ТВЕРСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

## Сульман Александрина Михайловна

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

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 – 2020

### УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

- ГЛ D-глюкоза
- ГК D-глюконовая кислота
- GOx глюкозооксидаза
- APTES 3-аминопропилтритоксисилан
- GA глутаровый альдегид
- МНЧ магнитные наночастицы
- IC коэффициент иммобилизации
- А активность биокатализатора
- R относительная активность биокатализатора
- Vmax максимальная скорость
- Кт константа Михаэлиса
- ВЭЖХ высокоэффективная жидкостная хроматография
- РФЭС рентгенофотоэлектронная спектроскопия
- DRIFTS инфракрасные спектры Фурье-преобразования с диффузным отражением
- ПЭМ просвечивающая электронная микроскопия
- СПЭМ ЭДС сканирующая ПЭМ энергодисперсионная спектроскопия
- IО Оксид железа (II, III) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

### ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА ПЕРВАЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Ферменты – высокоэффективные катализаторы	12
1.2 Иммобилизация ферментов методом многоточечного ковалентного	
связывания	18
1.3 Классические носители для иммобилизации ферментов	23
1.3.1. Неорганические материалы	24
1.3.1.1 Оксид кремния и неорганические оксиды	24
1.3.1.2 Керамические материалы	25
1.4 Новые вспомогательные материалы для иммобилизации ферментов	26
1.4.1 Неорганические материалы	27
1.4.1.1 Наночастицы	27
1.4.1.2 Немагнитные наночастицы как носители для иммобилизации ферментов	28
1.4.1.3 Магнитные частицы	30
1.4.1.4. Мезопористые материалы	31
1.4.1.5 Иммобилизация ферментов на пористых носителях	32
1.5 Магнитоотделяемые биокатализаторы	35
1.6 Существующие подходы к синтезу магнитоотделяемых оксидов кремния и циркония	36
1.7 Глюкозооксидаза : строение, механизм действия и применение	38
1.8 Окисление глюкозы	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ	44
ГЛАВА ВТОРАЯ. МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ	45
2.1. Реактивы	45
2.2 Синтез биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов	
кремния и алюминия	46
2.2.1 Синтез магнитоотделяемого оксида кремния	46
2.2.2 Синтез магнитоотделяемого оксида алюминия	47

2.2.3 Синтез магнитоотделяемого оксида циркония	49
2.2.3.1 Синтез мезопористого оксида циркония	49
2.2.3.2 Синтез наночастиц Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> в мезопорах оксида циркония	50
2.2.4 Функционализация поверхности магнитоотделяемых оксидов	
кремния, алюминия и циркония 3-аминопропилтритоксисиланом	51
2.2.5 Иммобилизация глюкозооксидазы на магнитоотделяемые носители	52
2.3. Методика окисления D-глюкозы в присутствии магнитоотделяемых	
биокатализаторов	54
2.4. Методика анализа реакционной смеси методом высокоэффективной	
жидкостной хроматографии	56
2.5. Физико-химические методы исследования магнитоотделяемых	
оксидных носителей и биокатализаторов на их основе	57
2.5.1. Метод вибрационного магнитометра	57
2.5.2 Метод низкотемпературной адсорбции азота	59
2.5.3 Рентгенофотоэлектронная спектроскопия	61
2.5.4 ИК-Фурье спектроскопия	63
2.5.5 Рентгеновская дифракция	63
2.5.6. Просвечивающая электронная микроскопия	63
2.5.7. Сканирующая энергодисперсионная спектроскопия	64
ГЛАВА ТРЕТЬЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	65
3.1 Результаты физико-химического исследования магнитоотделяемых	
мезопористых оксидов кремния и алюминия и биокатализаторов на их	
основе	65
3.1.1 Результаты исследования методом низкотемпературной адсорбции	
азота	65
3.1.2 Результаты исследования методами просвечивающей электронной	
микроскопии и рентгеновской дифракции	68
3.1.3 Результаты рентгенофотоэлектронной спектроскопии	70
3.1.4 Физико-химическое исследование биокатализаторов на основе	72

магнитоотделяемых мезопористых оксидов кремния и алюминия

3.1.5 Исследование каталитических свойств магнитоотделяемых	٢
биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на оксидах кремния	Ŧ
и алюминия, в окислении D-глюкозы	75
3.1.5.1 Изучение влияние рН на активность биокатализаторов на осново	e
оксидов кремния и алюминия	75
3.1.5.2 Изучение влияние температуры на активность биокатализаторов_на	ì
основе оксидов кремния и алюминия	77
3.1.5.3 Определение кинетических параметров глюкозооксидазы	,
иммобилизованной на магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия	78
3.1.5.4 Влияние пористости и кислотности магнитоотделяемых оксидов	В
кремния и алюминия на активность иммобилизованного фермента	80
3.1.5.5 Исследование стабильности биокатализаторов на основе оксидов	3
кремния и алюминия	84
3.2 Результаты физико-химического исследования магнитоотделяемых	٢
мезопористых оксидов циркония и биокатализаторов на их основе	86
3.2.1 Данные низкотемпературной адсорбции азота	86
3.2.2 Данные просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской	í
дифракции	88
3.2.3 Исследование магнитных свойств мезопористых носителей	91
3.2.4 Результаты рентгенофотоэлектронной спектроскопии	92
3.2.5 Исследование каталитических свойств магнитоотделяемых	K
биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на оксидах	٢
циркония, в окислении D-глюкозы	95
3.2.5.1 Изучение влияние рН на активность биокатализаторов на осново	e
оксида циркония	96
3.2.5.2 Изучение влияние температуры на активность биокатализаторов на	ì
основе оксида циркония	98
3.2.5.3 Определение кинетических параметров глюкозооксидазы	,
иммобилизованной на магнитоотделяемый оксид циркония	99

3.2.5.4 Влияние пористости и кислотности магнитоотделяемых оксидов	
циркония на активность иммобилизованного фермента	101
3.2.5.5 Исследование стабильности биокатализаторов на основе оксидов	
циркония	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

#### ВВЕДЕНИЕ

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

фермента и последующего доступа к нему субстрата. Большое значение для иммобилизации ферментов имеет синтез магнитноотделяемых носителей, которые обеспечивают легкую магнитную сепарацию биокатализатора от реакционного раствора, экономию энергии, а также получение более дешевых и чистых целевых продуктов.

#### Цель и задачи работы.

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

Для достижения данной цели были решены следующие задачи:

- теоретическое обоснование методов иммобилизации глюкозооксидазы на неорганические носители;
- подбор условий синтеза мезопористого оксида циркония;
- подбор условий *in-situ* кристаллизации наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония
- выбор оптимальных условий введения модифицирующих и сшивающих агентов для иммобилизации глюкозооксидазы;
- синтез биокатализаторов путем иммобилизации глюкозооксидазы на исходные и магнитоотделяемые оксиды;
- определение структурных, поверхностных, магнитных и других физикохимических характеристик синтезированных носителей и биокатализаторов на их основе;
- изучение зависимости активности синтезированных биокатализаторов от температуры, pH и количества субстрата;
- проведение экспериментального скрининга активности и стабильности синтезированных биокатализаторов в окислении D-глюкозы до Dглюконовой кислоты;
- расчет кинетических параметров процесса ферментативного окисления D-глюкозы;

 выявление корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их активности в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

Научная новизна работы. Синтезирован мезопористый оксид циркония методом реплики, и впервые в качестве жесткого шаблона использовался мезопористый оксид кремния с размером пор ~6 нм. Подобраны оптимальные условия *in-situ* кристаллизации наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония и синтезированы магнитоотделяемые носители. Впервые осуществлена иммобилизация глюкозооксидазы на синтезированные магнитоотделяемые мезопористые оксиды. Впервые проведено детальное изучение структуры исходных и магнитоотделяемых мезопористых оксидов кремния, алюминия, циркония и биокатализаторов на их основе с использованием физико-химических Проведено современных методов. тестирование синтезированных биокатализаторов в процессе окисления D-глюкозы и показана их высокая активность в широком (для ферментов) диапазоне pH и температуры. Для магнитоотделяемых оксидов кремния, алюминия, циркония, впервые изучено влияние кислотных центров Льюиса и Бренстеда на активность фермента. Выявлены корреляции структуры синтезированных биокатализаторов и их активности в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

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

магнитоотделяемых мезопористых оксидов и их детальное изучение могут быть использованы при создании других промышленно значимых биокатализаторов.

Апробация работы. 8-ая Международная научно-практическая конференция Биотехнология : наука и практика (2020), Саморазвивающаяся среда технического вуза: научные исследования и экспериментальные разработки IV Всероссийской научно-практической конференции Саморазвивающаяся среда технического вуза: научные экспериментальные разработки (2019),5-й исследования И Международный конгресс по катализу для биоперерабатывающих заводов (2019), Основные положения и результаты работы представлены на конференциях:19-ая Международная научная геоконференция (2019), IX Международная конференция Российского химического общества имени Д. И. Менделеева, посвященная 150летию Российского химического общества имени Д. И. Менделеева(2019), 23-яя Международный конгресс химиков и технологов (CHISA 2018), 21-ая Конференция по интеграции процессов, моделированию и оптимизации для энергосбережения и сокращения загрязнения (PRES 2018), 18-ая Международная научная геоконференция (2018),VIII Международная конференция Российского химического общества имени Д. И. Менделеева (2017).

