксперимента, поверхность с иммобилизованным ферментом меняется незначительно.

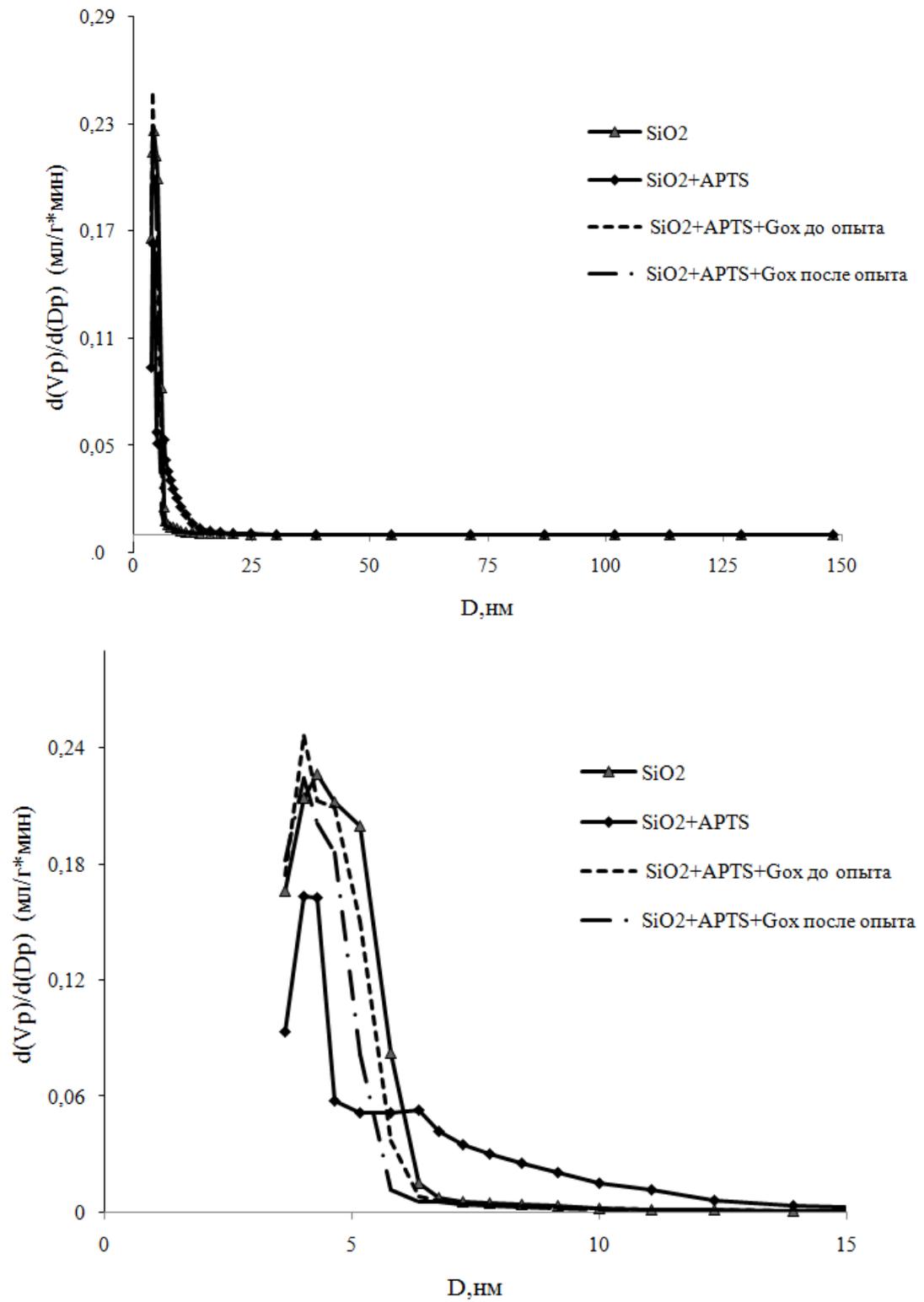


Рисунок 3.28. – График распределения объема пор в зависимости от их диаметра для образцов на основе  $\text{SiO}_2$

Учитывая, что размер молекулы фермента GOx составляет: 6,0нм · 5,2нм · 7,7нм, то можно предположить, что ковалентное связывание происходит на поверхности более крупных пор [104].

Получены данные низкотемпературной адсорбции азота для образцов на основе Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Изотермы адсорбции-десорбции представлены на рисунке 3.29.

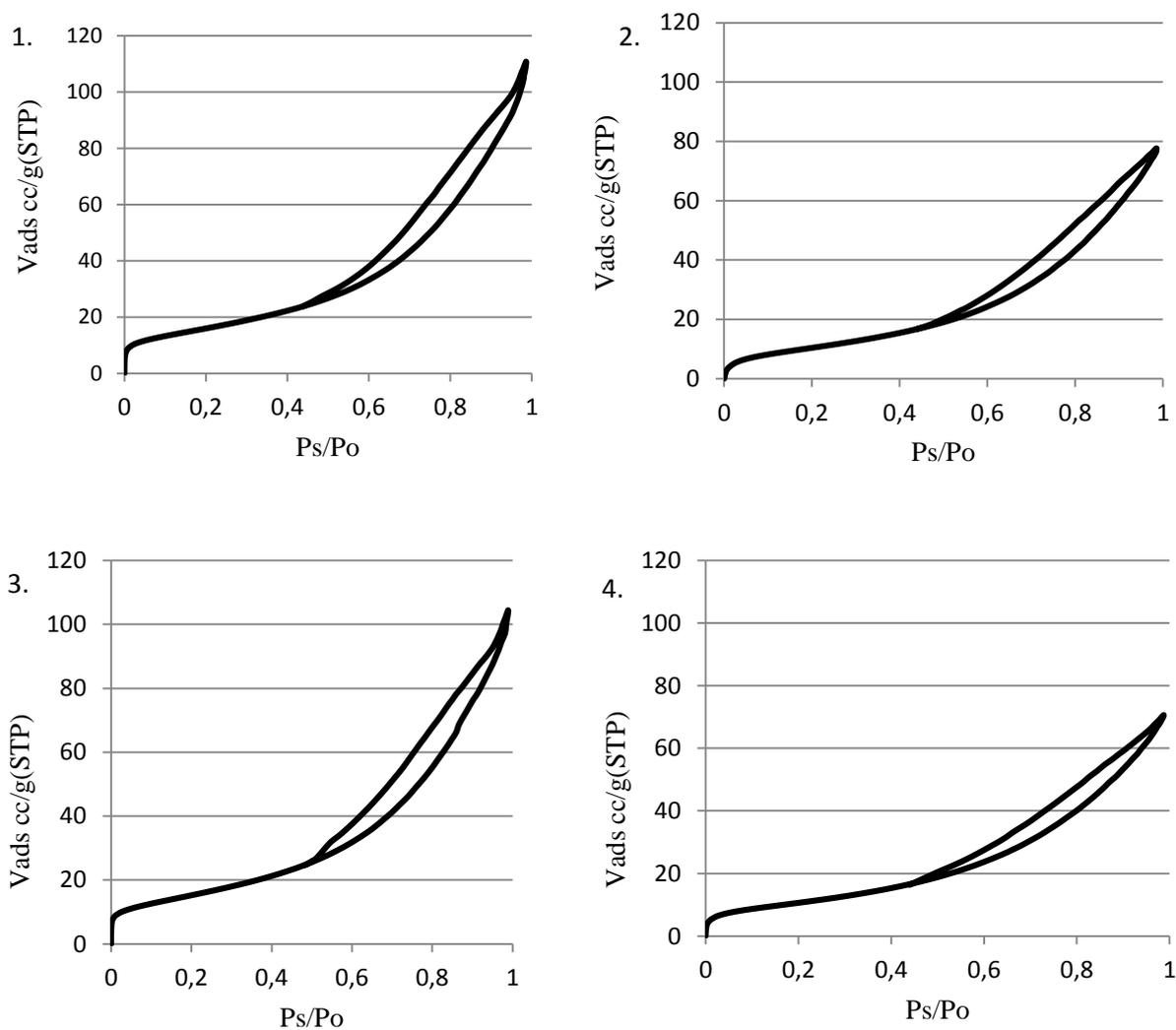


Рисунок 3.29. – Сравнение изотерм адсорбции-десорбции: 1. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/APTES, 3. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/APTES/GOx до эксперимента 4. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/APTES/GA/GOx после эксперимента

Из полученных данных видно, что все представленные изотермы адсорбции-десорбции можно отнести к изотермам IV типа (характерный признак изотерм типа IV – петля гистерезиса). Такая изотерма ассоциируется с капиллярной конденсацией в мезопорах, что характеризуется увеличенной крутизной при повышенном относительном давлении. Петлю гистерезиса образцов на основе  $Al_2O_3$  можно отнести к E типу, в отличие от образца на основе  $SiO_2$  (петля гистерезиса образца  $SiO_2$  типа A). Этот тип изотерм отличают поры типа «чернильницы», т.е. глухие поры. По классификации IUPAC данные петли гистерезиса относят к H3, характерного для мезомакропористой структуры, тогда как петли образца  $SiO_2$  относятся к H2.

Изотермы адсорбции-десорбции были обработаны с применением модели мономолекулярной адсорбции Ленгмюра, полимолекулярной адсорбции Брунауэра-Эммета-Тейлора (модель БЭТ) и модели t-графика. Значения удельной площади поверхности исследуемых биокатализаторов по каждой модели представлены в таблице 3.10.

Таблица 3.10. – Значения удельной площади поверхности исследуемых образцов на основе  $Al_2O_3$

Образец	Площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г		
	Ленгмюр	БЭТ	t-график
$Al_2O_3$	54	58	63
$Al_2O_3/APTES$	37	39	51
$Al_2O_3/APTES/GA/GOx$ до эксперимента	51	55	61
$Al_2O_3/APTES/GA/GOx$ после эксперимента	36	39	46

Из полученных данных видно, что при нанесении на  $Al_2O_3$  модифицирующего агента APTES и фермента удельная площадь образца уменьшается, что связано, с заполнением пор.

На основании модели БЭТ распределение пор по объему для носителя и биокатализатора на основе GOx иммобилизованной на  $Al_2O_3$  приведено в таблице 3.11.

Из данных таблицы видно, что диаметр пор у образцов на основе  $Al_2O_3$  преобладает мезо- и макропоры, в отличие от образцов на основе  $SiO_2$ , которые в основном обладают микро- и мезопорами. После нанесения APTES на образцы на основе  $Al_2O_3$  количество микропор в образце снижается, а количество мезопор возрастает, что связано с заполнением микропор.

Таблица 3.11. – Распределение пор по объему в зависимости от их диаметра

Распределение пор по объему, %								
Диаметр пор, нм	< 6	6 – 8	8 – 10	10 – 12	12 – 16	16 – 20	20 – 80	80 <
$Al_2O_3$								
Адсорбция	16.16	12.57	8.08	9.13	10.05	9.05	24.92	10.05
Десорбция	25.71	17.72	9.32	9.18	9.00	7.09	17.74	4.24
$Al_2O_3/APTES$								
Адсорбция	19.04	13.45	8.42	9.32	10.60	9.84	24.49	4.84
Десорбция	29.30	17.17	9.37	9.27	8.78	8.08	15.63	2.39
$Al_2O_3/APTES/GA/GOx$ до эксперимента								
Адсорбция	17.18	12.80	7.91	9.15	10.48	10.66	23.67	8.13
Десорбция	28.33	16.60	9.30	8.76	8.75	6.67	17.22	4.37
$Al_2O_3/APTES/GA/GOx$ после эксперимента								
Адсорбция	20.32	13.39	8.09	8.89	10.11	9.16	24.90	5.13
Десорбция	32.23	16.20	8.55	8.64	8.71	6.72	16.17	2.79

Исходя из полученных данных, был построен график распределения объема пор в зависимости от их диаметра, который представлен на рисунке 3.30.

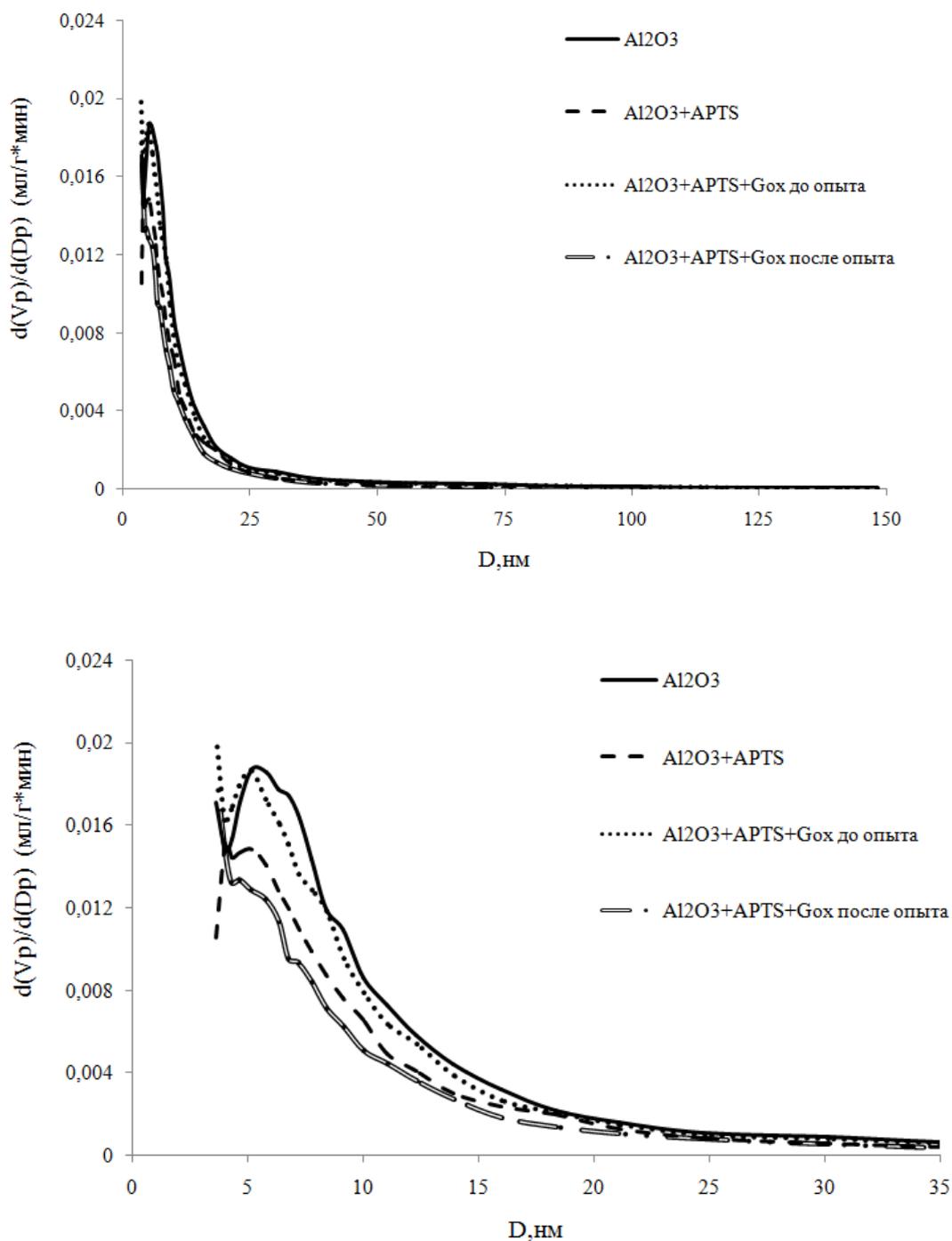


Рисунок 3.30. – График распределения объема пор в зависимости от их диаметра для образцов на основе  $\text{Al}_2\text{O}_3$

На основании полученных данных по низкотемпературной адсорбции азота, можно сделать вывод о том, что все представленные образцы имеют мезопористую структуру. После введения модифицирующих агентов и

связывания GOx, основные изменения происходят с объемом пор 6-8 нм. Что возможно связано с тем, что молекулы GOx могут частично закрывать «собой» эти поры. Средний диаметр пор у образцов на основе Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> составляет в среднем 5 -14 нм, т.к. средний диаметр пор у образцов на основе SiO<sub>2</sub> составляет 3-5 нм.

### 3.5.2. Характеристика поверхности биокатализаторов на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> синтезированных способом соосаждения, методом низкотемпературной адсорбции азота

Методом низкотемпературной адсорбции азота были исследованы образцы на основе магнитных наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1), полученные методом соосаждения. На основании полученных данных были построены изотермы адсорбции-десорбции, которые представлены на рисунке 3.31.

Из полученных данных видно, что все представленные изотермы адсорбции-десорбции можно отнести к изотермам IV типа. Такая изотерма ассоциируется с капиллярной конденсацией в мезопорах, что характеризуется увеличенной крутизной при повышенном относительном давлении. Петлю гистерезиса образцов можно отнести к С типу. Гистерезис типа С показывает, что поры клиновидной формы с открытыми концами. По классификации IUPAC данные петли гистерезиса относят к H3, которые характерны для мезопористой структуры.

Изотермы адсорбции-десорбции были обработаны с применением модели мономолекулярной адсорбции Ленгмюра, полимолекулярной адсорбции Брунауэра-Эммета-Тейлора (модель БЭТ) и модели t-графика. Значения удельных площадей поверхности исследуемых биокатализаторов по каждой модели представлены в таблице 3.12.

Анализируя данные таблицы можно сделать вывод, что удельная площадь поверхности (модель БЭТ) образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, после введения TEOS, APTES и фермента удельная площадь уменьшается незначительно.

На основании модели БЭТ распределение пор по объему для биокатализатора на основе GOx иммобилизованной на  $Fe_3O_4$  приведено в таблице 3.13.

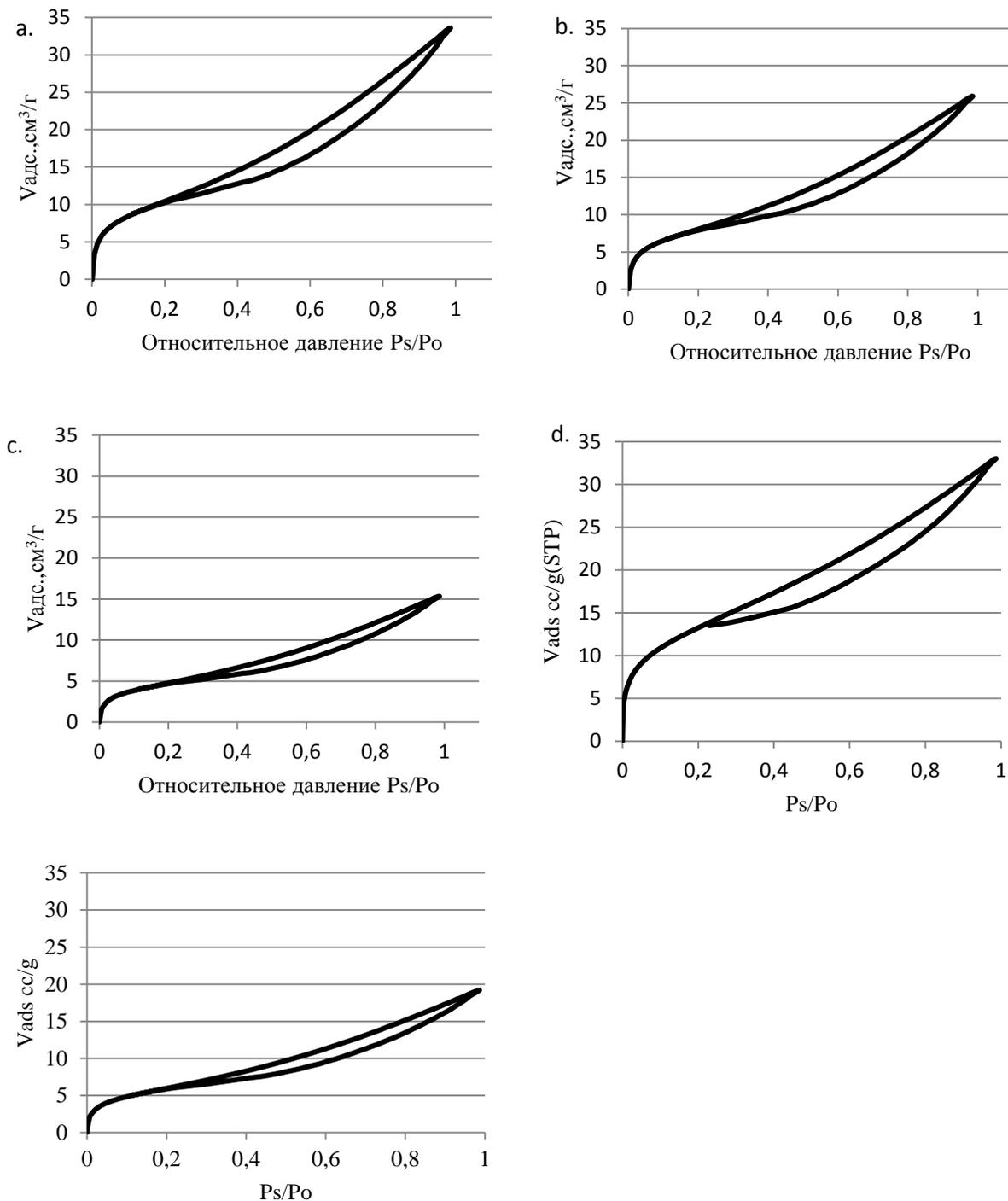


Рисунок 3.31. – Сравнение изотерм адсорбции-десорбции: а.  $Fe_3O_4(1)$ , б.  $Fe_3O_4(1)/TEOS$ , с.  $Fe_3O_4(1)/TEOS/APTES$ , d.  $Fe_3O_4(1)/TEOS/APTES/GA/GOx$  до эксперимента, е.  $Fe_3O_4(1)/TEOS/APTES/GA/GOx$  после эксперимента

Таблица 3.12. – Значения удельной площади поверхности исследуемых образцов на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)

Образец	Площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г		
	Ленгмюр	БЭТ	t-график
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)	57	63	67
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS	47	49	50
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS/APTES	46	50	50
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS/APTES/GA/GO <sub>x</sub> до эксперимента	45	49	52
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS/APTES/GA/GO <sub>x</sub> после эксперимента	29	30	37

Таблица 3.13. – Распределение пор по объему в зависимости от их диаметра

Распределение пор по объему, %								
Диаметр пор, нм	< 6	6 – 8	8 – 10	10 – 12	12 – 16	16 – 20	20 – 80	80 <
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)								
Адсорбция	7.89	36.55	15.75	8.08	8.00	6.82	14.72	2.19
Десорбция	8.01	26.54	14.67	8.95	9.17	8.47	21.32	2.88
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS								
Адсорбция	7.96	37.80	15.43	7.96	7.71	6.83	14.61	1.69
Десорбция	7.85	28.57	13.98	8.23	9.19	8.61	20.91	2.66
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS/APTES								
Адсорбция	7.40	30.37	13.54	8.03	8.47	8.27	20.29	3.63
Десорбция	8.35	28.26	14.08	6.71	9.28	7.93	21.61	3.78
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS/APTES/GA/GO <sub>x</sub> до эксперимента								
Адсорбция	7.70	39.03	15.66	7.96	7.50	6.43	13.82	1.91
Десорбция	7.62	30.40	14.34	8.53	8.93	7.97	19.50	2.71
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/TEOS/APTES/GA/GO <sub>x</sub> после эксперимента								
Адсорбция	7.36	29.60	13.49	7.98	8.51	7.70	20.96	4.41
Десорбция	7.64	26.17	13.35	9.07	9.12	8.55	21.86	4.24

Из данных таблицы видно, что диаметр пор у образцов преобладают мезопоры.

Исходя из полученных данных, был построен график распределения объема пор в зависимости от их диаметра, который представлен на рисунке 3.32.

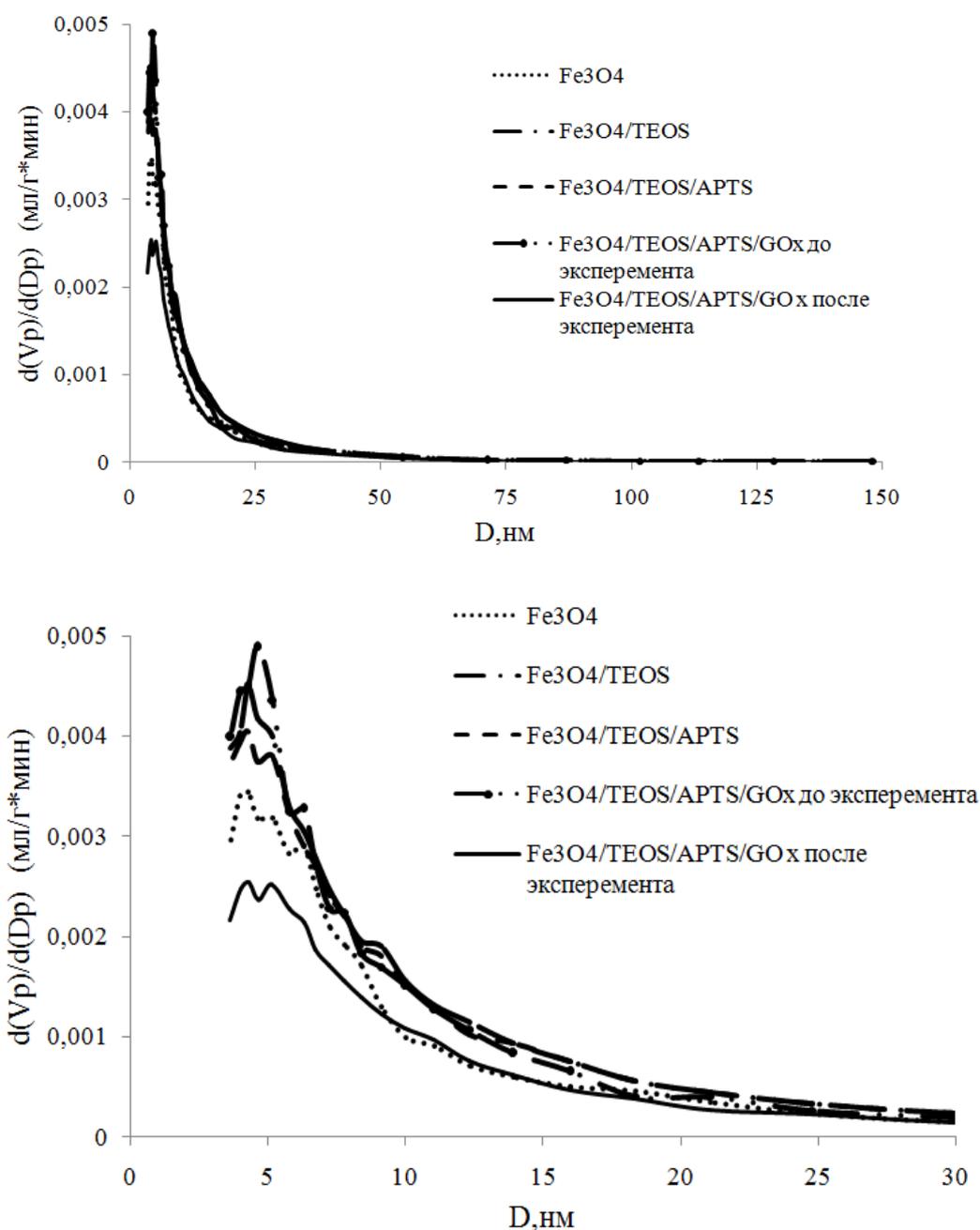


Рисунок 3.32. – График распределения объема пор в зависимости от их диаметра для образцов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$

На основании полученных данных по низкотемпературной адсорбции азота можно сделать вывод, что все представленные образцы имеют мезопористую структуру. Средний диаметр пор для образцов на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$  составляет в среднем 6 –15 нм.

### 3.5.3. Характеристика поверхности биокатализаторов на основе $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ синтезированных полиольным способом, методом низкотемпературной адсорбции азота

Методом низкотемпературной адсорбции азота были исследованы образцы на основе магнитных наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ . На основе полученных данных были построены изотермы адсорбции-десорбции, которые представлены на рисунке 3.33.

Из полученных данных на рисунке 3.33 видно, что все представленные изотермы адсорбции-десорбции можно отнести к изотермам IV типа мезопористой структуры (характерный признак изотерм типа IV – петля гистерезиса). Такая изотерма ассоциируется с капиллярной конденсацией в мезопорах, что характеризуется увеличенной крутизной при повышенном относительном давлении. Петлю гистерезиса можно отнести к H3 типу, указывающему на щелевидные поры.