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

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

#### ГЛАВА ПЕРВАЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1 Ферменты – высокоэффективные катализаторы

Ферменты хорошо высокоэффективные катализаторы известны как широкого спектра процессов, характеризующиеся высокой селективностью и активностью. Кроме того, ферменты могут уменьшить количество стадий реакции и количество необходимых опасных растворителей и, таким образом, делать процесс более дешевым и экологически чистым [1, 2]. По этим причинам ферменты стали перспективными катализаторами, которые демонстрируют большой потенциал для многих промышленных процессов, начиная от производства пищевых продуктов и заканчивая синтезом фармацевтических препаратов [3]. Востребованность ферментов в многочисленных каталитических процессах, привела к увеличению числа исследований, ведущих к значительному улучшению свойств ферментов. Одним из широко используемых методов является иммобилизация ферментов, при которой они прикрепляются к твердому носителю, нерастворимому В реакционной смеси [4]. Главным преимуществом иммобилизации является то, что она значительно улучшает стабильность биомолекул в различных условиях реакции и повышает возможность повторного их использования в течение последовательных каталитических циклов [5]. Более того, после связывания молекул фермента катализаторы переходят из гомогенной в гетерогенную форму, что облегчает простое отделение биокаталитической системы от реакционной смеси и приводит к получению продуктов более высокой чистоты [6, 7]. Существуют различные методы иммобилизации, включая адсорбцию, ковалентное связывание, включение в гель, инкапсуляцию и поперечную сшивку [8]. Они отличаются по типу и характеру сформированных взаимодействий, а также по форме и типу используемых материалов подложки. Выбор наиболее подходящего метода иммобилизации и материала носителя сильно зависит от типа и условий каталитического процесса, а также от типа фермента [9]. Тем не менее, следует подчеркнуть, что выбор материалов носителя является наиболее важной залачей серьезного влияния материала носителя на свойства из-за биокаталитической системы.

В качестве носителя для иммобилизации ферментов можно использовать самые разнообразные материалы различного происхождения. Эти материалы, как правило, можно разделить на органические, неорганические и гибридные или композитные. Носитель должен защищать структуру фермента от суровых условий реакции и, таким образом, помогать иммобилизованному ферменту сохранять высокую каталитическую активность [10]. Кроме того, использование подходящего материала, например, гидрофобных носителей при иммобилизации липазы, может дополнительно повысить активность биокатализатора [11,12]. Однако существуют некоторые ограничения, матрица не должна оказывать отрицательного влияния на структуру фермента и не должна влиять на нее больше, чем требуется для создания стабильных ферментативных взаимодействий с носителем. Кроме того, должно быть сродство между функциональными группами двух материалов, чтобы обеспечить образование этих фермент-матричных взаимодействий и эффективное связывание фермента с подложкой. Это особенно важно в случае ковалентной иммобилизации [13]. Носитель должен открывать активные участки катализатора для легкого прикрепления молекул субстрата и уменьшения диффузионных ограничений для субстратов и продуктов [14]. Основные требуемые свойства вспомогательных материалов для эффективной иммобилизации ферментов приведены на рисунке 1.1. Тем не менее, следует помнить, что соответствующий выбор носителя напрямую связан с типом фермента и процессом, в котором будет использоваться биокаталитическая система.



Рисунок 1.1 – Основные требуемые свойства вспомогательных материалов для эффективной иммобилизации ферментов

Использование ферментов в нативной форме часто затруднено рядом ограничений, таких как высокая стоимость, низкая функциональная стабильность и отсутствие возможности восстановления или повторного использования [15-22]. Благодаря достижениям в области генетической модификации и адаптации методов и инструментов для улучшения работы ферментов, биокатализ переживает течение последних ускоренное развитие В нескольких лет. Например, универсальность ферментов и каталитические свойства были улучшены с помощью сайт-направленного мутагенеза [23]. Точно так же методы направленной эволюции позволили имитировать естественную эволюцию, которая нацелена на фермента [24]. Метагеномные инструменты позволяют желаемое свойство получить доступ к новым биокатализаторам из организмов, которые не поддаются культивированию; например, экстремофилы в настоящее время являются новым источником промышленно значимых ферментов, которые функционируют в экстремальных условиях [25]. Тем не менее, усовершенствования с помощью упомянутых выше инструментов не повлияли на то, что биокатализаторы все еще нуждаются в очистке, и их повторное использование может быть затруднено. Иммобилизация ферментов на различных типах носителей обеспечивает одну из

наиболее привлекательных концепций для преодоления этих недостатков [26-28]. В последние годы многие исследователи рассматривают иммобилизацию как заслуживающий внимания инженерный инструмент для адаптации и улучшения множества каталитических свойств ферментов, таких как активность, селективность, специфичность, устойчивость к ингибиторам. Физико-химические методы иммобилизации ферментов наряду со значительными ограничениями и возможностями показаны на рисунке 1.2.



Рисунок 1.2 - Физико-химические методы иммобилизации ферментов: возможности и ограничения

Выбор правильного метода иммобилизации может привести к улучшению стабильности фермента в жестких условиях реакции, таких как экстремальный pH, высокая температура или присутствие органических растворителей, что облегчает, в том числе, отделение фермента от реакционной среды [29-31]. Загрязнение продукта ферментами может быть, таким образом, уменьшено или полностью устранено, что особенно важно для применения в фармацевтической и пищевой промышленности [32]. При тщательном контроле иммобилизационной матрицы или условий эксплуатации некоторые процедуры иммобилизации в определенных случаях позволяют одновременно очищать и иммобилизировать ферменты из сырого экстракта [33]. Иммобилизация считается перспективной для применения в промышленных масштабах, поскольку она позволяет осуществлять непрерывные процессы, например, в биореакторах с неподвижным слоем. На рисунке 1.3 показан схематичный путь скрининга ферментов к иммобилизации с новыми характеристиками для масштабирования до промышленного уровня [22]. Несмотря на различие в методах иммобилизации, выбор подходящего носителя является наиболее важной задачей из-за его значительного влияния на свойства биомолекул и каталитической системы [34,35,36].



Рисунок 1.3 - Схематический путь скрининга ферментов к иммобилизации с новыми функциями для масштабирования до промышленного уровня

Важные параметры, определяющие подходящий носитель, включают внутреннюю геометрию (например, гладкие поверхности или тонкие волокна), механическое сопротивление, диаметр пор, удельную площадь поверхности и степень активации [35]. Взаимодействие одной функциональной группы носителя с ферментом в некоторых случаях достаточно для его фиксации, тогда как во многих других случаях необходимо создать взаимодействие нескольких функциональных групп носителя с несколькими группами фермента [37]. Кроме того, исследователи должны также иметь или создать инструменты для обнаружения явлений (желательных или нежелательных), произошедших после иммобилизации. Первоначально иммобилизация может происходить в результате одноточечного или многоточечного взаимодействия. Однако количество взаимодействий с носителем постоянно увеличивается после иммобилизации, вовлекая новые группы, как это имеет место для гетерофункциональных носителей [38]. Реакционная способность носителей на основе эпоксидных смол не очень высока, и они реагируют слишком медленно, чтобы обеспечить поэтому полную иммобилизацию в разумный период времени даже при рН 10 [33]. Кроме того, стабилизация ферментов с использованием эпоксидно-активированных подложек ниже, чем при использовании глиоксильных подложек, при сопоставимых условиях, таких как степень активации подложки, природа и ориентация фермента [33,39]. С точки зрения ориентации, основная проблема заключается в том, что молекулы хаотично ориентированы на поверхности [40]. Как следствие, для этой случайной ориентации активные центры иммобилизованных молекул фермента недоступны для того, чтобы нацеливаться в фазе раствора. Эта ориентация фермента критична даже, если активный участок должен иметь правильное соединение с поверхностью носителя. Например, существует потребность в окислительно-восстановительных ферментах, обеспечить передачу или получение электронов к или от носителя [37]. Кроме того, возможность денатурации ферментов также выше, если существует сильное взаимодействие между случайно иммобилизованными ферментами и поверхностью. Генерация стерической помехи носителем из-за очень больших молекул субстрата также является важным фактором, который делает ориентацию белка критической. Поэтому во многих более ранних исследованиях была признана важность селективной иммобилизации фермента наряду с сопряженным использованием мутагенеза с молекул надлежащим ориентационным контролем на поверхности носителя [37,41,42]. Было показано, что контролируемая ориентация обладает более высокой активностью и стабильностью, чем случайная ориентация [43,44]. В обзорах Батерфилда [45], Эрнандеса и Фернандес-Лафуэнте [37] всесторонне рассмотрено то, как различные методы иммобилизации могут давать по-разному ориентированные молекулы фермента.

Ранее Барбоза и др. [38] рассмотрели и представили разработку индивидуальных гетерофункциональных опор для получения специфической иммобилизации целевых белков. Недавно Сантос и др. [39] разработали новый

носитель на основе агарозы, активированный дивинилсульфоном, в качестве иммобилизации и стабилизации ферментов с помощью инструмента для многоточечного присоединения. Такие ковалентного активированные носители представляются перспективными и довольно дивинилсульфоном стабильными в более широком диапазоне pH 5-10 при 25 ° С во влажных условиях. По данным Сантоса и соавторов [39], активированный дивинилсульфоном новый носитель на основе агарозы может быстро реагировать с α-амидами Cys и His при pH 5-10, с Lys главным образом при pH 10 и гораздо медленнее с Tyr. Вслед за этим разработала та же группа также активированный дивинилсульфоном гетерофункциональный носитель на основе шариков октилагарозы путем введения винилсульфоновых групп на поверхность носителя [46]. Функциональные группы дивинилсульфона очень стабильны и обладают способностью вступать в реакцию с другими доступными группами, включая первичные и вторичные аминогруппы наряду с гидроксильными, имидазольными или тиольными группами [29]. Этот высокий потенциал реактивности, позволяет осуществлять длительную иммобилизацию и делает носители, активированные дивинилсульфоном, новыми кандидатами получения быстрого И интенсивного многоточечного ДЛЯ ковалентного присоединения фермента [39,46].

# 1.2 Иммобилизация ферментов методом многоточечного ковалентного связывания

Ковалентное связывание является одним из наиболее распространенных и интересных методов иммобилизации ферментов для промышленного применения [47]. Оно включает в себя химическую реакцию, посредством которой ферменты либо ковалентно связываются с наноматрицей, либо, используя бифункциональные реагенты, присоединяют фермент с одной стороны и иммобилизационную подложку с другой. Рисунок 1.4 иллюстрирует схематическое представление иммобилизации ферментов за счет многоточечного ковалентного связывания.