Изотермы адсорбции-десорбции были обработаны с применением модели мономолекулярной адсорбции Ленгмюра, полимолекулярной адсорбции Брунауэра-Эммета-Тейлора (модель БЭТ) и модели t-графика. Значения удельных площадей поверхности исследуемых биокатализаторов по каждой модели представлены в таблице 3.14.

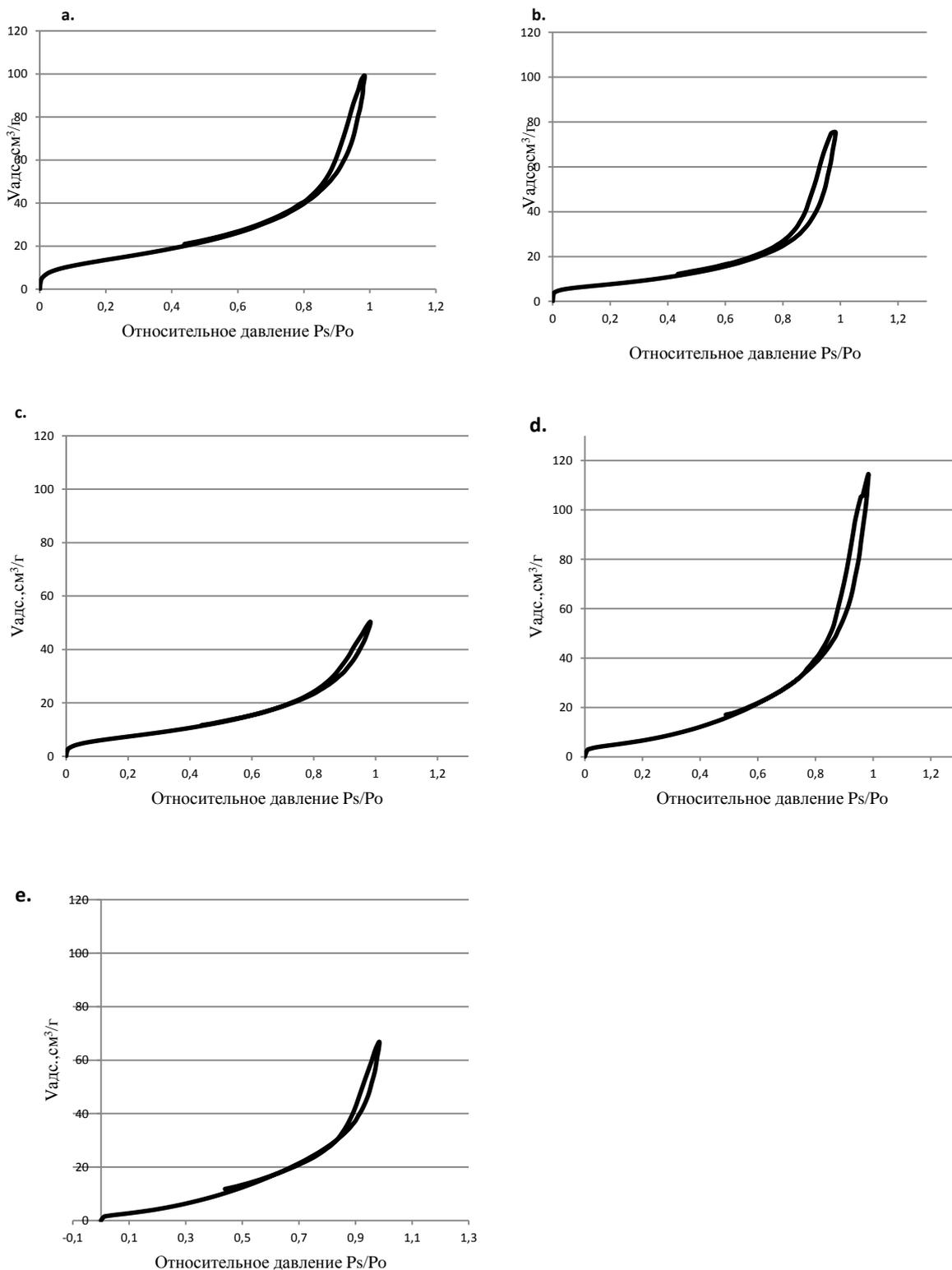


Рисунок 3.33. – Сравнение изотерм адсорбции-десорбции: а.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ , б.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}$ , в.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}$ , г.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  до эксперимента, е.  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{TEOS}/\text{APTES}/\text{GA}/\text{GOx}$  после эксперимента

Таблица 3.14. – Значения удельной площади поверхности исследуемых образцов на основе магнитных наночастиц, полученных полиольным способом

Образец	Площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г		
	Ленгмюр	БЭТ	t-график
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)	46	51	76
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS	27	28	43
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS/APTES	23	28	42
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS/APTES/GA/GO <sub>x</sub> до эксперимента	19	25	64
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/TEOS/APTES/GA/GO <sub>x</sub> после эксперимента	10	18	67

Из полученных данных таблицы 3.14 видно, наибольшую удельную площадь поверхности (модель БЭТ) имеет образец Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2). После обработки магнитных наночастиц модифицирующими реагентами и после использования биокатализатора происходит уменьшение удельной площади поверхности, в связи с заполнением пор.

На основании модели БЭТ распределение пор по объему для биокатализатора на основе GO<sub>x</sub> иммобилизованной на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> приведено в таблице 3.15.

Из полученных данных таблицы 3.15 следует, что магнитные наночастицы обладают мезопорами. После модификации поверхности наночастиц количество мезопор снижается, а количество микропор увеличивается. Можно предположить, что адсорбция происходит в основном в мезопорах.

Исходя из полученных данных, был построен график распределения объема пор в зависимости от их диаметра, который представлен на рисунке 3.14.

Таблица 3.15. – Распределение пор по объему в зависимости от их диаметра

Распределение пор по объему, %								
Диаметр пор, нм	< 6	6 – 8	8 – 10	10 – 12	12 – 16	16 – 20	20 – 80	80 <
$Fe_3O_4(2)$								
Адсорбция	11.58	6.69	4.47	5.55	6.90	7.73	41.94	15.15
Десорбция	10.11	6.77	4.61	5.47	8.86	13.26	46.72	4.18
$Fe_3O_4(2)/TEOS$								
Адсорбция	8.73	5.48	3.39	4.73	6.22	8.44	48.98	14.02
Десорбция	7.80	5.62	4.28	6.13	10.77	18.21	45.64	1.54
$Fe_3O_4(2)/TEOS/APTES$								
Адсорбция	15.05	8.56	5.26	6.62	8.05	8.96	37.44	10.06
Десорбция	13.68	8.77	5.85	7.70	10.43	13.05	35.90	4.63
$Fe_3O_4(2)/TEOS/APTES/GOx$ до эксперимента								
Адсорбция	11.57	6.52	4.18	4.89	6.32	8.40	44.48	13.63
Десорбция	7.99	5.86	5.47	6.09	9.81	17.14	42.46	5.17
$Fe_3O_4(2)/TEOS/APTES/GOx$ после эксперимента								
Адсорбция	17.62	8.28	4.68	5.34	6.38	7.20	39.11	11.40
Десорбция	12.20	6.78	4.53	5.72	9.61	13.58	41.30	6.27

На основании полученных данных по низкотемпературной адсорбции азота, можно сделать вывод о том, что все представленные образцы имеют мезопористую структуру. Средний диаметр пор для образца  $Fe_3O_4$  полученного полиольным способом составляет в среднем 15-26 нм, тогда как с образец на основе  $Fe_3O_4(1)$ , полученный методом соосаждения, имеет средний диаметр пор 6-15 нм. Биокатализаторы на основе  $Fe_3O_4(2)$  полученные полиольным способом обладают мезопорами размер которых, больше размера молекулы GOx, а это означает, фермент не будет блокирован мезопорами образца, а активность биокатализатора будет близка к активности нативного фермента.

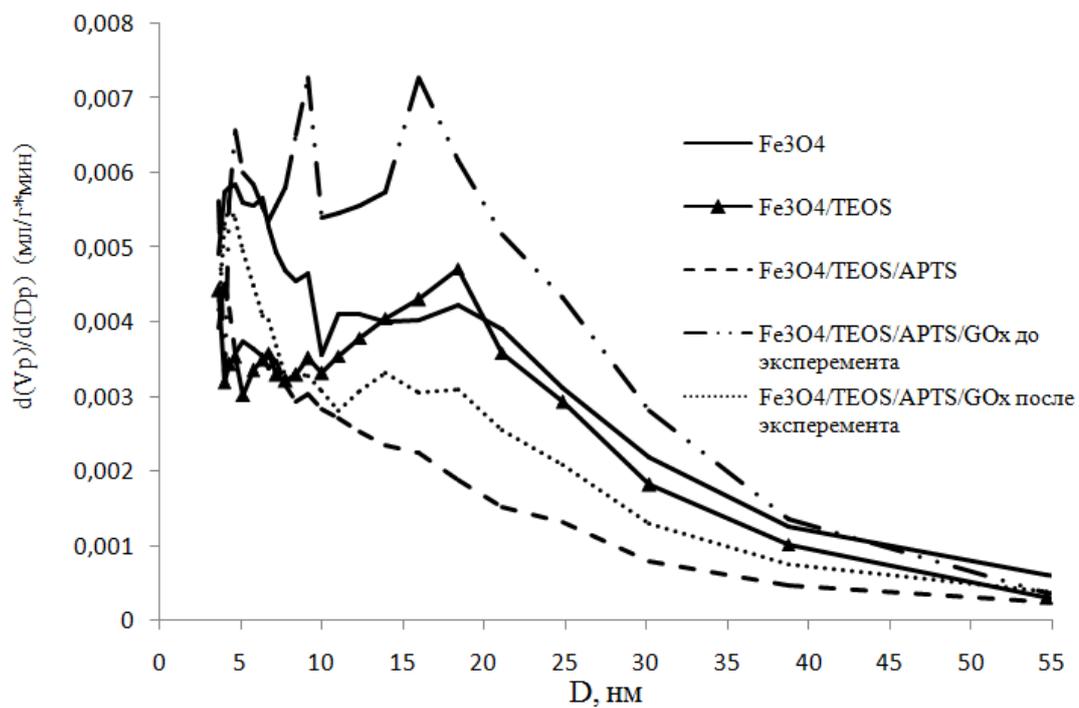
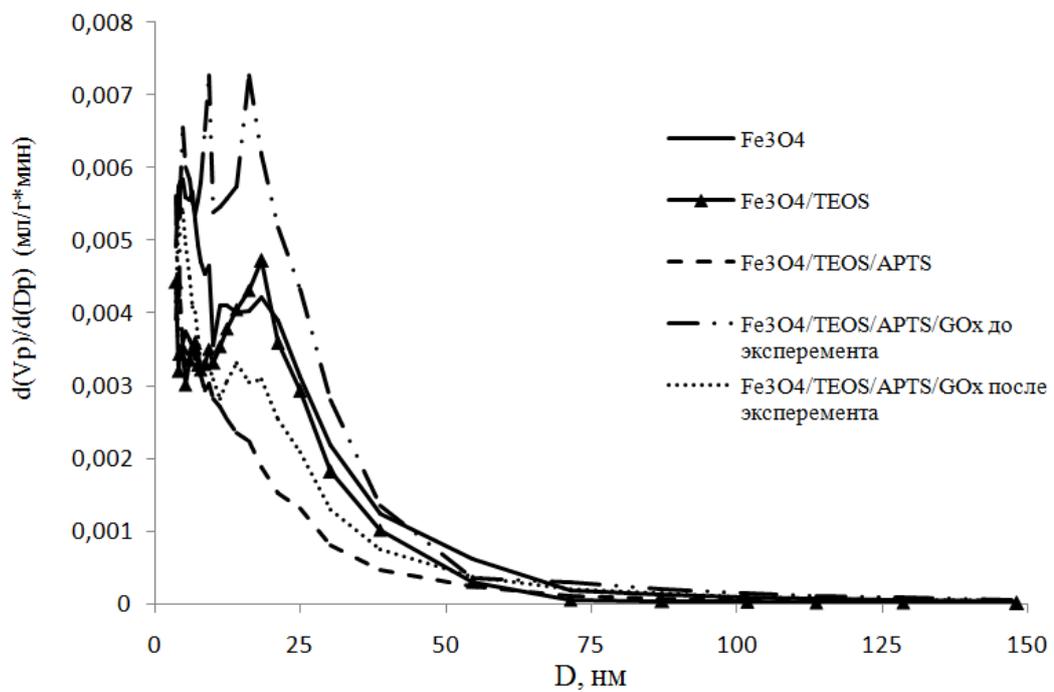


Рисунок 3.34. – График распределения объема пор в зависимости от их диаметра

### 3.6. Анализ активности биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы. Подбор оптимальных условий окисления

#### 3.6.1. Анализ влияния массы субстрата на выход ГК в процессе окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов

Для анализа активности нативного фермента и биокатализаторов в присутствии GOx, варьировали концентрацию субстрата (ГЛ, С моль/л) от 0.05 до 0.75 моль/л. Активность биокатализаторов оценивалась по содержанию ГК в реакционной смеси по окончании процесса и рассчитана как выход ГК (%) на одинаковое количество фермента. На рисунках 3.35-3.36 представлены кривые влияния концентрации субстрата на выход ГК (масс, %) в присутствии различных биокатализаторов, а также в присутствии нативной GOx.

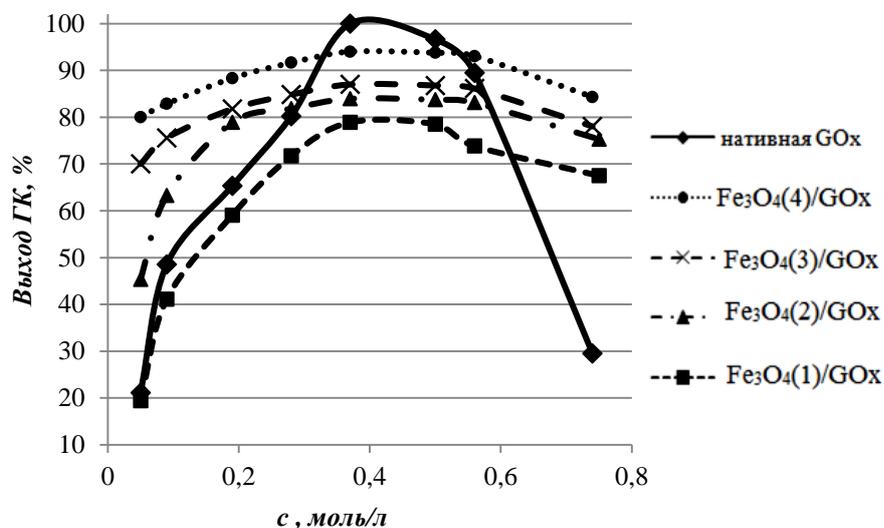


Рисунок 3.35. – Зависимость выхода ГК от концентрации ГЛ в присутствии биокатализаторов на основе МНЧ ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01$  г,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11$  г,  $T = 40$  °С,  $pH = 6.0$ ,  $t = 1$  ч)

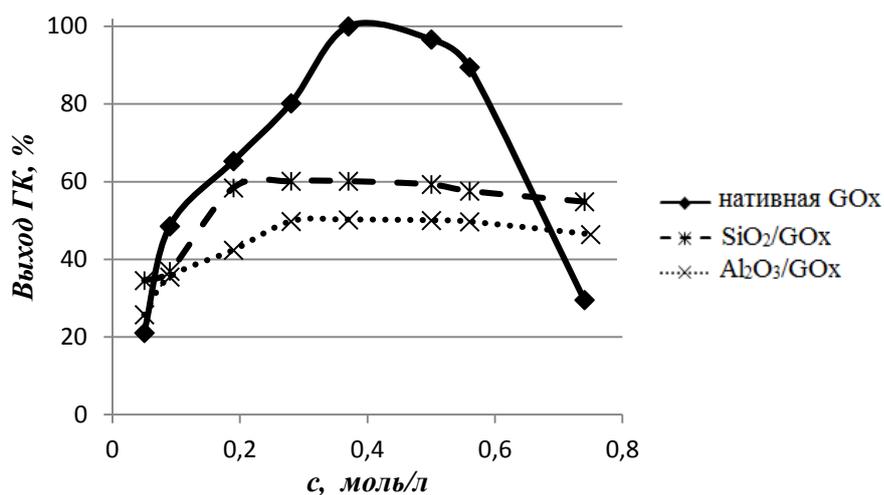


Рисунок 3.36. – Зависимость выхода ГК от концентрации ГЛ в присутствии биокатализаторов на основе SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01$  г,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11$  г,  $T = 40$  °C,  $pH = 6.0$ ,  $t = 1$  ч)

Анализируя экспериментальные данные, можно сделать вывод, о том, что наибольший выход ГК наблюдается при концентрации ГЛ равной 0.37 моль/л и количестве нативного фермента 0.01 г. Такое количество субстрата является оптимальным для насыщения активных центров GOx, представляющих собой по химической структуре ФАД [104-105]. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата с использованием нативной GOx приводит к ингибированию активных центров фермента, что приводит к уменьшению выхода целевого продукта процессе окисления D-глюкозы. После увеличения концентрации субстрата до 0.74 моль/л выход ГК составил 29,54% при использовании нативного фермента.

Выход ГК с использованием биокатализаторов на основе МНЧ при концентрации ГЛ равной 0,37 моль/л составил: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx = 78,91 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx = 83,96%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx = 87,00 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx = 94,00%. Сравнивая биокатализаторы на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, максимальную активность проявил биокатализатор Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx. При увеличении концентрации субстрата до 0.74 моль/л выход ГК с использованием биокатализаторов на

основе МНЧ составляет:  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx} = 67,51 \%$ , что в 2,3 раза выше по сравнению с выходом ГК при использовании нативного фермента;  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx} = 75,32 \%$  - в 2,5 раза выше;  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx} = 78,04 \%$ , - в 2,6 раза выше;  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx} = 84,31\%$  - в 2,8 раз выше.

Выход ГК с использованием биокатализаторов на основе  $\text{SiO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  при концентрации ГЛ равной 0,37 моль/л составил:  $\text{SiO}_2/\text{GOx} = 60,12\%$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx} = 50,21\%$ . Биокатализатор на основе  $\text{SiO}_2$  показал результат выше на 10% в сравнении с биокатализатором на основе  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . При увеличении концентрации субстрата до 0.74 моль/л выход ГК с использованием биокатализаторов на основе диоксида кремния и оксида алюминия составляет:  $\text{SiO}_2/\text{GOx} = 54,85\%$ , что в 1,8 раз выше в сравнение с выходом ГК при использовании нативного фермента;  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx} = 46,41\%$  - в 1,5 раз выше.

Анализируя полученные данные можно утверждать, что иммобилизация фермента GOx на неорганические носители способствует его стабилизации и возможности «работать» в более широком интервале концентрации исходного субстрата. Полученные данные соответствуют данным литературы, полученные при иммобилизации других ферментов [56, 57]. При сравнении активности биокатализаторов на основе различных неорганических носителей, можно отметить, что GOx, иммобилизованная на магнитные частицы, проявляет активность выше на 25-30% (по выходу ГК) по сравнению с  $\text{SiO}_2/\text{GOx}$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$ . Необходимо отметить, что для исследуемых биокатализаторов максимальная активность проявляется при использовании магнитоотделяемого образца  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$  (МНЧ синтезированы полиольным методом). Так при максимальной концентрации ГЛ 0.74 моль/л, выход ГК для нативной GOx снижается со 100% ( $C_{\text{ГК}} 0,37$  моль/л) до 29.54%, тогда как при использовании биокатализатора  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$  выход ГК снижается незначительно с 94.00% до 84,31%.

### 3.6.2. Анализ влияния температуры на выход ГК в процессе окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов

Для изучения влияния температуры на окисление D-глюкозы эксперименты проводились в диапазоне температуры 30-60 °С при рН 6,0, что является оптимальными условиями для процесса окисления в присутствии нативной GOx. Зависимость относительной активности биокатализаторов от температуры представлена на рисунках 3.37-3.38.

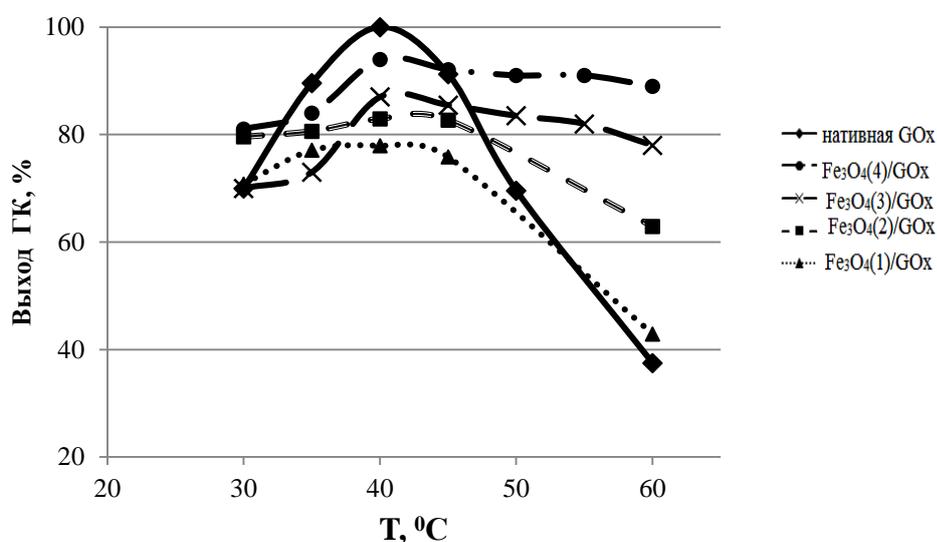


Рисунок 3.37. – Зависимость выхода ГК от температуры в присутствии биокатализаторов на основе МНЧ ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01 \text{ г}$ ,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11 \text{ г}$ ,  $C_{\text{ГЛ}} = 0,37 \text{ моль/л}$ ,  $\text{pH} = 6.0$ ,  $t = 1 \text{ ч}$ )

Из полученных экспериментальных данных, представленных на рисунках 3.37-3.38, видно, что нативный фермент проявляет максимальную активность (выход ГК 100%) при температуре 40 °С, с последующим резким снижением выхода продукта, что указывает на потерю его активности, скорее всего, из-за денатурации фермента при более высоких температурах [56, 57].

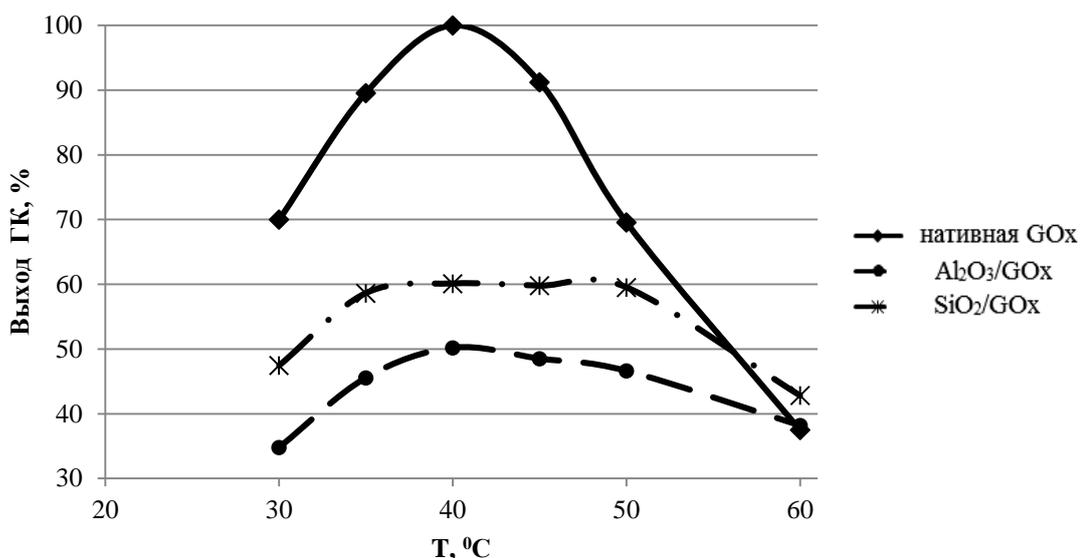


Рисунок 3.38. – Зависимость выхода ГК от температуры в присутствии биокатализаторов на основе SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01$  г,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11$  г,  $C_{\text{ГЛ}} = 0,37$  моль/л, pH = 6,0, t = 1ч)

В случае GOx, иммобилизованной на МНЧ, наблюдается более низкий выход ГК при 30-40 °С по сравнению с нативным GOx. Это происходит из-за некоторой потери подвижности и реактивности GOx после иммобилизации. С другой стороны, дальнейшее повышение температуры до 50 °С привело к значительному увеличению выхода продукта (на 15-30%) по сравнению с нативным ферментом. Анализ полученных данных при температуре 60 °С показал, что выход ГК с использованием биокатализаторов на основе МНЧ составляет: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx = 42,92%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx = 62,91%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx = 78,12%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx = 89,07%, а при использовании нативного фермента выход ГК составляет 37,5%. При 60 °С нативный фермент теряет около 60% активности, а активность иммобилизованных биокатализаторов на основе МНЧ снижается всего на 5 - 10%.

При температуре 60 °С выход ГК с использованием биокатализаторов на основе SiO<sub>2</sub>, на основе Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> составляет: SiO<sub>2</sub>/GOx = 42,83% ; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/GOx = 38,19%. Биокатализатор на основе SiO<sub>2</sub> показал более высокий выхода ГК по

сравнению с биокатализатором на основе  $Al_2O_3$ . В данном случае активность иммобилизованных биокатализаторов на основе  $SiO_2$  и  $Al_2O_3$  снижается на 15-20%.

Для всех биокатализаторов видно, что GOx, иммобилизованная на неорганические носители, более термоустойчива по сравнению с нативной формой.

### 3.6.3. Определение оптимального времени окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов

Для подбора оптимального времени биокаталитического окисления D-глюкозы эксперименты проводились в диапазоне от 30-120 мин. Зависимость выхода ГК от времени, в присутствии разных биокатализаторов представлена на рисунках 3.39-3.40.

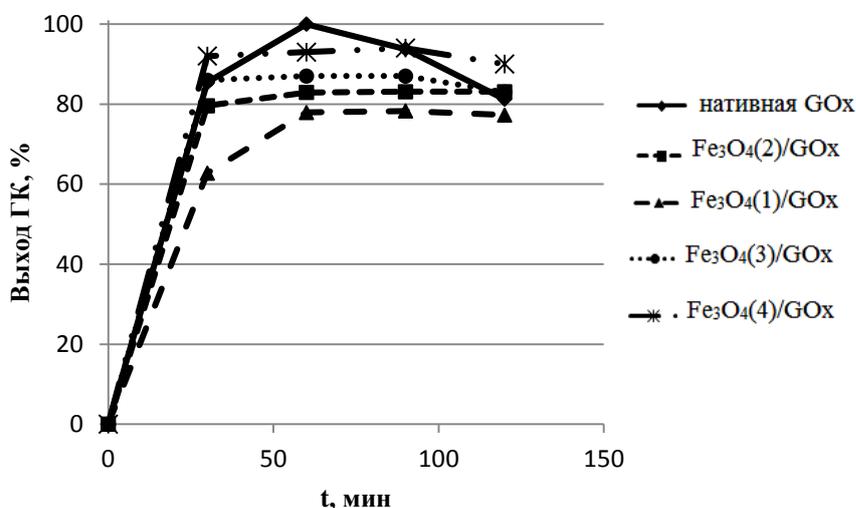


Рисунок 3.39. – Зависимость выхода ГК от времени в присутствии биокатализаторов на основе МНЧ ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01$  г,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11$  г,  $C_{\text{ГЛ}} = 0,37$  моль/л,  $pH = 6.0$ ,  $T = 40$  °C)

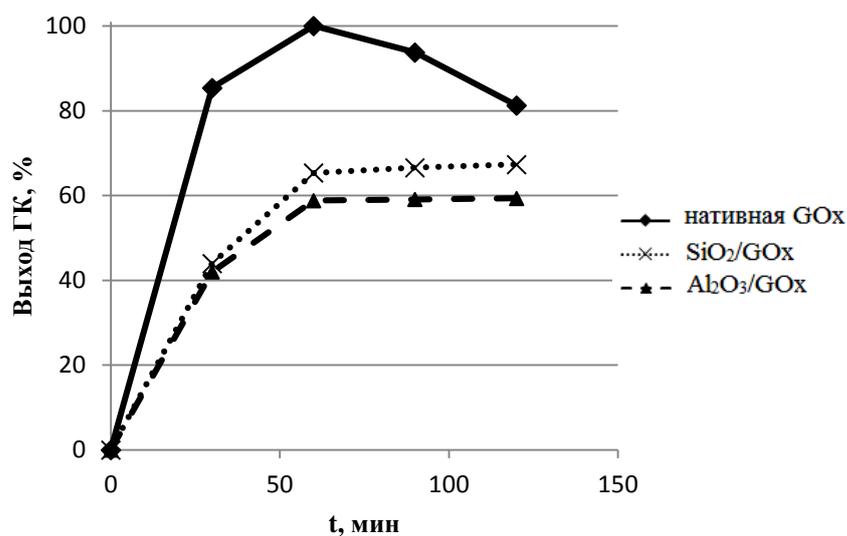


Рисунок 3.40. – Зависимость выхода ГК от времени в присутствии биокатализаторов на основе SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01$  г,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11$  г,  $C_{\text{ГЛ}} = 0,37$  моль/л, pH = 6.0, T = 40 °C)

Анализ полученных данных, показал, что нативный фермент проявляет активность уже после 30 мин от начала эксперимента, а максимальную активность после 1 часа от начала эксперимента, с последующим плавным снижением выхода ГК.