Поскольку химическая реакция часто подтверждает, что ковалентное связывание не маскирует каталитический центр фермента, активность фермента такого типа иммобилизации остается неизменной. Активность ковалентно

присоединенного фермента зависит от размера материала носителя, его формы и состава, а также от природы и конкретных условий реакции сочетания. В этом методе фермент может быть иммобилизован с помощью многоточечных ковалентных связей с носителем для повышения характеристик активности, стабильности и возможности повторного использования [48]. Ковалентная связь обычно происходит между химически активными группами на поверхности носителя и нуклеофильными группами на ферментах.



Рисунок 1.4 - Схематическое изображение иммобилизации фермента за счет многоточечного связывания: А) носитель с функциональными группами, В) фермент с функциональными группами и С) многоточечная иммобилизация фермента

Реакционноспособные функциональные группы могут быть добавлены в матрицу носителя без модификации, или матрица носителя функционализируется для создания активированных групп. Различные функциональные группы, с точки зрения химии поверхности, показаны на рисунке 1.5. Большинство ферментов ковалентно присоединяются с использованием аминогрупп лизина, которые присутствуют на поверхности белка в большом количестве и обладают высокой реакционной способностью [47]. С химической точки зрения ковалентное связывание обеспечивает прочное соединение между матрицей-носителем и ферментом, предотвращает его вымывание в реакционную среду и обеспечивает повторное использование [49].



Рисунок 1.5 - Различные функциональные группы, с точки зрения химии поверхности носителя для иммобилизации фермента

Для эффективного многоточечного ковалентного связывания относительные расстояния (расстояния между всеми функциональными группами, участвующими в присоединении), должны оставаться неизменными во время конформационных модификаций, вызванных влияющим фактором, таким как более высокий pH, нагрев или органические растворители. Таким образом, конформационные изменения, вызывающие денатурацию фермента, уменьшаются, и получающийся в результате ковалентно связанный биокатализатор может демонстрировать высокую стабильность. В более ранних работах массив ферментов разных групп был эффективно стабилизирован с помощью метода многоточечного ковалентного присоединения [50]. Матео и соавторы [29] показали, что ковалентная иммобилизация может быть идеальным выбором, если достигается многоточечное соединение фермента с поверхностью подложки. Хорошая геометрическая конгруэнтность подложки с ферментом необходима для установления сильной многоточечной ковалентной иммобилизации фермента. Реакционноспособные группы на носителе должны демонстрировать выраженную стабильность в реакционных средах, минимальные стерические помехи и способность реагировать с ферментными группами, часто присутствующими на поверхности фермента (например, лизином) [51]. После реакции иммобилизации носитель должен быть чтобы предотвратить образование достаточно инертным, нежелательных взаимодействий между материалом носителя и молекулой фермента [29]. Для оптимального многоточечного ковалентного связывания условия иммобилизации должны благоприятствовать реакционной способности комплекса ферментноситель: длительное время реакции, щелочной рН и умеренно высокие температуры [51]. Перспективно прикреплять ферменты к поверхности носителя, имеющей большое количество реакционноспособных групп, что может быть реализовано с помощью использования глиоксильных носителей [29]. Важно отметить, что хорошее взаимодействие между носителем и ферментом не всегда приводит к высокой стабильности фермента. На это влияет структура поверхности фермента, участвующего в процессе иммобилизации [29]. Метод многоточечной иммобилизации также улучшает термическую стабильность и стабильность фермента прикреплении к различным наноструктурам, при таким как мезопористый диоксид кремния, хитозан. Локализация фермента на поверхности носителя дополнительно увеличивает загрузку и прикрепление фермента. Напротив, иммобилизованные ферменты часто дезактивируются из-за конформационного ограничения случайными ковалентными связями. Было разработано множество различных носителей, чтобы служить подходящей подложкой для ковалентной иммобилизации, включая подложки на основе диоксида кремния, такие как наночастицы каолинита или мезопористого диоксида кремния [52]. Глутаральдегид-, глиоксаль- и эпокси-активированные носители считаются лучшими вариантами для достижения этой цели [29, 53]. Методы иммобилизации с использованием глутаральдегида в качестве связывающего агента являются простыми, эффективными и, возможно, наиболее широко применяемыми методами для иммобилизации ферментов [54]. Предполагается, что носители, активированные глутаральдегидом, В основном реагируют с

неионизированными первичными аминогруппами, хотя в конечном итоге они могут взаимодействовать с другими группами, включая имидазолные, фенольные и тиольные [55]. Иммобилизация на носителях, активированных глутаральдегидом, обычно нейтральном pН из-за низкой стабильности проводится при pH. При нейтральном глутаральдегидных групп при щелочном pН высокореактивная аминогруппа в молекуле белка имеет тенденцию быть концевой аминогруппой. Тем не менее, необходимо учитывать, что высокая концентрация других функциональных групп на поверхности фермента может привести к образованию новых ковалентных связей между молекулой фермента и носителем [56]. Следовательно, было бы правильно достичь некоторой многоточечной ковалентной иммобилизации с использованием матриц, функционализированных глутаральдегидом [53]. В настоящее время ситуация с использованием активированных глутаральдегидом носителей намного сложнее из-за ИХ многофункциональности. Эта многофункциональность может быть полезным аспектом в определенных условиях. Быстрый ионный обмен фермента на поверхности носителя предотвращает более длительное пребывание фермента в растворимой форме до его иммобилизации, что приводит к снижению инактивации нативных ферментов путем осаждения или протеолиза [29]. Кроме того, дезактивация фермента искажением также предотвращается, если адсорбция фермента оказывает конструктивное влияние на его стабилизацию. Изменение ориентации фермента на носителе путем варьирования условий иммобилизации является дополнительным преимуществом многофункциональности глутарового альдегида. Существуют различные методы иммобилизации фермента на носителях, активированных глутаровым альдегидом, что приводит к различной ориентации фермента на носителе и, как следствие, к различной стабильности препаратов иммобилизованных ферментов [53]. Примечательно, что ферменты могут быть иммобилизованы с помощью трех различных механизмов в зависимости от условий, используемых в процессе иммобилизации с функционализированными глутаральдегидом носителями. При применении очень высокой ионной силы белок иммобилизован гидрофобной адсорбцией может сначала быть перед установлением ковалентных связей, тогда как в случае низкой ионной силы первичная иммобилизация будет происходить путем анионного. При умеренной

ионной силе присоединение фермента в основном ожидается благодаря установлению ковалентных связей [33]. Лю и соавторы [57] использовали наночастицы диоксида кремния, активированные глутаровым альдегидом, в качестве нового носителя для ковалентного присоединения лакказы. Закрепленный на наночастицах фермент обладал улучшенной термической и эксплуатационной стабильностью, сохраняя 61% остаточной активности при 60 ° С через 4 часа и 55% после многократного использования в течение 10 рабочих циклов. Несколько других типов волокон и полимеров также были использованы для ковалентной иммобилизации. Например, лакказа от Cerrena unicolor была иммобилизована на сополимере бутилакрилата И диметакрилата этиленгликоля, функционализированного глутаральдегидом, дивинилсульфононом И карбодиимидом. Сшитый глутаральдегидом носитель оказался наиболее эффективным средством, обеспечивающим значительное повышение эксплуатационной стабильности при 30 ° С в реакторе с неподвижным слоем биокатализатора [58].

Возможности и перспективы иммобилизованных ферментов для коммерческих целей постоянно растут. Основываясь на этих возможностях, исследователи проявляют большой интерес к синтезу и точному изготовлению уникальных материалов-носителей для иммобилизации биомолекул.

#### 1.3 Классические носители для иммобилизации ферментов

С начала работы по созданию методов иммобилизации возникла необходимость определить группу материалов, К которым могут быть присоединены ферменты. Были найдены материалы, которые обеспечивают высокую стабильность, доступность, относительно низкую цену и высокое сродство связанным ферментам. Широкий спектр материалов к как неорганического, так и органического происхождения был определен в качестве эффективных носителей для биокатализаторов и получил название «классические материалы» (Рисунок 1.6). Хотя в последние годы классические материалы стали применяться реже, они остаются важной группой материалов, используемых для иммобилизации ферментов.



Рисунок 1.6 - Избранные примеры классических неорганических и органических материалов, используемых для иммобилизации ферментов

#### 1.3.1. Неорганические материалы

#### 1.3.1.1 Оксид кремния и неорганические оксиды

Оксид кремния является одним ИЗ наиболее часто используемых неорганических материалов для иммобилизации ферментов. Его высокая термическая и химическая стойкость и хорошие механические свойства делают его подходящим материалом для многих практических применений. Оксид кремния обладает хорошими сорбционными свойствами благодаря высокой площади поверхности и пористой структуре. Эти свойства позволяют эффективно прикреплять фермент и снижают диффузионные ограничения [59,60]. Кроме того, присутствие большого числа гидроксильных групп на поверхности оксида кремния облегчает присоединение фермента и способствует его функционализации с модификаторов поверхности, помощью таких как глутаральдегид И 3аминопропилтриэтоксисилан [61]. Еще одним преимуществом этого материала является то, что он может использоваться во многих различных формах. Так, например, было показано использование оксида кремния и силикагеля в качестве носителей для ферментов, принадлежащих к различны классам (оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы и изомеразы) [62-66]. Полученные биокаталитические демонстрируют сохранение высокой каталитической активности, системы

хорошую термическую и pH-стойкость. Например, липазы, иммобилизованные на матрице из силикагеля и на мезопористом оксиде кремния, сохраняли соответственно 91% и 96% активности свободного фермента [67,68].

В предыдущих исследованиях, среди других неорганических оксидов, оксиды титана, алюминия и циркония также использовались для иммобилизации многих ферментов, например, липазы, цистеина, уреазы и α-амилазы [69–72]. Эти носители известны своей высокой стабильностью, механическим сопротивлением и хорошей сорбционной способностью. Кроме того, эти материалы инертны в различных условиях реакции, что облегчает их применение в качестве носителей для различных классов ферментов. Из-за присутствия многих гидроксильных групп на их поверхности эти материалы очень гидрофильны. Это усиливает иммобилизацию фермента и модификацию поверхности, что способствует формированию стабильных фермент-матричных взаимодействий.