В случае иммобилизованной GOx на МНЧ, наблюдается высокая активность при окислении ГЛ после 30 минут от начала эксперимента у биокатализаторов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx (выход ГК 86,5%), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx (выход ГК 92,1%) по сравнению с нативным GOx выход ГК составил 85,41%. Остальные биокатализаторы: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx = 62,75%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx = 79,58 %, показали выход ГК меньше за 30 минут, по сравнению с нативным ферментом. Максимальная активность (по выходу ГК) для биокатализаторов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GOx достигнута после 60 минут от начала эксперимента: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx - 78,91 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx - 83,96%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx - 87,00 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx - 94,00%.

При этом активность биокатализаторов после 2 часов от начала эксперимента составила: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx - 83,12%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx - 83,20 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx - 90 %, выше на 2-9% по сравнению с нативной GOx (81,25%).

После 30 минут от начала эксперимента выход ГК в присутствии биокатализаторов на основе  $\text{SiO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  составляет:  $\text{SiO}_2/\text{GOx}$  - 43,96%,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$  - 41,97%, а после 2 часов от начала эксперимента выход ГК увеличился на 34,71% и 29,27% соответственно и составил:  $\text{SiO}_2/\text{GOx}$  - 67,33%,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$  - 59,34%.

Анализ зависимости выхода ГК от времени в присутствии нативного фермента и иммобилизованного на различные неорганические носители, показал, что нативный фермент проявляет максимальную активность при 60 минутах, после чего активность снижается. В случае иммобилизованного фермента (для всех исследуемых носителей) максимальная активность также достигается при 60 минутах и в последующие 60 минут не изменяется, что говорит о временной стабильности GOx, иммобилизованной на неорганические носители.

#### 3.6.4. Анализ влияния pH на выход ГК в процессе окисления D-глюкозы в присутствии биокатализаторов

Хорошо известно, что активность фермента сильно зависит от состояния ионизации аминокислоты в активном участке, таким образом, pH – является одним из ключевых факторов каталитической реакции [106]. GOx обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей значениям pH среды 4.0-8.0 [107]. Влияние изменения pH среды на молекулу фермента заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (COOH-группы,  $\text{NH}_2$ -группы и др.). При резких сдвигах от оптимума pH среды, фермент может подвергаться конформационным изменениям, приводящие к потере активности [108-109]. Зависимость выхода ГК от pH реакционного раствора, в присутствии разных биокатализаторов представлена на рисунках 3.41-3.42.

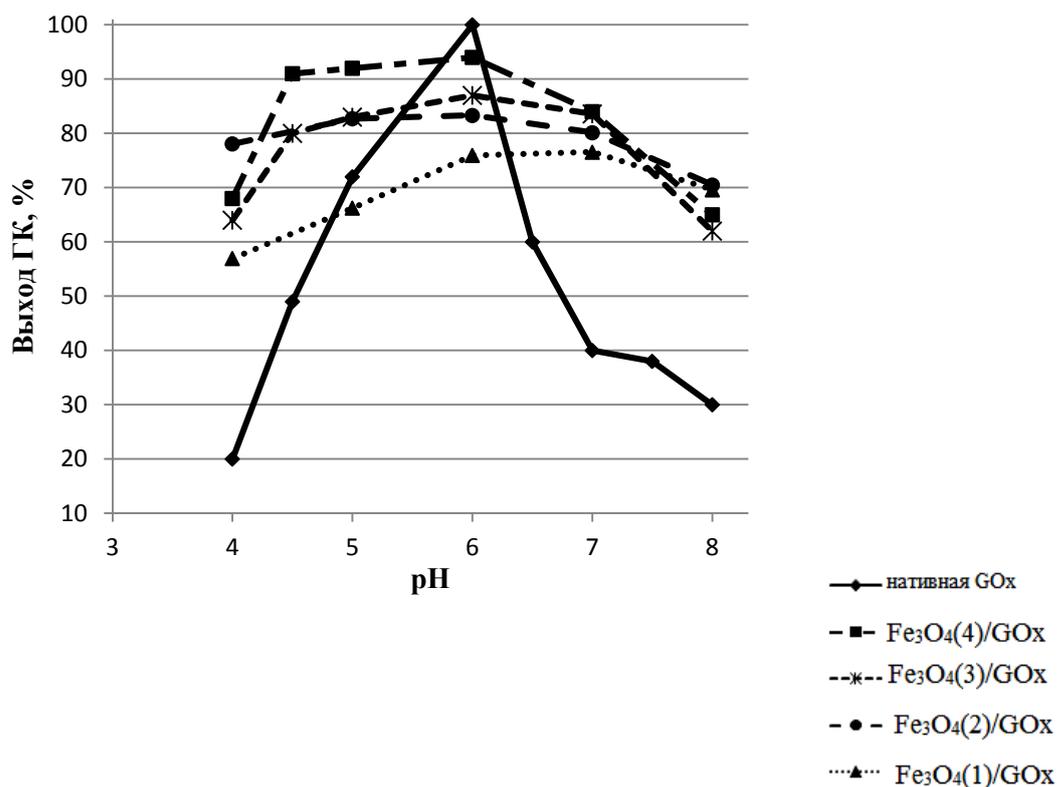


Рисунок 3.41. – Зависимость выхода ГК от pH реакционного раствора в присутствии биокатализаторов на основе МНЧ ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01$  г,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11$  г,  $C_{\text{ГЛ}} = 0,37$  моль/л,  $T = 40$  °C,  $t = 1$  ч)

Из полученных данных видно, что зависимость активности для нативной GOx показывает резкий максимум при 100% при pH 6.0, тогда как при более высоких и меньших значениях pH активность уменьшается («колоколообразная» зависимость). Для всех полученных биокатализаторов на основе иммобилизованной GOx, активность остается высокой в диапазоне pH 4.0-8.0. Биокатализатор на основе GOx, иммобилизованной на оксид алюминия позволил получить ГК 50,21%, что оказалось ниже по сравнению с GOx, иммобилизованной на диоксида кремния (60,13%). В случае МНЧ, все образцы демонстрируют высокую активность (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx - 94%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx, – 87%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx, – 83,96% Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx – 78,91%). Наиболее высокая активность биокатализаторов наблюдается при pH 6.0 - 8.0.

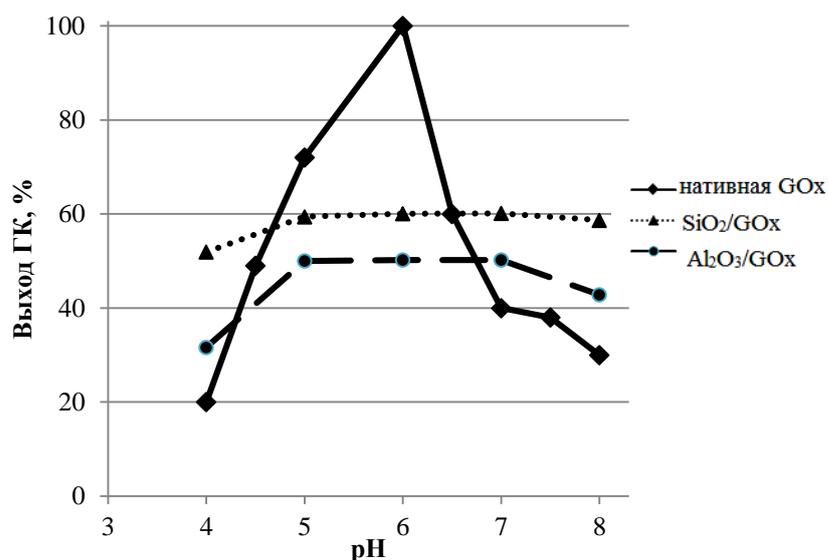


Рисунок 3.42. – Зависимость выхода ГК от pH реакционного раствора в присутствии биокатализаторов на основе SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( $m_{\text{нативного фермента}} = 0.01$  г,  $m_{\text{биокатализатора}} = 0.11$  г,  $C_{\text{ГЛ}} = 0,37$  моль/л,  $T = 40$  °C,  $t = 1$  ч)

При pH 7.0 нативный фермент теряет около 60% активности (по выходу ГК), тогда как активность иммобилизованных биокатализаторов на основе МНЧ снижается всего на 2-9% (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx – 76,56 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx, – 80,17%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx, – 83,59% Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx – 84,98%). При pH 8.0 активность нативного фермента снижается уже на 70%, тогда как у биокатализаторов на основе МНЧ активность снижается всего на 6-20% Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)/GOx – 65,00 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx, – 62,00 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx, – 70,51 %, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx – 69,62%.

Анализируя полученные данные для биокатализаторов на основе Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и SiO<sub>2</sub> при pH 7.0, их активность не снизилась и составила 50,21% и 60,13% соответственно, в сравнении с pH 6.0, когда нативный фермент потерял около 60% активности. При pH 8.0 активность биокатализаторов (по выходу ГК) составила Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - 42,83% и SiO<sub>2</sub> - 58,65%, снижение активности произошло на 2-8%, в отличие от нативного фермента, который теряет 70% активности.

Таким образом, получены стабильные биокатализаторы на основе МНЧ, связанные с высокой активностью в широком диапазоне pH, делает эти биокатализаторы перспективными для практического применения.

### 3.6.5. Сравнение активности биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы

Для определения наиболее активного биокатализатора на основе GOx, иммобилизованной на различные неорганические носители, были проведены эксперименты по сравнительной оценке активности фермента от способа приготовления биокатализатора, в том числе и от природы носителя. Активность биокатализаторов оценивалась по содержанию ГК в реакционной смеси по окончании процесса и рассчитана как выход ГК (%) на одинаковое количество фермента. Результаты сравнения активности полученных биокатализаторов по содержанию ГК представлены в виде диаграммы (рисунок 3.43). Окисление водного раствора ГЛ до ГК в присутствии биокатализаторов проводилось в оптимальных условиях, а именно:

- концентрация глюкозы – 0.37 моль/л
- масса нативного фермента – 0.01г
- масса биокатализатора- 0.11 г
- время реакции 60 мин
- температура 40 °С
- pH реакционного раствора 6.0

Сравнение биокатализаторов на основе SiO<sub>2</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с биокатализаторами на основе МНЧ показало, что выход ГК выше при использовании биокатализаторов на основе МНЧ. При сравнении биокатализаторов на основе МНЧ синтезированных различными методами было установлено, что наиболее эффективным носителем является наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, синтезированные полиольным способом. Для образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx, выход ГК составил 94%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx, – 87%, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx, – 84% (в случае нативного фермента выход ГК составил 100%). Из полученных результатов видно, что на активность биокатализаторов влияет природа носителя, способ и время получения МНЧ (т.к. образцы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4)/GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx выдерживались при 200 °С в течение 48 часов, а Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx - в течение 2 часов). В присутствии биокатализатора

$\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$ , когда МНЧ были синтезированы методом соосаждения, выход ГК составил 79%, что ниже на 10 – 15% по сравнению с полиольными частицами  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . При использовании неорганических носителей  $\text{SiO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  для иммобилизации  $\text{GOx}$ , выход ГК составил 60% и 50% соответственно.

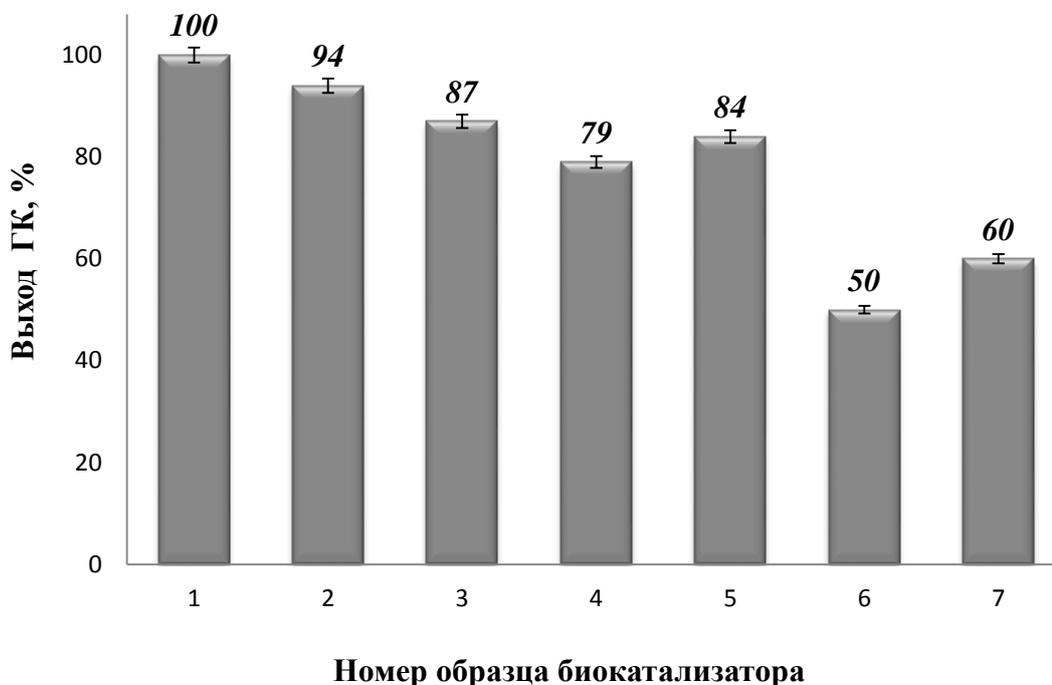


Рисунок 3.43. – Сравнение активности биокатализаторов по выходу ГК: 1 – нативный  $\text{GOx}$ , 2 –  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$ , 3 –  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx}$ , 4 –  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$ , 5 -  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2) /\text{GOx}$ , 6 –  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx}$ , 7 –  $\text{SiO}_2/\text{GOx}$

### 3.6.6. Анализ стабильности биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы

Одной из наиболее важных характеристик является стабильность биокатализатора (реакционная стабильность), которая позволяет сохранить первоначальную активность в течение нескольких циклов работы.