#### 1.3.1.2 Керамические материалы

Керамические материалы известны своей чрезвычайно высокой устойчивостью к температуре, давлению и химическим веществам (органическим растворителям, основаниям, кислотам). Эти особенности делают их очень перспективными материалами для использования в качестве подложек для промышленного применения иммобилизованных ферментов [73]. Керамические носители также обеспечивают хорошую механическую устойчивость. Следовательно, когда ферменты становятся каталитически неактивными, носители можно относительно легко регенерировать и использовать для иммобилизации нового фермента [74]. На поверхности этих материалов в основном присутсвуют гидроксильные группы. Это способствует преимущественно адсорбционной иммобилизации ферментов, основанной на неспецифических взаимодействиях. Для ковалентного прикрепления биомолекул необходима дополнительная модификация поверхности. Керамические материалы, такие как оксид алюминия, диоксид циркония, диоксид титана, диоксид кремния, оксид железа и фосфат кальция, многократно использовались в качестве носителей биомолекул. Следует добавить, что эти материалы также могут быть применены в виде керамической пены или

композитных (TiO<sub>2</sub> / Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) керамических мембран [75,76]. Эбрахими и соавт. физически иммобилизовали β-галактозидазу с использованием керамического материала в виде мембраны в качестве носителя. Система была использована для трансгалактозилирования катализа В реакции лактозы с получением Иммобилизованный фермент галактозилолигосахаридов. использовался ДЛЯ непрерывного производства олигосахаридов, и его эффективность достигала 40% при оптимальных параметрах процесса [77]. Ван и соавт. иммобилизовали пероксидазу хрена на керамическом материале (кордиерите), который был модифицирован N-β-аминоэтил-γ-аминопропил-триметоксисиланом ДЛЯ ковалентного присоединения фермента. Биокаталитическая система удаления нефти ИЗ сточных вод. Самая использовалась для высокая зарегистрированная эффективность удаления была близка к 92%, и система показала возможность повторного использования [78].

#### 1.4 Новые вспомогательные материалы для иммобилизации ферментов

Возможности для практического применения иммобилизованных ферментов продолжают расти. По этой причине открытие и использование новых материалов с желаемыми свойствами, адаптированных к конкретным ферментам, стало чрезвычайно важным. Эти материалы как органического, так и неорганического происхождения характеризуются исключительной термической и химической стабильностью и очень хорошими механическими свойствами. Эти материалы носителя производятся в различных морфологических формах с контролируемыми размерами частиц, обычно в наноразмерном масштабе, что делает их пригодными для использования с ферментами. Кроме того, эти материалы обладают значительными количествами различных функциональных групп, соответствующих химическим группам белков, которые усиливают связывание фермента и модификацию поверхности [79]. В течение последнего десятилетия, внимание ученых было направлено на гибридные и композитные материалы, себе свойства которые сочетают В обоих типов предшественников композиционных материалов и тем самым максимизируют их преимущества [80]. Следовательно, с использованием новых материалов (см. Рисунок 1.7) в качестве

подложки для ферментов, появятся возможности совершенствования технологических процессов. Иммобилизованные ферменты проявляют повышенную каталитическую эффективность, а чистота и качество продуктов реакции повышаются по сравнению с процессами, катализируемыми ферментами, иммобилизованными с использованием классических материалов.



# Рисунок 1.7 – Примеры новых материалов неорганического, органического и гибридного происхождения, применяемых для иммобилизации ферментов

#### 1.4.1 Неорганические материалы

#### 1.4.1.1 Наночастицы

Наноматериалы носителя органического или неорганического происхождения характеризуются химической и термической устойчивостью и желаемыми механическими свойствами. Разработка подложек с различными морфологическими формами и контролируемыми размерами частиц делает их пригодными для иммобилизации различных ферментов. Кроме того, эти материалы имеют значительное количество различных функциональных групп, которые облегчают модификацию поверхности и связывание фермента. Следовательно, биотехнологическим процессом быть контроль над может улучшен С использованием этих новых ферментных носителей, позволяющих получить иммобилизованную биокаталитическую систему с улучшенной каталитической эффективностью, повышенным качеством и чистотой продуктов реакции, по сравнению с обычными материалами носителя (Рисунок 1.8) [20,81].



Рисунок 1.8 - Биокаталитическая оценка и стратегии улучшения

#### 1.4.1.2 Немагнитные наночастицы как носитель для иммобилизации ферментов

В последние годы наночастицы (как неорганического, так и органического происхождения) диаметром до 30 нм использовались в качестве потенциальных материалов для иммобилизации некоторых ферментов. Наночастицы обеспечивают большую удельную площадь поверхности для прикрепления фермента, что приводит к более высокой загрузке фермента на поверхности матрицы и улучшенному выходу иммобилизации наряду с другими преимуществами. Основными преимуществами наночастиц является их способность минимизировать диффузионные ограничения. В частности, известно, что активные центры молекул ферментов, прикрепленные к поверхности непористых частиц, имеют более широкий контакт с реагирующими субстратами. Эта черта указывает на высокую каталитическую активность и функциональность биокаталитических систем на основе наночастиц для различных процессов [82,83]. На рисунке 1.9 представлена сравнительная оценка свободных ферментов и ферментов, иммобилизованных на основе наночастиц.



Рисунок 1.9 - Сравнительная оценка свободных ферментов и ферментов, иммобилизованных на основе наночастиц

Различные неорганические наноматериалы, такие как нанозолото и графен, были использованы в качестве носителей для иммобилизации ферментов [84,85]. Наночастицы неорганических оксидов наиболее часто используются в качестве каталитических носителей. Например, Хоу и соавторы [86] использовали активированные глутаральдегидом наночастицы диоксида титана в качестве матрицы для присоединения карбонатгидразы, а полученную иммобилизованную биокаталитическую систему применяли для биомиметического превращения СО<sub>2</sub>. В другом исследовании наночастицы диоксида кремния, функционализированные октилтриэтоксисиланом глицидоксипропилтриметоксисиланом, И были использованы для ковалентного связывания липазы из Rhizomucor miehei. Было стабильным иммобилизованная липаза является очень показано, что биокатализатором и обеспечивает более 90% сохранения биокаталитической активности [87]. Чен и соавт. иммобилизовали липазу из Pseudomonas cepacia на наночастицах диоксида циркония, функционализированных различными карбоновыми кислотами, (линолевой кислотой, олеиновой кислотой, стеариновой валериановой кислотой И 1,10-декандикарбоновой кислотой, кислотой). Первоначальная каталитическая активность фермента, заключенного в диоксид

циркония, была увеличена в 10,5 и 16,6 раз по сравнению с нативным и неочищенным порошком липазы, соответственно. Липаза *Mucor janaicus*, ковалентно связанная с наночастицами диоксида кремния, активированными этилендиамином, обладает высокой эффективностью загрузки фермента и каталитической активностью. В дополнение к широким диапазонам pH и высокой термостабильности, относительная активность липазы, иммобилизованной на силикагеле, была увеличена до 107% по сравнению со свободным аналогом [88]. Недавно фермент лакказа был эффективно иммобилизован в наночастицах серебра, изготовленных в присутствии полиэтиленгликоля, поливинилового спирта или хитозана в качестве стабилизирующего агента. Хотя активность фермента была снижена, но лакказа, иммобилизованная на наночастицах Ag, модифицированных полимером, демонстрировала значительное повышение стабильности до 13 дней при высокой температуре (50 °C).

#### 1.4.1.3 Магнитные частицы

Отделение биокатализаторов от реакционной смеси после каталитического процесса является одной из важнейших проблем, которые должны быть решены при использовании иммобилизованных ферментов. Одно из возможных решений — это прикрепление молекул фермента к магнитным наночастицам (МНЧ) оксида железа и простое разделение биокаталитической системы с использованием внешнего магнитного поля [89]. МНЧ также известны своей большой площадью поверхности и обилием гидроксильных групп на их поверхности, что обеспечивает их легкую модификацию и сильное (ковалентное) связывание фермента. Это очень важные функции. Кроме того, высокая механическая стабильность и низкая пористость, которые сводят к минимуму стерические помехи, также важны для создания стабильной фермент-матричной биокаталитической системы [90]. Согласно Нетто и соавт., многие ферменты, сгруппированные в классы оксидоредуктазы, гидролазы или трансферазы, могут быть иммобилизованы на поверхности магнитных наночастиц и способны создавать в целом стабильные системы, обеспечивающие хорошую возможность повторного использования и легкое отделение от реакционной смеси [91]. Есть несколько примеров, которые

демонстрируют эти преимущества. Мехрасби и соавт. иммобилизовали липазу на

функционализированных 3магнитных наночастицах, глицидоксипропилтриметоксисиланом. Иммобилизованный фермент использовался для производства биодизеля из отработанного растительного масла, и сохранял 100% своей начальной активности даже после шести циклов реакции [92]. В другом исследовании Аббера и соавторы иммобилизовали глюкозооксидазу путем адсорбции на немодифицированных МНЧ и использовали полученную систему для обесцвечивания. После 15 каталитических циклов иммобилизованная глюкозооксидаза сохранила более 90% своих первоначальных свойств [93]. Аттакан и соавторы использовали магнитные наночастицы, предварительно обработанные галловой кислотой, для ковалентной иммобилизации трипсина. Их результаты показали, что биокатализатор МНЧ-трипсин может разлагать бычий сывороточный альбумин с высокой эффективностью [94].