Для оценки стабильности синтезированных биокатализаторов были выполнены 10 последовательных экспериментов окисления ГЛ до ГК. После каждой реакции биокатализатор на основе МНЧ отделялся неодимовым магнитом и снова использовался в последовательной реакции. Биокатализаторы на основе оксида алюминия и диоксида кремния от реакционной смеси

отделялся центрифугированием (200 об/мин в течение 60 сек). Полученные результаты представлены на рисунках 3.44-3.45.

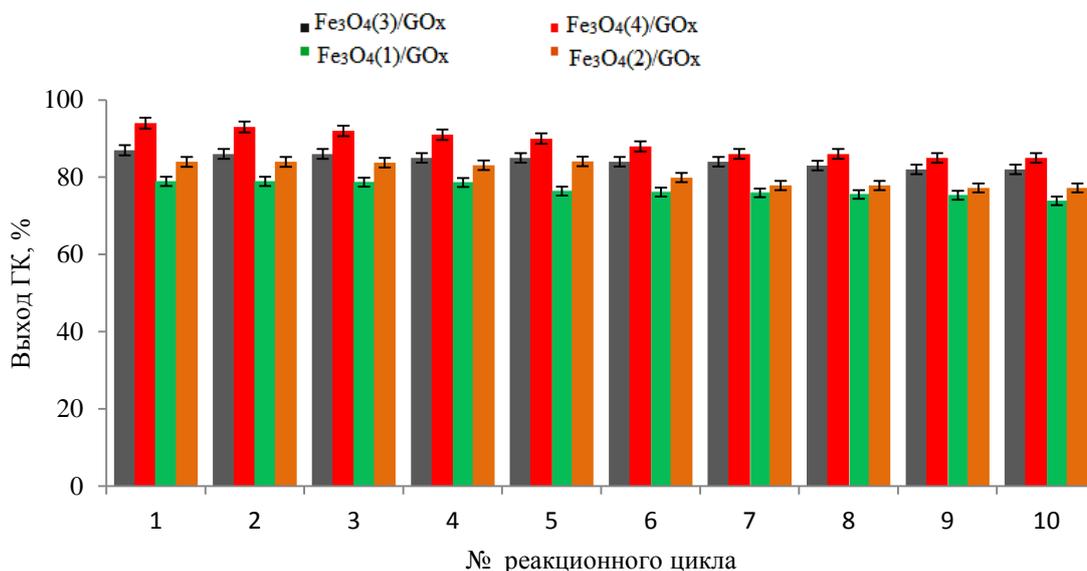


Рисунок 3.44. – Определение стабильности биокатализаторов на основе MnO<sub>2</sub>

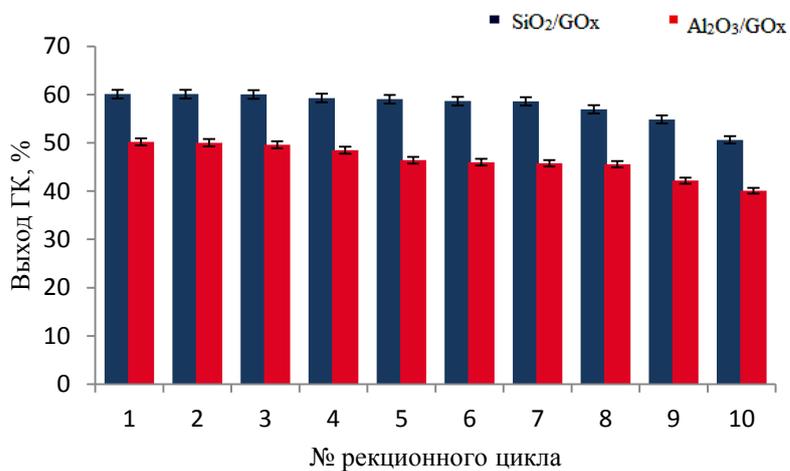


Рисунок 3.45. – Определение стабильности биокатализаторов на основе SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Полученные данные указывают на то, что наиболее стабильным биокатализатором является GOx, иммобилизованная на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(3)/GOx. Из

представленных данных, видно что,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx}$  теряет только 7% своей активности после десяти каталитических циклов,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$  теряет 10%,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx}$  теряет 9%,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$  8%. Биокатализатор на основе  $\text{GOx}$ , иммобилизованной на  $\text{SiO}_2$  теряет 16%, а на  $\text{Al}_2\text{O}_3$  - теряет 20%.

Вероятно, более высокая стабильность катализаторов на основе МНЧ обусловлена образованием опорной поверхности для  $\text{GOx}$ , которая предотвращает разрушение фермента. Высокая стабильность иммобилизованных ферментов на основе МНЧ уже описывалась в некоторых работах [110-112].

### 3.7. Определение кинетических параметров

Константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции являются наиболее важными кинетическими параметрами, позволяющими оценить эффективность фермента и получить представление о ключевых характеристиках иммобилизованного фермента. Для определения кинетических параметров проводились эксперименты для биокатализаторов, при разной концентрации ГЛ (3.8мМ, 19мМ, 38мМ, 190мМ, 380мМ).

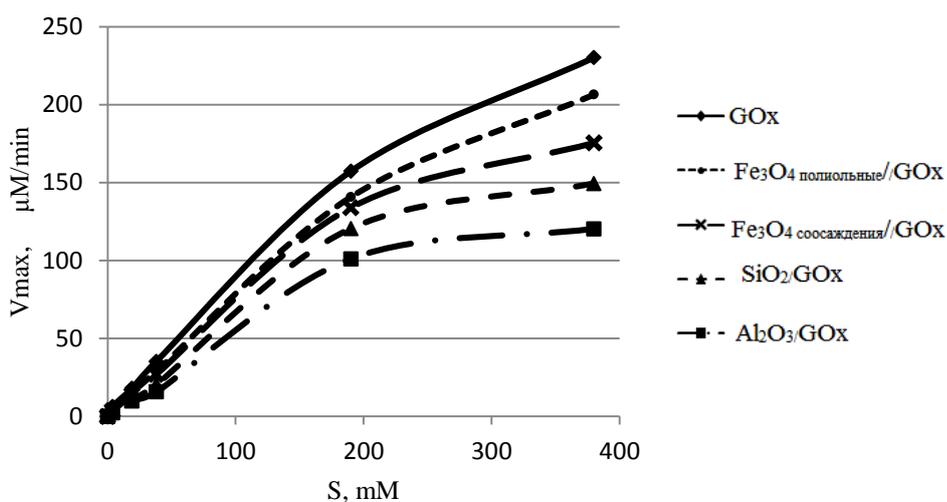


Рисунок 3.46. – Кинетические кривые

Более низкое значение  $K_m$  соответствует более высокому сродству между субстратом и ферментом, тогда как более высокое значение  $V_{max}$  отражает более высокую скорость реакции [112]. Соотношение  $V_{max}/K_m$  позволяет сравнить каталитическую эффективность в каждой системе фермент-субстрат [112-113]. Чем больше значение  $V_{max}/K_m$ , тем выше эффективность биокатализатора.

Для расчета константы Михаэлиса на основе кинетических кривых (рисунок 3.46.), методом Лайнуивера-Бёрка получена зависимость  $1/V$  от  $1/[S]$ . Полученная прямая на пересечении с осью ординат дает  $1/V_{max}$ . А с осью абсцисс – минус  $1/K_m$ . Угол наклона -  $K_m/V_{max}$ , где  $V$  – начальная скорость реакции,  $V_{max}$  - максимальная скорость реакции;  $K_m$  - константа Михаэлиса;  $[S]$  – начальная концентрация субстрата.

Значения кинетических параметров реакции окисления D-глюкозы, определенные по графику в координатах Лайнуивера – Берка (рисунок 3.47) приведены в таблице 3.17.

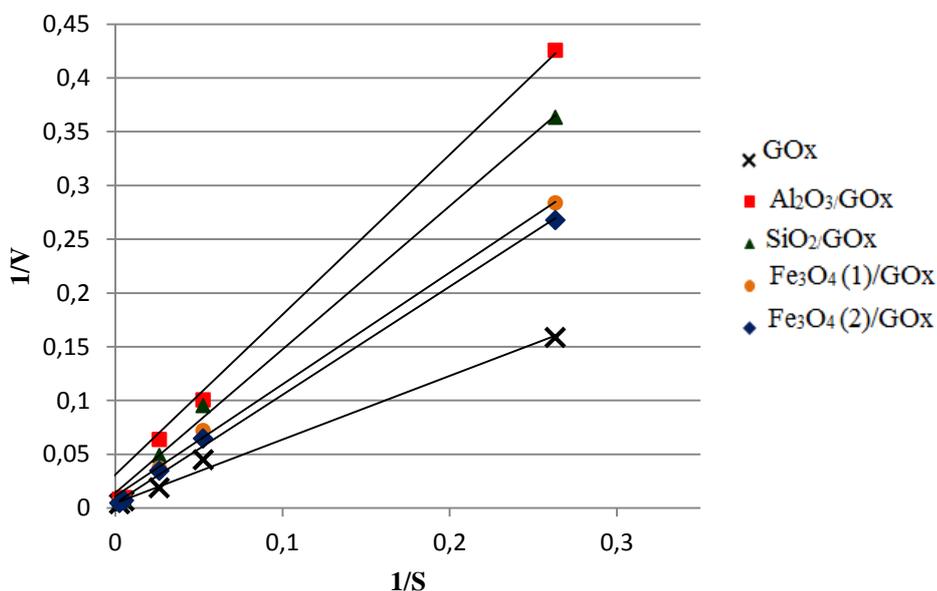


Рисунок 3.47. – Зависимость  $1/V$  от  $1/S$  в реакции окисления ГЛ в присутствии GOx, иммобилизованной на различные неорганические носители

Таблица 3.17. – Кинетические параметры реакции окисления D-глюкозы

Биокатализатор	$K_m$ mM	$V_{max}$ $\mu$ M/min	$V_{max}/K_m \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$
GOx	94,70	220,22	2,35
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /GOx	136,99	32,26	0,24
SiO <sub>2</sub> /GOx	123,92	70,67	0,57
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/GOx	116,47	145,77	1,25
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (2)/GOx	103,09	194,17	1,88

Из таблицы 3.17 видно что при окислении D- глюкозы нативным ферментом GOx  $K_m = 94,7$  mM (самое низкое значение), и максимальное значение  $V_{max} = 220,22$  mM/мин, что объясняется высокой активностью фермента.

Из полученных данных видно, что максимально близкие по значению кинетические показатели  $K_m$  (103,09 mM),  $V_{max}$  (194,17 mM/мин) и  $V_{max}/K_m$  ( $1.25 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) к нативному ферменту обладает биокатализатор на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (2), полученного полиольным способом. Высокая активность образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(2)/GOx, вероятно объясняется синергетическим эффектом GOx с оксидом железа. Известно, что Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> обладает собственной фермент-подобной активностью [112], а также усиливает активность иммобилизованной GOx, вследствие чего, данный биокатализатор является высокоэффективным. Следующим по эффективности является биокатализатор на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(1)полученный методом соосаждения (таблица 3.17). Менее эффективными оказались биокатализаторы на основе на SiO<sub>2</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Так для образца Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/GOx соотношение  $V_{max}/K_m$  на порядок меньше по сравнению с нативной GOx.

### 3.8. Корреляция каталитической активности и физико-химических характеристик синтезированных биокатализаторов

В представленной диссертационной работе синтезированы биокатализаторы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на

неорганические носители. В зависимости от природы неорганического носителя, синтезированные биокатализаторы проявили различную каталитическую активность в реакции окисления ГЛ до ГК.

Для синтеза биокатализаторов использовали магнитные частицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , полученные методом осаждения и полиольным методом. Результаты ПЭМ и СЭМ показали, что в зависимости от условий синтеза образуются частицы разной структуры и разного размера. В таблице 3.18 представлены данные ПЭМ магнитных носителей и результаты тестирования биокатализаторов на их основе.

Таблица 3.18. – Данные ПЭМ магнитных носителей и результаты тестирования биокатализаторов на их основе

Носитель /биокатализатор	Метод получения $\text{Fe}_3\text{O}_4$	Размер частиц $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , нм	Выход ГК, %	Выход ГК, после 10-ти циклов, %
$\text{Fe}_3\text{O}_4(1)$ / $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx}$	Соосаждения	50-200	79	71
$\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ / $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx}$	Полиольный*	$111 \pm 5$	84	75
$\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ / $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx}$	Полиольный**	$430 \pm 60$	87	80
$\text{Fe}_3\text{O}_4(4)$ / $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$	Полиольный***	$285 \pm 71$	94	84

\*Объем этиленгликоля 30 мл и выдержка при 200 °С 2 часа

\*\*Объем этиленгликоля 30 мл и выдержка при 200 °С 48 часов

\*\*\*Объем этиленгликоля 20 мл и выдержка при 200 °С 48 часов

Необходимо отметить, что по результатам низкотемпературной адсорбции азота, все магнитные носители имеют близкую удельную поверхность, порядка 50 м<sup>2</sup>/г, но катализаторы на основе МНЧ имеют разную

активность, в зависимости от способа получения. Из представленных данных (Таблица 3.18) видно, что наиболее активным является биокатализатор  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx}$ , размер частиц носителя для которого составляет  $285\pm 71$  нм. Вероятно, что при большем размере МНЧ ( $430\pm 60$  нм для  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)$ ) и при меньшем их размере ( $111\pm 5$  нм для  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)$ ), биокатализаторы обладают чуть меньшей активностью, что вероятно связано с «неполным» распределением (конформационным расположением) молекулы GOx на их поверхности.