#### 1.4.1.4. Мезопористые материалы

Особенностью, которая отличает мезопористые подложки от других материалов, используемых для иммобилизации ферментов, является возможность адаптировать свойства подложки к биомолекулам путем корректировки условий синтеза и получение матриц с желаемой структурой пор [95,96]. Эти виды носителей содержат мезопоры с диаметрами обычно от 2 до 50 нм, с узким и регулярным расположением пор, площадь их поверхности составляет до 1500 м<sup>2</sup>/г и объем пор - около 1,5 см<sup>3</sup>/г, что делает их подходящими носителями для иммобилизации различных биомолекул [97]. Ферменты могут быть иммобилизованы на мезопористых материалах путем ковалентного связывания или инкапсуляции. Однако в обоих методах иммобилизации фермент помещается в поры носителя, что означает, что структура белка защищена, и хорошие каталитические свойства обычно сохраняются. Когда фермент находится в порах носителя, диффузионные ограничения также должны быть приняты во внимание, потому что транспорт субстратов и продуктов ограничен [98]. Тем не менее, ввиду термической их водонерастворимости, И химической стабильности, гидрофильности и наличия достаточного количества химических групп для

ферментов, мезопористые материалы отвечают большинству связывания требований для эффективных матриц ферментов [99]. Такие материалы, как цеолиты, углерод и золь-гелевые матрицы, а также осажденные и упорядоченные мезопористые оксиды, входят в мезопористую группу [100–102]. Например, часто используют различные мезопористые кремнеземные материалы. Липазы из Candida antarctica и Candida rugosa были иммобилизованы посредством неспецифических взаимодействий без каких-либо промежуточных агентов на мезопористом диоксиде кремния SBA 15 и МСМ 41 соответственно и использовались в качестве катализаторов в органическом синтезе [103,104]. Было обнаружено, что иммобилизованные ферменты могут быть повторно использованы в течение по меньшей мере пяти реакционных циклов без значительной потери их активности. Диоксиды кремния SBA 15 и МСМ 41 также использовались для адсорбционной иммобилизации щелочной протеазы [105]. Иммобилизованный фермент достиг максимальной загрузки (589,43 мг/г) при использовании диоксида кремния SBA 15, также имел хороший диапазон pH и температурную стабильность. В другом исследовании Мангрукар и соавторы иммобилизовали тирозиназу на мезопористом диоксиде кремния МСМ-41 и использовали полученную биокаталитическую систему для обнаружения фенола. Было показано, самая низкая концентрация фенола, определяемая иммобилизованной что тирозиназой, 1 мг/л [106]. Как упомянуто выше, мезопористые материалы также могут быть использованы для инкапсуляции фермента. Ван и Карузо использовали сферы мезопористого кремнезема для иммобилизации каталазы, протеазы и пероксидазы и показали, что после иммобилизации время жизни всех тестируемых ферментов улучшилось по сравнению с их свободными формами [107].

#### 1.4.1.5 Иммобилизация ферментов на пористых носителях

Пористые носители, включая оксиды и полимеры, используются для иммобилизации ферментов в течение многих лет. В последнее время исследования были сосредоточены на иерархических структурах [108,109], зависимости от размеров пор [110] и использовании магнитных пористых оксидов для магнитного разделения [111]. Наличие пор или полостей, в которых ферменты могли бы располагаться для создания оптимальной степени локализации, достигаемой в клетках, не является обязательным условием, но такая локализация может значительно повысить каталитическую активность биокатализаторов [112].

Боливар и соавт. сообщили о новом подходе, в котором легированные люминофором кислородочувствительные фрагменты в диоксиде кремния были применены создания кислородзависимого биокатализатора [113]. для Положительно заряженный мини-белок (7 кДа), был присоединен к оксидазе Dаминокислоты (79 кДа), после чего полученный химерный белок был связан с определенной Иммобилизация кремнеземом в ориентации. фермента на мезопористом диоксиде кремния, описанная в этой работе, привела к более чем 10кратному увеличению эффективности фермента при высокой загрузке по сравнению с пористым стеклом, и полученная структура была почти такой же эффективной, как и нативный фермент. Это было связано с выбором носителей, которые усиливают массоперенос О2, важность которых была установлена с помошью способности воспринимать кислород изнутри, что позволяет дополнительно оптимизировать биокатализатор. Это исследование инициировало серию последующих работ, в которых сообщалось о моно- и биэнзимах, иммобилизованных на пористых подложках [124,123].

Серьезным достижением в области биокатализаторов на основе пористых носителей является разработка иерархических пористых материалов, таких как металлоорганические каркасы [116], полимеры [117], агарозные гидрогели [118] и неорганические оксиды [108,109], содержащие достаточно большие поры (по крайней мере, ~ 25 нм), которые могут вместить ферменты без ограничений и денатурации. Большая площадь поверхности также полезна для увеличения загрузки фермента при самом низком объеме катализатора. Иерархические материалы, алюмосилоксановые аэрогели c необычными структурными особенностями - были получены в результате имплантации с пыльцевыми зернами гибискуса розового-синусиса [108]. Отличительная форма пыльцы Hibiscus rosasinensis как исходного шаблона (рисунок 1.10) позволяет развивать макро-, и мезомасштабные поры, а также воронкообразные макроканалы в мезопористом каркасе.



Рисунок 1.10 (а – с) - Фотография цветка гибискуса (*Hibiscus rosa-sinensis*) и его пыльцевого зерна (d), оптические и (e) СЭМ-изображения лиофилизированного зерна пыльцы, использованного для эксперимента, полученные после процесса предварительной обработки

Иерархическая структура позволила произвести высокую загрузку стеапсинлипазы и обеспечила отличную иммобилизационную эффективность. Биокатализатор был дополнительно улучшен путем функционализации С метильной И аминопропильной группами И продемонстрировал хорошие каталитические свойства при гидролизе, этерификации и переэтерификации. Интересный подход был использован для модификации биокатализаторов на основе пористых носителей. Такая модификация была осуществлена с помощью обработки полиэтиленгликолем, что значительно повышало стабильность биокатализаторов [119]. Авторы предположили, что полиэтиленгликоль создает вязкую среду вокруг ферментов на поверхности, предотвращая таким образом искажение структуры фермента из-за нагревания или денатурирующих агентов. Был показан альтернативный путь, где пористый оксид кремния функционализировали фенильными группами, то есть он стал более гидрофобным, что привело к оптимальному сочетанию активности, термической стабильности и эффективности иммобилизации *Thermomyces lanuginosuslipase* [120].

#### 1.5 Магнитоотделяемые биокатализаторы

За последние пять лет возрос интерес к магнитоотделяемым катализаторам, включая биокатализаторы. Это можно объяснить легким магнитным отделением таких биокатализаторов для многократного использования, что, в свою очередь, приводит к экономии энергии и удешевлению целевых продуктов. Магнитные свойства достигаются за счет магнитных наночастиц, чаще всего оксида железа или ферритов, встроенных в носитель биокатализатора. Основные конструкции магнитно-извлекаемых биокатализаторов включают функционализированные магнитные наночастицы (НЧ), магнитные НЧ или кластеры НЧ, покрытые полимерами [121,122] и встроенные в поры мезопористых оксидов [123]. Были также описаны магнитные микрореакторы с ферментами, иммобилизованными на магнитные шарики для обработки непрерывного потока на микроуровне. Такие микрореакторы представляют собой многообещающую альтернативу традиционным конструкциям реакторов [124].

Комбинация одностадийной очистки И присоединения внеклеточно экспрессированных ферментов к магнитной подложке была описана несколькими группами [122,125]. Это является важным шагом вперед в разработке нового биокатализатора и делает его менее дорогим и более устойчивым. В качестве примера, внеклеточная His-taged Thermomyces lanuginosus lipase (His-TLL) была иммобилизована на оболочках наночастиц, содержащих длинноцепочечные поверхностные группы никель-нитрилотриуксусной кислоты (Ni-NTA-MNP), с использованием супернатанта клеточной культуры *Pichia*. пасторис (h-TLL) (Рисунок 1.11) [122]. Это позволило обеспечить высокую загрузку фермента и его удельную активность при конверсии отработанного смазочного материала в биодизельное топливо с выходом 94%.



Рисунок 1.11 - Иммобилизация меченого *His* внеклеточного фермента непосредственно из супернатанта клеточной культуры на магнитных наночастицах (Ni-NTA-MNP), биотрансформация и рециркуляция биокатализатора, а также регенерация Ni-NTA-MNP из использованного катализатора [122]

1.6 Существующие подходы к синтезу магнитоотделяемых оксидов кремния и циркония

Для пористых носителей большая площадь поверхности критически влияет на способность к связыванию фермента, хотя при малых размерах пор диффузионные ограничения могут отрицательно влиять на активность катализатора. Таким образом, размеры пор следует контролировать, чтобы оптимизировать загрузку фермента, в то же время, необходимо учитывать, что гидрофильный характер носителя также влияет на активность иммобилизованного фермента.

Было показано, что пористый диоксид кремния является отличным носителем для иммобилизации ферментов благодаря большой площади поверхности и легкой функционализации с любым фрагментом с использованием коммерчески доступных силанов. Существует множество примеров иммобилизации GOx и других ферментов семейства оксидоредуктаз (например, пероксидазы хрена, HRP) на носителях на основе диоксида кремния, таких как
мезопористый диоксид кремния. [126, 127-131] Диоксид кремния, содержащий магнитные наночастицы, также использовали для иммобилизации HRP, создавая магнитоотделяемые катализаторы [132-135]. Такие биокатализаторы позволяюти осуществлять легкое магнитное разделение, обеспечивать экономию энергии, а также получать более дешевые и более чистые целевые продукты [136-144]. В большинстве описанных случаев иммобилизации фермента на магнитных носителях на основе диоксида кремния используется HPR, которая обычно присоединяется к аминофункциональному оксиду кремния через глутаральдегид [133-135]. Наибольшая относительная активность, о которой сообщалось до сих пор, не превышала 84,5% нативного HPR. В работе Янга и соавторов сообщается о биокатализаторе на основе глюкозооксидазы (GOx), иммобилизованноой на магнитоотделяемом носителе из диоксида кремния, который продемонстрировал 81% активности по сравнению с активностью нативного фермента.

Мезопористый магнитоотделяемый оксид кремния, синтезированный в результате образования наночастиц оксида железа в порах, был использован как носитель для металлосодержащих магнитоотделяемых катализаторов [145-147]. Магнитоотделяемый оксид алюминия встречается реже, но в литературе есть несколько примеров, где оксид железа образуется в порах мезопористого оксида алюминия. [148-153]

Макро- и мезопористый диоксид циркония ранее использовался для иммобилизации биомолекул [154]. Например, пористые микротрубки на основе ZrO<sub>2</sub>, стабилизированного иттрием, использовались для фильтрации бактерий за счет иммобилизованного лизоцима в качестве антибактериального фермента. [155] Адсорбция α-амилазы на оксиле циркония привела к частичным конформационным изменениям фермента, а также снижению активности по сравнению с нативным ферментом [156]. Макропористый диоксид циркония был использован для иммобилизации липазы при гидролизе *n*-нитрофенилпальмитата. При этом происходит значительная потеря активности по сравнению с нативной липазой. С другой стороны, инкапсуляция липазы в диоксиде циркония, полученная золь-гель реакцией, позволила стабилизировать липазу в более широком температурном интервале [157]. Иммобилизация липазы на гидрофобно модифицированных  $ZrO_2$ наночастицах позволила получить

высокоэнантиоселективный катализатор [158]. Для синтеза носителей на основе диоксида циркония необходимо учитывать температуру кальцинирования ZrO<sub>2</sub>, которая сильно влияет на его кристаллическую структуру [159-161] и кислотность [162-164], что в свою очередь может оказать влияние на свойства биокатализаторов.

1.7 Глюкозооксидаза: строение, механизм действия и применение

Глюкозооксидаза (β-D-глюкоза:кислород-1-оксидоредуктаза, GOx, КФ 1.1.3.4) - это фермент, представляющий собой димерный белок, который в качестве кофактора содержит флавинадениндинуклеотид (ФАД), являющийся компонентом окислительно-восстановительных реакций. 3D структура GOx представлена на рисунке 1.12. Фермент состоит из 580 остатков аминокислот, ФАД-кофактора, шести N-ацетилглюкозаминных остатков и трех остатков маннозы. Размеры молекулы: 6,0нм X 5,2нм X 7,7нм.



Рисунок 1.12 – 3D структура глюкозооксидазы

В реакции окисления D-глюкозы, ФАД принимает два электрона и восстанавливается до ФАД-H<sub>2</sub>, при этом D-глюкоза превращается в D-глюконо-1,5лактон (уравнение 1.1). Затем оба электрона с ФАД-H<sub>2</sub> переходят на молекулярный кислород с образованием ФАД и пероксида водорода (уравнение 1.2). В водной среде, образующийся D-глюконо-1,5-лактон спонтанно гидролизуется в глюконовую кислоту (уравнение 1.3) [165].

D-глюкоза + GOx-FAD → GOx-FADH<sub>2</sub>+ D-глюконо-1,5-лактон 
$$(1.1)$$

$$GOx-FADH_2 + O_2 \rightarrow GOx-FAD + H_2O_2$$
(1.2)

D-глюконо-1,5-лактон +  $H_2O \rightarrow$  глюконовая кислота (1.3)

Для ферментативного продуцирования GOx наиболее распространенными микробными источниками являются виды *Aspergillus, Penicillium* и *Saccharomyces*. В промышленном масштабе наибольшее распространение получил GOx, выделяемый из мицелия *Aspergillus niger*. В реакциях, катализируемых GOx, удаляется кислород и образуется перекись водорода, поэтому фермент используется как антиоксидант при сохранении пищи, производстве яичного порошка и вина [166-167].

Электрохимическая активность GOx делает его важным компонентом в датчиках определения глюкозы. Глюкозооксидаза может переносить электроны не только на кислород, но и на металлы, поэтому этот фермент широко используется в биосенсорах для измерения уровня глюкозы. Такие биосенсоры составляют центральную часть приборов, определяющих уровень сахара, например, в крови у больных диабетом. Для создания биосенсоров на основе GOx проводятся многочисленные исследования по иммобилизации фермента на носители различного типа: наночастицы золота [168-169], нанотрубки TiO<sub>2</sub> [170], [171-172], модифицированные металлорганические каркасы углеродные наноматериалы [173-178]. Такое многообразие исследований указывает на актуальность и востребованность работ по иммобилизации GOx на гетерогенные подложки.

#### 1.8 Окисление глюкозы

Окислению моносахаридов, в частности D-глюкозы, уделялось значительное внимание из-за важности D-глюконовой кислоты и ее солей (глюконатов), используемых в качестве лекарств, пищевых добавок, компонентов чистящих средств и т. д [179]. Многофункциональный характер D-глюкозы при ее окисление часто дает ряд побочных продуктов, изображенных на схеме 1. Селективное окисление полуацетальной группы без окисления гидроксильных групп требует селективных и эффективных каталитических систем.



Схема 1.1 - Возможные пути окисления D-глюкозы

Химическое или электрохимическое окисление D-глюкозы в присутствии различных окислителей используется в промышленном производстве Dглюконовой кислоты, но селективность процесса и выход целевого продукта обычно низкие из-за образования побочных продуктов. Кроме того, использование инертных антикоррозионных материалов для футеровки реактора и больших количеств окислителей оказывает неблагоприятное воздействие на окружающую среду, делая эти процессы экологически неустойчивыми [179].

В последние годы активно исследуются гетерогенные катализаторы для окисления моносахаридов. Сообщалось о каталитическом окислении D-глюкозы с использованием моно- и биметаллических катализаторов, содержащих Pt, Pd, Bi, Au, Rh, Tl, Sn или Co [180-192].

Гетерогенные каталитические системы могут быть отделены от реакционной среды и позволяют использовать менее агрессивные окислители, такие как кислород и воздух. Несмотря на то, что использование гетерогенных катализаторов определенно является шагом вперед по сравнению с химическим или электрохимическим окислением, сравнительно низкая селективность и возможное

выщелачивание каталитических металлов затрудняют их практическое применение.

Микробное окисление D-глюкозы активно изучается, поскольку многие бактерии обладают ферментом, необходимым для ее окисления в мягких условиях высокой селективностью. Различные штаммы микробов, И с такие как Aspergillius niger, Tricholoma robustum и Gluconobacter spp., Tricholoma bakamatsutake, Gluconobacter oxydans, Zymomonas mobilis, Penicillium variabile, Acetobacter methanolicus, Acetobacter diazotrobacterus, были успешно использованы в качестве субобактерий Astobacter, а также микроорганизмов, производных от Acetobacter diazotrobacterus. При этом у всех вариантв процессов ферментации есть некоторые недостатки. Культурам требуются различные добавленные питательные вещества и, по крайней мере, несколько дней для роста и биоконверсии. Кроме того, культуральные растворы производят и содержат нежелательные побочные продукты, нуждаются в последующей очистке и потребляют субстраты, препятствующие высокой эффективности преобразования. Использование ферментов в органическом синтезе имеет многочисленные преимущества, такие как: мягкие условия реакции с точки зрения температуры, давления и рН; более низкие энергозатраты; высокая энантио-, регио- и хемоселективность процесса. Однако ключевыми недостатками являются высокая стоимость ферментов и их одноразовое использование, поскольку их разделение практически невозможно. Эти недостатки были в значительной степени преодолены при разработке иммобилизованных ферментативных каталитических систем (биокатализаторов) [193-194].

В работе Сана и соавторов [183] использовали металлоорганический каркас иммобилизации глюкозооксидазы. Металлоорганические каркасы ДЛЯ ДЛЯ инкапсуляции ферментов in situ обычно обладают слабыми координационными связями металл-лиганд и довольно маленькими порами, которые нестабильны в водном растворе и обладают довольно высокой диффузионной стойкостью реагентов. Авторы синтезировали иерархически пористый и водостойкий металлоорганический каркас методом обработки полифенолом для инкапсуляции инкапсулируются ферментов. Ферменты сначала in situ В цеолитный имидазолатный каркас-8 (ZIF-8) посредством соосаждения ферментов, ионов цинка

и молекул 2-имидазола. Затем вводят дубильную кислоту (типичный полифенол) для функционализации поверхности и травления пустоты ZIF-8, получая биокатализатор, обозначенный E@ZIF-8@ZnTA (схема 1.2). Авторы отмечают, что иерархически пористая структура носителя ускоряет процесс диффузии реагентов. В качестве модельного фермента для синтеза биокатализатора использовали глюкозооксидазу. Полученный катализатор протестировали в окислении Dглюкозы, и было показано превращение субстрата на 77,4%, что значительно выше при сравнении с непористым носителем. Это исследование представляет простой и универсальный метод инкапсуляции широкого спектра ферментов в иерархически пористый и водостойкий металлоорганический каркас с повышением активности и стабильности биокатализаторов.



Схема 1.2 - Приготовление биокатализаторов Е @ ZIF-8 @ ZnTA

Интересные результаты были получены в работе [132], где авторы использовали ДЛЯ иммобилизации GOx наночастицы магнетита, модифицированные оболочкой оксида кремния. Авторами был предложен синтез нового гибрид-ферментного материала путем иммобилизации фермента, функционализированного полиэтиленимином, магнитных на наночастицах Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C с последующим инкапсулированием in situ диоксидом кремния (схема 1.3).



Схема 1.3 - Получение наногибрида Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ C-GOD-SiO<sub>2</sub> для улучшения стабильности и свойств фермента

ПЭМ-изображения синтезированного наногибрида Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ C-GOD-SiO<sub>2</sub> показаны на рисунке 1.14 а и б. По сравнению с исходными наночастицами Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ C, гибриды фермента и включения SiO<sub>2</sub> имели более шероховатую поверхность, а толщина оболочки увеличивалась с 10 нм до 20 нм, что может быть связано с формированием оболочки SiO<sub>2</sub>.