Для всех неорганических носителей ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ), методами ИК-спектроскопии и РФЭС показано, что на их поверхности, модифицированной TEOS, APTES и сшивающим агентом GA, происходит ковалентное связывание GOx. По анализу фильтрата было установлено, что максимальное количество фермента пришивается к биокатализатору на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , более 85%, тогда как к биокатализатору на основе оксида алюминия пришивается всего 60,54% фермента, а на основе диоксида кремния 65,84% фермента. Возможно, это объясняется тем, что поверхность частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , модифицируется TEOS, в отличие от  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ . В таблице 3.19 представлены данные ПЭМ, ВЕТ, неорганических носителей и результаты тестирования биокатализаторов на их основе.

По данным, представленным в таблице 3.19, видно, что удельная поверхность образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  невелика и практически одинаковая, в тоже время, поверхность  $\text{SiO}_2$  больше на порядок. При этом размер пор для диоксида кремния составляет 3-5 нм, что меньше размера молекулы фермента ( $6,0\text{ нм} \cdot 5,2\text{ нм} \cdot 7,7\text{ нм}$ ) и вероятно, иммобилизация GOx происходит на поверхности, а не в порах носителя. Для остальных неорганических носителей размер пор больше молекулы GOx и можно предположить, что ковалентное связывание проходит как на поверхности, так и в порах носителя.

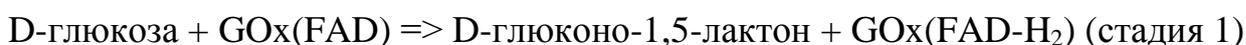
Необходимо отметить, что активность биокатализаторов на основе GOx иммобилизованной  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  значительно выше, по сравнению с  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и  $\text{SiO}_2$ . Вероятно, это объясняется синергетическим эффектом GOx с оксидом железа. В тоже время стабильность биокатализаторов, также выше систем на основе

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, по сравнению с биокатализаторами на Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и SiO<sub>2</sub>. Можно предположить, что для систем с Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, имеет место более сильное ковалентное связывание молекулы фермента на поверхности.

Таблица 3.19. – Данные ПЭМ, ВЕТ, неорганических носителей и результаты тестирования биокатализаторов на их основе

Носитель /биокатализатор	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Средний размер пор, нм	Выход ГК, %	Выход ГК, после 10-ти циклов, %
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1) /Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (1)/GOx	57	6-15	79	71
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (4) /Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (4)/GOx	46	15-26	94	84
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> / Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /GOx	54	5-14	50	30
SiO <sub>2</sub> / SiO <sub>2</sub> / GOx	500	3-5	60	44

Схематическое представление процесса окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты можно представить в виде следующих стадий [60]:



Окисление ГЛ до ГК проходит в присутствии фермента глюкозооксидаза, который содержит в качестве кофактора флавинадениндинуклеотид (ФАД), компонент окислительно-восстановительной реакции. В процессе реакции

происходит изменение кофактора  $\text{FAD} \Rightarrow \text{FAD-H}_2 \Rightarrow \text{FAD}$ , которое сопровождается передачей электронов и ионов водорода.

Можно предположить, что присутствие магнито-отделяемого носителя  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (в составе которого есть ион-окислитель  $\text{Fe}^{+3}$ ) способствует протеканию стадии 2, в отличие от носителей  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и  $\text{SiO}_2$ . Это предположение также может объяснить более высокую активность магнитоотделяемых биокатализаторов по сравнению с биокатализаторами на других неорганических носителях.

Таким образом, представленные данные показывают, что в зависимости от природы неорганического носителя, синтезированные биокатализаторы проявляют различную каталитическую активность в реакции окисления ГЛ до ГК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Синтезированы биокатализаторы (в том числе магнитоотделяемые) на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические носители.
2. Подобраны условия синтеза магнитных наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Оптимальный метод синтеза МНЧ – полиольный. Основные условия синтеза: 20 мл этиленгликоля, 3 ммоль  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 ммоль янтарной кислоты, 30 ммоль мочевины. Выдержка при 200 °С в течении 48-х часов. Полученные полиольным способом наночастицы обладают достаточно высокой намагниченностью и образуют монодисперсные частицы со средним диаметром  $285 \pm 71$  нм.
3. Предложена схема создания модифицированных МНЧ «ядро-оболочка». На первой стадии с помощью TEOS формируют  $\text{Si}(\text{OH})_4$  оболочку, а на второй стадии с помощью APTES образованная  $\text{Si}(\text{OH})_4$  оболочка модифицируется с  $\text{NH}_2$ -группами. Для неорганических носителей  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  для модификации поверхности использовался APTES. Для ковалентного связывания фермента с неорганическими носителями использовался глутаровый альдегид.
4. По результатам просвечивающей электронной микроскопии биокатализаторов, иммобилизованных на  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , показано, что агрегированные частицы состоят из отдельных наночастиц диаметром ~ 42-45 нм. Из анализа кривых намагничивания биокатализаторов, иммобилизованных на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , доказано, что исследованные образцы обладают высокой намагниченностью.
5. Методами ИК-Фурье спектроскопии, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и РФЭС показано, что в процессе иммобилизации ГОх на неорганические носители происходит закрепление фермента с образованием прочных ковалентных связей между молекулой фермента и модифицированной поверхностью носителя.

6. По данным, полученным методом низкотемпературной адсорбции азота, можно сделать вывод о том, что все синтезированные биокатализаторы имеют мезопористую структуру. Биокатализаторы на  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , синтезированные полиольным способом, обладают мезопорами, размер которых близок к размеру молекулы  $\text{GOx}$ , что способствует закреплению фермента именно в мезопорах носителя.
7. Определены оптимальные условия процесса окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии биокатализаторов:  $C_{\text{ГЛ}} - 0.37$  моль/л,  $m_{\text{биокатализатора}} - 0.11$  г,  $t_{\text{реакции}} - 60$  мин,  $T - 40$  °С, pH 6.0.
8. Получены данные по активности биокатализаторов в процессе окисления ГЛ до ГК. Выход ГК с использованием биокатализаторов составил:  $\text{Fe}_3\text{O}_4(1)/\text{GOx} - 79\%$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(2)/\text{GOx} - 84\%$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx} - 87\%$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4(4)/\text{GOx} - 94\%$ ,  $\text{SiO}_2/\text{GOx} - 60\%$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GOx} - 50\%$ .
9. Изучена стабильность биокатализаторов в процессе окисления ГЛ до ГК. В десяти последовательных циклах магнитоотделяемый биокатализатор  $\text{Fe}_3\text{O}_4(3)/\text{GOx}$  теряет только 7% своей активности, тогда как биокатализатор на основе  $\text{GOx}$ , иммобилизованной на  $\text{SiO}_2$ , теряет 16%, а на  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – 20% активности.
10. Получены кинетические параметры реакции окисления D-глюкозы. Для  $\text{GOx}$   $K_m = 94,70$ ,  $V_{\text{max}} = 220,22$  мМ/мин, что объясняется высокой активностью фермента. Показано, что наиболее близким к нативному ферменту является биокатализатор на  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , полученный полиольным способом, для которого кинетические параметры составили:  $K_m=103,09$  мМ,  $V_{\text{max}}=194,17$  мМ/мин.
11. Выявлены корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их эффективности в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Показано, что в зависимости от природы, структуры, поверхности, размера частиц неорганического носителя синтезированные биокатализаторы проявляют различную каталитическую активность в реакции окисления ГЛ до ГК.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 416 с.
2. Моррисон Р., Бойд Р. Органическая химия. Перевод с англ. М.: Мир, 1974. 1133 с.
3. Губен И. Методы органической химии. М.: НКХЛ, 1941. т. 1 432 с.
4. Бендер М., Бергирон Р., Комияма М. Биоорганическая химия ферментативного катализа. М.: Мир, 1987. 352 с.
5. Щеголев А.Е., Яковлев И.П., Органическая химия. СПб.: Лань, 2016. 679с.
6. Ким А.М. Органическая химия. Новосибирск: Сибирское университетское изд-во. 2002. 844 с.
7. Матвеева В.Г. Новые каталитические системы в реакциях селективного гидрирования и окисления кислородсодержащих органических соединений: дис. доктора хим наук. М., 2001. 381 с.
8. Девис М. Витамин С. Химия и биохимия. М: Мир. 1999. 176 с.
9. Singh J.V. Kinetics and mechanism of oxidation of D-glucose by quinolinium chlorochromate (QCC) in aqueous acetic acid medium // Communications. 2003. Vol. 26. P. 72-79.
10. Bayen R. Oxidation of D-glucose in the presence of 2,2'-bipyridine by CrVI in aqueous micellar media: a kinetic study // Carbohydrate research. 2005. Vol. 340. P. 2163-2170.
11. Signorella S., Lafarga R., Ciullo L., Sala L.F. Oxidation of D-Glucose by Cu (II) in Acidic Medium // Carbohydrate Research. 1994. Vol. 259. N. 1. P. 35-43.
12. Кисленко В.Н., Берлин А.А., Литовченко Н.В. Кинетика окисления глюкозы персульфат-ионом в присутствии ионов Mn (II) // Кинетика и катализ. 1994. Т. 38. С. 391-396.
13. Авруцкая И.А., Фиошин М.Я. Исследование процесса электрохимического окисления глюкозы // ЖПХ. 1969. Т. 42. С. 2294-2301.

14. Dharuman V. RuO<sub>2</sub> electrode surface effects in electrocatalytic oxidation of glucose // J. Solid State Electrochem. 2006. Vol. 10. P. 967-979.
15. Tominaga M. Electrocatalytic oxidation of glucose at gold nanoparticle-modified carbon electrodes in alkaline and neutral solutions // J. Solid State Electrochem. 2005. Vol. 7. P. 189-193.
16. Yu J. J. Characterization of gold nanoparticles electrochemically deposited on amine-functionalized mesoporous silica films and electrocatalytic oxidation of glucose // J. Solid State Electrochem. 2007. Vol. 11. P. 1211-1219.
17. Popovic K.D., Tricovic A.V., Adzic R.R. Oxidation of D-Glucose on Single-Crystal Platinum Electrodes. A Mechanistic Study // J. of Electroanalytical Chemistry. 1992. V.339. P.227-245.
18. Bae I.T., Yeager E., Xing X. et al. In situ Infrared Studies of Glucose-Oxidation on Platinum in an Alkaline-Medium // J. of Electroanalytical Chemistry. 1991. V.309. P. 131-145.
19. Zhang X., Chan K. Y., You J.K., Lin Z.G., Tseung A. C. Partial Oxidation of Glucose by a Pt-Vertical-Bar-WO<sub>3</sub> Electrode // J. of Electroanalytical Chemistry. 1997. V. 430. P.147-153.
20. Becerik L., Kadirgan F. Electrocatalytic Properties of Platinum Particles Incorporated with Polypyrrole Films in D-Glucose Oxidation in Phosphate Media // J. of Electroanalytical Chemistry. 1997. V. 436. P.189-193.
21. Kelaidopoulou A., Papoutsis A., Kokkinidis G. Electrooxidation of (3-D(+))glucose on bare and u.p.d. modified platinum particles dispersed in polyaniline // Journal of Applied Electrochemistry. 1999. V. 29. № 1. P. 101-107.
22. Sun Y.P., Sun J.Q., Zhang X., Sun C.Q., Wang Y., Shen J.C. Chemically Modified Electrode via Layer by Layer Deposition of Glucose-Oxidase (God) and Polycation-Bearing Os Complex // J. Thin Solid Films. 1998. V.329. P.730-733.

23. Гусейнов М.А., Акимова Ж.Н., Алиев З.М. Электрохимическое окисление глюкозы на оксидно-рутениево-титановом аноде // Вестник Дагестанского государственного университета. 2007. № 4. С.70-71.
24. Матвеева В. Г., Сульман Э. М., Сульман М. Г. Каталитическое окисление D-глюкозы и L-сорбозы в синтезе витаминов // Катализ в промышленности. 2002. № 5. С. 50-59.
25. Dirkx J.M.H. The Oxidation of Glucose with Platinum on Carbon as Catalyst // J. Catal. 1981. Vol. 67. P. 1-13.
26. Besson M. Catalytic Oxidation of Glucose on Bismuth-Promoted Palladium Catalysts // J. Catal. 1995. Vol. 152. P. 116-121.
27. Автушенко М.В. Каталитическое окисление альдо- и кетогексоз: дис. канд. хим. наук Тверь, 1996. 148с.
28. Heyns K. Oxidative Umwandlungen an Kohlenhydraten // An. Chem. 1947. Vol. 558. P. 171-192.
29. Palladium-catalyzed aldose oxidation to aldonic acids: пат. 4108891 США, 05/765.203; заявл. 3.02.1977; опубл. 22.08.1978.
30. Bonnemann H. Selective Oxidation of Glucose on Bismuth-Promoted Pd-Pt/C Catalysts Prepared from  $\text{NOct}_4\text{Cl}$ -Stabilized Pd-Pt Colloids // Inorganika Chimica Acta. 1998. Vol. 270. P. 95-110.
31. Pollmann J. An X-Ray Photoelectron -Spectroscopy Investigation of a Novel Pd-Pt Colloid Catalyst // J. Electron Spectros. Relat. Phenom. 1998. Vol. 94. P. 219-227.
32. Karski S., Paryjczak T., Witonska I. Selective Oxidation of Glucose to Gluconic Acid over Bimetallic Pd-Me Catalysts (Me = Bi, Tl, Sn, Co) // Kinetics and Catalysis. 2003. Vol. 44. P. 618-622.
33. Comotti M., Della Pina C., Rossi M. Mono- and bimetallic catalysts for glucose oxidation // J. Mol. Catal. A: Chemical. 2006. Vol. 251. P. 89-92.
34. Heyns K. Oxidative Umwandlungen an Kohlenhydraten // An. Chem. 1947. Vol. 558. P. 171-192.