Рисунок 1.14 - (а и б) ПЭМ-изображения наногибрида Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ C-GOD-SiO<sub>2</sub>

Используя в качестве модельного фермента глюкозооксидазу, авторы показали, что полученные гибриды фермент-носитель демонстрируют относительно стабильную каталитическую способность в диапазоне температур от 25 до 65 °C. Даже после 4 часов инкубации при 55 °C биокатализаторы все еще сохраняют 77% своей исходной активности, в то время как нативные композиты сохраняют только 30%. Кроме того, наногибриды демонстрируют отличную свойства повторного использования, поскольку магнитные возможность

интегрированных частиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> облегчают разделение ферментов и их переработку. Этот эффективный и недорогой подход можно рассматривать как осуществимую стратегию иммобилизации ферментов для промышленных и других применений, которая подчеркивает тактику улучшения ферментов с помощью функциональных материалов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ

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

# ГЛАВА ВТОРАЯ. МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ

# 2.1. Реактивы

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

Taojinga 2.1. Chineok peakindod, nenojidjobannidik b paoore	Таблица 2.1. –	Список	реактивов,	использованных	В	работе
---	----------------	--------	------------	----------------	---	--------

N⁰	Реактив	Формула	Марка						
	Фермент								
1	Глюкозооксидаза, A. niger	Aspergillus niger, 174.9 Ед/мг	«SIGMA-ALDRICH»						
	Носители								
2	Оксид алюминия	γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	«SIGMA-ALDRICH»						
3	Диоксид кремния	SiO <sub>2</sub>	«SIGMA-ALDRICH»						
		Реактивы							
4	Нитрат железа (III)	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	«SIGMA-						
	нонагидрат		ALDRICH»,98%						
5	Циркония хлорид октагидрат	ZrOCl <sub>2</sub> ×8H <sub>2</sub> O	«SIGMA-ALDRICH»						
6	Этиленгликоль	$C_2H_4(OH)_2$	«Компонент- реактив»,						
			ГОСТ 10164-75, ч.д.а.						
7	3-	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> Si	«SIGMA-ALDRICH»,						
	аминопропилтритоксисилан		>99 %						
8	Глутаровый альдегид	$C_5H_8O_2$	«BioChemika», 25%						
9	Аммиак водный	NH4OH	«Сигма Тег», Гост 3760-						
			79						
10	Этиловый спирт	<u>C2H5OH</u>	«НПФ Химмедсервис»,98%						
Субстрат									
11	Глюкоза	$C_{6}H_{12}O_{6}$	«НПФ Химмедсервис»						

	Фосфатный буфер						
12	Дигидрофосфат калия	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	«ГРАНХИМ» ТУ 6-09- 01-754-89				
13	Гидрофосфат натрия додекагидрат	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12H <sub>2</sub> O	«НПФ Химмедсервис»				
14	Хлорид натрия	NaCl	«НПФ Химмедсервис»				
15	Хлорид калия	KCl	«НПФ Химмедсервис»				

2.2 Синтез биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия

Магнитоотделяемые оксиды получали in-situ кристаллизацией наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в мезопорах исходного оксида [147, 195-196]

Процесс формирования магнитных наночастиц (МНЧ) оксида железа (магнетита, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) происходит в результате протекания последовательных реакций:

-разложение нитрата железа (III) (2.1)  $2Fe(NO_3)_3 \rightarrow 2Fe_2O_3 + 2NO_2 + O_2$  (2.1)

- частичное восстановление оксида железа (III) этиленгликолем (2.2-2.3)

$$CH_2OHCH_2OH \rightarrow CH_3CHO + H_2O$$
(2.2)

$$2CH_{3}CHO + Fe_{2}O_{3} \rightarrow CH_{3}COCOCH_{3} + 2FeO + H_{2}O \qquad (2.3)$$

И поскольку эти реакции происходят в мезопорах, то именно там и происходит формирование наночастиц магнетита.

## 2.2.1 Синтез магнитоотделяемого оксида кремния

Для синтеза магнитоотделяемого диоксида кремния использовался коммерческий мезопористый SiO<sub>2</sub> (размер пор 6 нм), в порах которого проходило

формирование МНЧ оксида железа. Для выбора оптимальных условий синтеза варьировались следующие параметры: соотношение диоксид кремния: нитрат железа, время перемешивания, количество этиленгликоля, время отжига. При оптимальных условиях, синтез магнитоотделяемого диоксида кремния проводили следующим образом.

Образец SiO<sub>2</sub> массой 2.5 г помещался в этанольный раствор нитрата железа (2 г Fe (NO<sub>3</sub>)  $_3 \times 9H_2O$  в 10 мл этанола). Смесь оставляли на 12 часов при постоянном перемешивании на воздухе для испарения этанола. Затем образец сушили под вакуумом при комнатной температуре не менее 2 ч до полного высыхания. Затем порошкообразный продукт перемешивали лопаточкой, добавляя при этом 70 капель этиленгликоля. Образец становился золотисто-желтым, когда он был полностью смочен этиленгликолем. Полученный порошок загружали в две фарфоровые «лодочки» и нагревали в кварцевой трубе в трубчатой печи под аргоном до 250 °C со скоростью нагрева 2 °C / мин, а затем отжигали в течение 6 ч. Затем образец охлаждали до комнатной температуры. Фото образца исходного SiO<sub>2</sub> и полученного магнитоотделяемого диоксида кремния (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>) представлено на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1 - Фото образца исходного SiO<sub>2</sub> и полученного магнитоотделяемого диоксида кремния (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>)

## 2.2.2 Синтез магнитоотделяемого оксида алюминия

Для синтеза магнитоотделяемого оксида алюминия первоначально использовался подход, аналогичный синтезу Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> с использованием

мезопористого  $Al_2O_3$ . Однако, коммерчески доступного изначально образовывалось очень незначительное количество МНЧ. Для более эффективного включения ионов железа в поры Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> необходимо наличие на его поверхности ОН-групп. Оксид алюминия, в отличие от диоксида кремния, имеет на поверхности гидроксогрупп. Для увеличения меньшее количество гидроксогрупп на поверхности, коммерческий Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> предварительно обрабатывали раствором NH<sub>4</sub>OH. Такая обработка позволила эффективно инкорпорировать исходную соль железа с последующим образованием наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

В обычном эксперименте 2,5 г мезопористого оксида алюминия и 0,03 мл раствора гидроксида аммония ( $w_{mac}$  28%) перемешивали в 10 мл деионизированной воды в течение 12 часов, отделяли центрифугированием при 4000 об / мин и затем пять раз промывали водой, используя центрифугирование для удаления избытка NH4OH. Обработанный оксид алюминия добавляли к 10 мл раствора этанола, содержащего 2,0 г Fe (NO3)  $_3 \times 9H_2O$ , перемешивали в течение 24 часов и затем давали высохнуть на воздухе при комнатной температуре при перемешивании. Полученный порошок смешивали с 70 каплями этиленгликоля и помещали в керамический сосуд, который затем нагревали в трубчатой печи в атмосфере аргона при 250 ° C в течение 6 часов со скоростью нагрева 2°C/мин. После охлаждения образец измельчали в мелкий порошок с помощью ступки и пестика. Порошок Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> промывали пять раз в ацетоне с использованием магнитного разделения постоянным магнитом и затем сушили. Фото образца исходного Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и полученного магнитоотделяемого оксида алюминия (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) представлено на рисунке 2.2.



Рисунок 2.2 - Фото образца исходного Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и полученного магнитоотделяемого

оксида алюминия (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 48

#### 2.2.3 Синтез магнитоотделяемого оксида циркония

#### 2.2.3.1 Синтез мезопористого оксида циркония

Мезопористый ZrO<sub>2</sub> был синтезирован методом реплики, который был описан в работе [196], где в качестве жесткого шаблона использовался цеолит SBA-15. В данной диссертационной работе в качестве жесткого шаблона использовали мезопористый диоксид кремния с размером пор 6 нм. Проведение синтеза мезопористого ZrO<sub>2</sub> осуществлялось следующим образом. Мезопористый диоксид кремния массой 1 г добавляли к 6,0 г водного раствора, содержащего 1,8 г оксихлорида циркония (ZrOCl<sub>2</sub> × 8H<sub>2</sub>O). Раствор перемешивали до полного суспендирования диоксида кремния. Затем смесь сушили в печи при 100°С в течение одного часа, чтобы выпарить растворитель. Полностью высушенный порошок (SiO<sub>2</sub>·ZrO<sub>2</sub>) переносили в керамический сосуд и прокаливали. Получено образца мезопористого оксида циркония при разных температурах три прокаливания: 300° С (образец 1), 400° С (образец 2) и 600 ° С (образец 3). Прокаливание проводили со скоростью нагрева 1 ° С / мин и выдерживали при этой температуре в течение 5 часов. Далее из прокаленных образцов удаляли жесткий шаблон (диоксид кремния) путем перемешивания в 2 М растворе гидроксида натрия в течение 12 часов. В результате обработки щелочью диоксид кремния растворялся и уходил в раствор (2.4).

$$SiO_2 + 2NaOH \rightarrow Na_2SiO_3 + H_2O$$
 (2.4)

Полученный продукт (мезопористый ZrO<sub>2</sub>) трижды промывали водой, используя центрифугирование, чтобы отделить полученный оксид циркония. Далее его промывали этанолом и сушили при 80 ° С в течение 1 часа.

Таким образом, для проведения исследования в работе было синтезировано три образца оксида циркония в зависимости от температуры прокаливания, которые обозначены, как ZrO<sub>2</sub>-300, ZrO<sub>2</sub>-400 и ZrO<sub>2</sub>-600.

#### 2.2.3.2 Синтез наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в мезопорах оксида циркония

Магнитоотделяемый оксид циркония получали аналогично Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> по методике, описанной в разделе 2.2.1. Для выбора оптимальных условий синтеза варьировались следующие параметры: соотношение оксид циркония: нитрат железа, время перемешивания, количество этиленгликоля, время отжига. В эксперименте при оптимальных условиях 0,48 г нонагидрата нитрата железа (III) в 2,4 мл этанола добавляли к 0,6 г ZrO<sub>2</sub> и перемешивали в течение 12 часов, чтобы полностью испарить растворитель. Семьдесят капель этиленгликоля добавляли к твердому образцу, и последний переносили в керамический сосуд. Помещали в трубчатую печь, нагревали в атмосфере аргона со скоростью от 2 до 250 ° С и выдерживали при этой температуре в течение 6 часов. Твердое вещество несколько, раз промывали ацетоном до тех пор, пока супернатант не становился бесцветным, с использованием разделения с помощью магнита. После этого продукт сушили в вакуумной печи в течение 3 часов. Фото исходных образцов (ZrO<sub>2</sub>-300, ZrO<sub>2</sub>-400 и ZrO<sub>2</sub>-600) и полученного магнитоотделяемого оксида циркония (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- ZrO<sub>2</sub>-300, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600) представлено на рисунке 2.3.