35. Besson M., Gallezot P., Pinel C. Conversion of Biomass into Chemicals over Metal Catalysts // *Chemical Reviews*. 2014. Vol. 114, № 3. P. 1827–1870.
36. Ma Z., Dai S. Development of novel supported gold catalysts: A materials perspective // *Nano Research*. 2010 Vol. 4 P. 3-32
37. Lang N.J., Liu B., Liu J. Characterization of glucose oxidation by gold nanoparticles using nanoceria // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014. Vol. 428 P. 78–83
38. Yoshimoto M. Glucose oxidation catalyzed by liposomal glucose oxidase in the presence of catalase-containing liposomes // *Biotechnol. Progr.* 2006. Vol. 22. P. 704-705.
39. Betancor L. Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger* // *J. Biotechnol.* 2006. Vol. 121. P. 284-289.
40. Anastassiadis S., Morgunov I.G. Gluconic acid production // *Recent Patents on Biotechnology*. 2007. Vol. 1. P. 167-180.
41. Ramachandran S. Spores of *Aspergillus niger* as reservoir of glucose oxidase synthesized during solid-state fermentation and their use as catalyst in gluconic acid production // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007. Vol. 44. P. 155-160.
42. Pezzotti F., Therisod M. Enzymatic synthesis of aldonic acids // *Carbohydr. Res.* 2006. Vol. 341. P. 2290-2292
43. Taketoshi A. Synergetic combination of an enzyme and gold catalysts for glucose oxidation in neutral aqueous solution // *Applied Catalysis A: General*. 2013. Vol. 468 P. 453-458
44. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. М.: Медпресс-информ, 2007. 384с.
45. Семашко Т.В., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г. Сравнительный анализ глюкоксидаз мутантных штаммов *penicillium funiculosum* // *Микробиология*. 2004. Т. 73. №3. С. 343-349.
46. Гулый М.Ф., Билай В.И. Фермент глюкозооксидаза и его применение. Киев: Наукова думка. 1964. 145 с.
47. Семашко Т.В., Михайлова Р.В. Некоторые аспекты применения глюкоксидаз *Penicillium adametzii* и *Penicillium funiculosum* // Перспективные

- ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. 2016. с 110-121.
48. MacAodha D. Comparison of Glucose Oxidation by Crosslinked Redox Polymer Enzyme Electrodes Containing Carbon Nanotubes and a Range of Glucose Oxidising Enzymes//Electroanalysis. 2013. Vol. 25. №1. P.94-100
49. Jagdish S., Neelam V. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: Production, characterization and immobilization for glucose oxidation //Advances in Applied Science Research. 2013 Vol. 4(3). P.250-257
50. Давыдова М. Е., Курова В. С., Сухачева М. В. Стабильность и каталитические свойства глюкозооксидазы из *penicillium funiculosum* G-15//Вестник Московского университета серия 2. Химия. 2002. Т. 43. № 6 с. 366-370
51. Cicolatti E.P., Silva M.J.A., Klein M. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization// Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic. 2014. Vol.99. P.56–67
52. Гульй, М.Ф. Фермент глюкозооксидаза и его применение. М.: Биохимия. 1964. 146 с.
53. Via L. D., Recchi C., Davies T.E., Greeves N., Lopez-Sanchez J.A. Visible-Light-Controlled Oxidation of Glucose using Titania-Supported Silver Photocatalysts// ChemCatChem. 2016. Vol. 8 (22). P. 3475-3483.
54. Derakshan F. K., Darvishi F., Dezfulian M., Madzak C. Expression and Characterization of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* in *Yarrowia lipolytica*// Molecular Biotechnology. 2017. Vol.59(8). P.307-314.
55. Wong C.M., Wong K. H., Chen X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications // Applied Microbiology and Biotechnology. 2008 Vol. 78(6). P.927-938.
56. Singh A., Negi M. S., Dubey A., Kumar V., Verma A. K. Methods of Enzyme Immobilization and Its Applications in Food Industry// Enzymes in Food Technology. 2018. P.103-124.

57. Ahmad R., Sardar M. Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix// *Biochem Anal Biochem*. 2015. Vol.4(2) P.1–8.
58. Es I., Vieira J. D. G., Amara A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application// *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol.99. P.2065-2088.
59. Homaei A. A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R. Enzyme immobilization: an update// *Journal of Chemical Biology*. 2013. Vol.6(4) P.185-205.
60. Chung Y., Christwardana M., Tannia D.C., Kim K.J., Kwon Y. Biocatalyst including porous enzyme cluster composite immobilized by two-step crosslinking and its utilization as enzymatic biofuel cell// *Journal of Power Sources*. 2017. Vol. 360. P. 172-179.
61. MacAodha D. Comparison of Glucose Oxidation by Crosslinked Redox Polymer Enzyme Electrodes Containing Carbon Nanotubes and a Range of Glucose Oxidising Enzymes// *Electroanalysis*. 2013. Vol. 25. № 1. P.94-100.
62. Kumar R. Coupling of Amine-Containing Osmium Complexes and Glucose Oxidase with Carboxylic Acid Polymer and Carbon Nanotube Matrix to Provide Enzyme Electrodes for Glucose Oxidation// *Journal of The Electrochemical Society*. 2014. Vol. 161 (13). P.3005-3010.
63. Maria G. Temperature decrease (30–25 °C) influence on bi-enzymatic kinetics of d-glucose oxidation// *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012 Vol.81. P.19-24.
64. Михайлова П.В. Получение и характеристика глюкозооксидазного наноконъюгата – компонента биорецепторного элемента глюкозного биосенсора// *Инновационные технологии в медицине*. 2014. № 2(3). С.44-53
65. Кашин В.В. Молекулярный нанобиосенсор на основе фермента глюкозооксидазы// *Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии*. 2013. Т.5, № 2. С.58-61.
66. Крякунова Е. В., Канарский А. В. Иммунизация микроорганизмов и ферментов// *Вестник Казанского технологического университета*. 2012. Т.15. № 17. 193с.

67. Dwevedi A. Basics of Enzyme Immobilization// Enzyme Immobilization 2016. P. 21-44.
68. Taketoshi A., Takenouchi S., Takei T., Haruta M. // Applied Catalysis A: General. 2014. Vol. 474. P. 257-262.
69. Liu B., Liu J. Surface modification of nanozymes// Nano Research. Vol.10 (4). P.1125-1148.
70. Megnas-Sayago C., Ivanova S., Lypez-Cartes C., Centeno M.A., Odriozola J.A. // Catalysis Today. 2016. Vol. 279 Pp. 148-154.
71. Каманин С.С., Скворцова Л.С., Арляпов В.А. Печатные электроды, модифицированные глюкозооксидазой и  $\gamma$ -амилазой для определения глюкозы и крахмала в бродильных средах // Известия Тульского государственного университета Естественные науки. 2013. Вып. 3. С. 265-275
72. Christwardana M., Kim D.H., Chunga Y., Kwon Y. A hybrid biocatalyst consisting of silver nanoparticle and naphthalenethiol self-assembled monolayer prepared for anchoring glucose oxidase and its use for an enzymatic biofuel cell. //Applied Surface Science. 2018. Vol. 492. P.180-186.
73. Kausaite-Minkstimiene A., Mazeiko V., Ramanaviciene A., Ramanavicius A.// Biosensors and Bioelectronics. 2012. Vol. 26. P.790-797.
74. Tischer W., Wedekind F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications// Biocatalysis - From Discovery to Application. 1999. P.95-126.
75. Фомкина М.Г. Кинетические свойства и термостабильность глюкозооксидазы при комплексообразовании с полиэлектролитными микрокапсулами//Биофизика. 2011. том 12. С. 690-700
76. Garcia J., Zhang Y., Taylor H., Cespedes O., Michael E.// Nanoscale. 2011. Vol. 3 P. 3721- 3730.
77. Yang M., Guan Y., Yang Y., Xia T.//Materials Letters. 2014. Vol. 137 P. 113-116.
78. Podolean I., Kuncser V. //Green Chem. 2013 Vol. 15 P. 3077–3082.

79. Behrens S. Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions // *Nanoscale*. 2011. Vol. 3. P. 877- 892.
80. Polshettiwar V., Luque R., Fihri A., Zhu H., Bouhrara M., Basset J.-M., // *Chem. Rev.* 2011. Vol. 111. P. 3036-3075
81. Егунова О.Р., Константинова Т.А., Штыкова С.Н. Магнитные наночастицы магнетита в разделении и концентрировании // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*. 2014. Т. 14. вып. 4 С. 27-35.
82. Туранская С.П., Туров В.В., Горбик П.П. Магнитные наночастицы и нанокompозиты в диагностике и лечении заболеваний // *Химия, физика и технология поверхности*. 2007. Вып 13. С. 273-293.
83. Yang C., Wu J., Hou Y. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanostructures: synthesis, growth mechanism, properties and applications. // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. P. 5130-5141.
84. Kaur R., Hasan A., Iqbal N., Alam S., Saini M.K., Raza S.K. Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: A review. // *J. Sep. Sci.* 2014. V. 37. P. 1805-1825.
85. Liu J., Qiao S.Z, Hu Q.H., Lu G.Q. Magnetic nanocomposites with mesoporous structures: synthesis and applications. // *Small*. 2011. V. 7. P. 425-443.
86. Reddy L.H., Arias J.L., Nicolas J., Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. // *Chem. Rev.* 2012. V. 112. P. 5818-5878.
87. Stanicki D., Elst L.V., Muller R.N., Laurent S. Synthesis and processing of magnetic nanoparticles. // *Curr. Opin. Chem. Eng.* 2015. V. 8. P. 7-14.
88. Susheel K., Sarita K., Amit K., Yuvaraj H., Bandna K., Rajesh K. Magnetic polymer nanocomposites for environmental and biomedical applications // *Colloid and Polymer Science*. 2014. V. 292. P. 2025-2052.

89. Laurent S., Forge D., Port M. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications // *Chem. Rev.* 2008. № 108. P. 2064-2110.
90. Cheng C., Xu F., Gu H. Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes // *NewJ. Chem.* 2011. № 35. P. 1072-1079.
91. Комлев А.А., Семенова А.С. Магнитные характеристики  $M\text{GFe}_2\text{O}_4$ -содержащих нанопорошков, полученных гидротермальным методом // *Наносистемы: физика, химия, математика.* 2012. Т.3 (6). С. 105-111.
92. Smolkova I.S., Kazantseva N.E., Parmar H. Correlation between coprecipitation reaction course and magneto-structural properties of iron oxide nanoparticles // *Mat. Chem. Phys.* 2015. V. 155. P. 178-190.
93. Samoilova N, Tikhonov V, Krayukhina M, Yamskov I. Interpolyelectrolyte Complexes of Maleic Acid Copolymers and Chitosan for Stabilization and Functionalization of Magnetite Nano- and Microparticles // *J. APPL. POLYM. SCI.* 2014. Vol. 39663. P. 3-4.
94. Cheng C., Xu F., Gu H. Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes // *NewJ. Chem.* 2011. № 35. P. 1072-1079.
95. Hachani R., Lowdell M., Birchall M., Hervault A., Mertz D., Begin-Colin S., Thanh N-T-K. Polyol synthesis, functionalisation, and biocompatibility studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agents. *Nanoscale*, 2016, 8, 3278–3287.
96. Men H-F., Liu H-Q., Zhang Z-L., Zhang J.H., Zhai Y-Y., Li L. Synthesis, properties and application research of atrazine  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  magnetic molecularly imprinted polymer // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2012. Vol. 19. No. 6. P. 2271-2280.
97. Jin G., Li W., Yu S., Peng Y., Kong J. Novel superparamagnetic core-shell molecular imprinting microspheres towards high selective sensing. // *Analyst.* 2008. Vol. 133. P. 1367-1372.

98. Lu A.-H., Salabas E.L., Schüth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. Vol. 46(8). P. 1222-1244.
99. Ma M., Zhang Y., Yu W. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2003. Vol. 212. P. 219-226.
100. Кретович В. Л. Биохимия растений: Учебник для биол. факультетов ун-тов. М.: Высш. школа, 1980. 503с.
101. Тарасевич Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений: Справочные материалы. М.: МГУ им. Ломоносова, 2012. 55 с.
102. Абуткина Е. Сорбционное оборудование Quantachrome для анализа удельной поверхности и распределения нанопор по размерам// *Наноиндустрия.* 2009. №4. С.54-59.
103. Sorensen C.M. Magnetism // *Nanoscale Mater. Chem.* 2002. P. 169–221.
104. Hecht H.J., Kalisz H.M., Hendle J., Schmid R.D., Schomburg D. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 229 (1). P. 153-172.
105. Mangala D. S., Nivetha A., Prabha I. Superparamagnetic Properties and Significant Applications of Iron Oxide Nanoparticles for Astonishing Efficacy a Review// *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* 2018. P.1-18.
106. Wu W., He Q.G., Jiang C.Z. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies// *Nanoscale Res. Lett.* 2008 Vol.3. P.397–415.
107. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. Glucose oxidase - an overview// *Biotechnol. Adv.* 2009. Vol. 27 P.489-501.
108. Wang F., Ma Y., Liu Y.-H., Zhang X., Zhang F., Linhardt R. J. Improved Octyl Glucoside Synthesis Using Immobilized BGlucosidase on Pa-M with Reduced Glucose Surplus Inhibition // *Biocatal. Biotransform.* 2017. Vol. 35 (5) P.349-362.
109. Tschentscher R., Nihuis T. A., // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2012. Vol. 51. P.1620.

110. Chen S., Wen L., Svec F., Tan T., Lv Y. Magnetic Metal-Organic Frameworks as Scaffolds for Spatial Co-Location and Positional Assembly of Multi-Enzyme Systems Enabling Enhanced Cascade Biocatalysis// RSC Adv. 2017. Vol. 7 (34) P. 21205–21213.
111. Zhao B., Zhou L., Ma L., He Y., Gao J., Li D., Jiang Y. Co-immobilization of glucose oxidase and catalase in silica inverseopals for glucose removal from commercial isomaltooligosaccharide// Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol.107. P. 2034-2043.
112. Tavares T.S., Torres J.A., Silva M.C., Nogueira F.G.E., Silva A.C.D., Ramalho T.C. Soybean peroxidase immobilized on  $\delta$ -FeOOH as new magnetically recyclable biocatalyst for removal of ferulic acid// Bioprocess Biosyst. Eng. 2018. Vol.41. P. 97–106.
113. Bautista F.M., Campelo J.M., García A., Jurado A., Luna D., Marinas J.M., Romero A.A. Properties of a glucose oxidase covalently immobilized on amorphous AlPO support// J. Mol. Catal. B. 2001.Vol.11. P.567-577.