Рисунок 2.3 – Фото образца исходного и полученного магнитоотделяемого оксида циркония: (a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- ZrO<sub>2</sub>-300, (б) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 и (в) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600)

2.2.4 Функционализация поверхности магнитоотделяемых оксидов кремния, алюминия и циркония 3-аминопропилтритоксисиланом

Для синтеза биокатализаторов на основе магнитоотделяемых носителей необходимо было функционализировать их поверхности аминогруппами. В качестве модификатора использовался 3-аминопропилтритоксисилан (APTES). Схема модификации представлена на рисунке 2.4.

Добавление APTES к немодифицированному коллоидному оксиду кремния



APTES-модифицированный коллоидный диоксид кремния

Рисунок 2.4 – Добавление APTES к немодифицированному коллоидному кремнезему

Модификация проходила следующим образом. Магнитоотделяемые образцы носителей: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- ZrO<sub>2</sub>-300, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (по 0,3 г) суспендировали в 8 мл водного раствора APTES. Для приготовления данного раствора ледяную уксусную кислоту добавляли к 10 мл воды до достижения pH 4. Затем 8 мл подкисленной воды смешивали с 0,8 мл APTES и использовали для суспендирования носителя. После этого, в суспензию добавляли 4 мл глицерина. Функционализацию поверхности магнитоотделяемых оксидов, взаимодействтием с APTES проводили при перемешивании при 90 °C в течение 5 часов. Затем модифицированный носитель промывали водой (три раза) и метанолом (пять раз) и сушили под вакуумом в течение 12 часов.

## 2.2.5 Иммобилизация глюкозооксидазы на магнитоотделяемые носители

Для синтеза биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов кремния, алюминия и циркония проводили иммобилизацию GOx путем ковалентного связывания. В качестве сшивающего агента использовался глутаровый альдегид (GA). На рисунке 2.5 представлена схема ковалентного связывания GOx на модифицированный носитель.



Рисунок 2.5 – Схема ковалентного связывания GOx на модифицированный носитель

Процесс присоединения глутарового альдегида проводили следующим образом. Сухой образец магнитоотделяемого оксилного носителя, модифицированного APTES, массой 0,10 г добавляли к 20 мл раствора GA в фосфатном буфере и перемешивали в течение 1 часа. Для приготовления раствора GA 0,08 мл 25% GA в воде смешивали с 20 мл фосфатного буфера при рН 7,0. Носитель, модифицированный GA, отделялся с помощью неодимового магнита и промывался водой пять раз. В то же время 10 мг глюкозооксидазы помещали на инкубацию в 20 мл фосфатного буфера и перемешивали в течение 1 часа. Полученный раствор GOx добавляли к носителю, функционализированному GA, и перемешивали в течение 1 часа. Затем биокатализатор отделялся от раствора с помощью неодимового магнита сразу использовался тестировании И В каталитической активности в процессе окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты.

Таким образом, при использовании магнитоотделяемых оксидов кремния, алюминия и циркония были синтезированы следующие биокатализаторы: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- ZrO<sub>2</sub>-300-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400-GOx и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx.

Расчет количества иммобилизованного фермента GOx проводили с учетом начальной концентрации GOx в фосфатном буфере и концентрации GOx, оставшейся в буферном растворе после иммобилизации. Чтобы оценить количество иммобилизованного GOx, мы определили коэффициент иммобилизации (IC) [197]:

$$IC = (C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%$$
(2.1)

где C<sub>0</sub> и C<sub>1</sub> - количества GOx (мкг/мл) в фильтрате до и после иммобилизации (после удаления биокатализатора) соответственно. Эти количества

были найдены, оценивая активность в окислении D-глюкозы и принимая во внимание, что во всех экспериментах начальная активность GOx составляет 174,9 Ед / мг.

2.3. Методика окисления D-глюкозы в присутствии магнитоотделяемых биокатализаторов

Тестирование каталитической активности синтезированных магнитоотделяемых биокатализаторов проводили в реакции окисления D-глюкозы, которая осуществлялась по схеме, представленной на рисунке 2.6. Окисление D-глюкозы в D-глюконовую кислоту проводили в термостатированной трехгорлой круглодонной колбе (рисунок 2.6), снабженной верхней мешалкой, впускным отверстием для подачи кислорода и обратным холодильником, работающим в качестве выпускного отверстия для газа.



Рисунок 2.6 – Схема окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии биокатализатора

Реакцию проводили при варьировании температуры 30 - 80 ° С и атмосферном давлении. Нагрев колбы и поддержание температуры реакции осуществлялось за счет циркуляции теплоносителя. После достижения необходимой температуры в колбу вносили 0,11 г биокатализатора, 10 мг D-глюкозы и 15 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 6,0) и перемешивали со скоростью 80 об/мин в течение 1 часа, после

чего вводили кислород (скорость подачи от 440 до 450 мл / мин). После завершения реакции катализатор выделяли, а реакционную смесь исследовали с использованием ВЭЖХ.



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

Активность биокатализатора (A, мкМ (Glr) / (мг (GOx) × мин)) рассчитывали по формуле (2.5): [198]

$$\mathbf{A} = \frac{Gl_r}{[GOx] \times IC \times V \times \tau} \tag{2.5}$$

где [GOx] количество (мг) нативного или иммобилизованного GOx, IC коэффициент иммобилизации, V объем реакционного раствора, т время реакции (60 минут), и Glr количество реагирующей D-глюкозы (ммоль).

Относительную активность биокатализатора определяли по формуле (2.6):

$$R = \frac{A_i}{A_0} \times 100\% \tag{2.6}$$

где A<sub>0</sub> и A<sub>i</sub>- активности нативного GOx и иммобилизованного GOx, соответственно [127-128].

Влияние pH на активность свободного GOx и биокатализаторов оценивали в двух буферах (0,1 М): ацетатном (pH 3,0–5,5) и фосфатном (pH 6,0–8,0). Для определения влияния температуры GOx и биокатализаторы анализировали в интервале температур 30–60 ° С. Долгосрочную инкубационную стабильность нативного GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx и ZrO<sub>2</sub>-600-GOx определяли путем хранения в фосфатном буфере (50 мМ, pH 6,0) при 37 ° С и 50 ° С.

Максимальную скорость (*Vmax*) и константу Михаэлиса (*Km*) рассчитывали путем определения начальных скоростей реакции для различных концентраций D-глюкозы с нативной и иммобилизованной GOx в фосфатном буфере (3,8-380 мM, pH 6,0) при 40 °C. Зависимость скорости окисления D-глюкозы от концентрации D-глюкозы определялась моделью Михаэлиса-Ментен. [199,200].

2.4. Методика анализа реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Анализ реакционной смеси процесса окисления D-глюкозы проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В ходе анализа использовали ВЭЖХ установку Ultimate 3000 (Dionex), оборудованную массспектрометром - API-2000 (Applied Biosystems, США), ультрафиолетовым датчиком, 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 °C. 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 анализа реакционной смеси при окислении D-глюкозы в присутствии полученных биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на магнитоотделяемые оксидные носители.



Рисунок 2.8 – Хроматограмма анализа реакционной смеси при окислении Dглюкозы (1-пик глюкозы, 2 – пик фосфатного буфера, 3 пик – глюконовой кислоты)

Других соединений в реакционной смеси не было обнаружено, что может быть объяснено высокой субстратной специфичностью GOx.

2.5. Физико-химические методы исследования магнитоотделяемых оксидных носителей и биокатализаторов на их основе

## 2.5.1. Метод вибрационного магнитометра

Измерения намагниченности выполнялись в Техническом университете Дармштадта (Германия) методом вибрационного магнитометра на установке PPMS-14 фирмы Quantum Design. В работе вибрационного магнитометра использован индукционно-непрерывный метод, основанный на взаимодействии переменного магнитного поля колеблющегося образца с системой неподвижных катушек. При использовании компактной градиентометрической конфигурации измерительной катушки, относительно большой амплитуды колебаний (1-3 мм) и пиковой частоте 40 Гц, система способна разрешить изменения намагничивания меньше, чем 10<sup>-6</sup> А м<sup>2</sup> со скоростью передачи данных 1 Гц.

Основной принцип работы вибрационного магнитометра состоит в том, что изменение магнитного потока будет индуцировать напряжение в измерительной катушке. В зависимости от времени индуцированное напряжение задается следующим уравнением (2.7):

$$V_{\kappa a m y u \kappa u} = \frac{d\Phi}{dt} = \left(\frac{d\Phi}{dz}\right) \left(\frac{dz}{dt}\right) \tag{2.7}$$

В уравнении (2.4), Ф является магнитным потоком, проходящим через поперечное сечение измерительной катушки, z - вертикальное положение образца по отношению к катушке, и t - время. Для синусоидально-колеблющегося образца, напряжение, индуцированное внутри катушек, равно:

$$V_{\kappa a my u e \kappa} = 2\pi f C m A sin(2\pi f t)$$
(2.8)

В уравнении (2.8), С является константой связи, *m* - магнитный момент образца, *A* - амплитуда колебаний, и *f* - частота колебаний. Определение магнитного момента заключается в измерении коэффициента отклика синусоидального напряжения в измерительной катушке.

С помощью данной установки определялись величины удельной намагниченности образцов, измерение полных и частных петель гистерезиса, кривых возврата и кривых намагничивания под произвольными углами к направлению оси легкого намагничивания образцов.

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 ± 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.

#### 2.5.2 Метод низкотемпературной адсорбции азота

Методом низкотемпературной адсорбции азота проводились измерения удельной поверхности и пористости синтезированных образцов магнитоотделяемых носителей в Институте нано- и биотехнологий Тверского государственного технического университета.

Сущность метода низкотемпературной адсорбции азота состоит в анализе сорбции газа твердым телом при постоянной криогенной температуре и Образец постепенном повышении давления. 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) [201].

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

- 1. Анализатор площади поверхности и распределения пор по размерам: BECKMAN COULTER<sup>TM</sup> SA 3100<sup>TM</sup> (COULTER CORPORATION, США).
- 2. Прибор подготовки образцов: BECKMAN COULTER<sup>TM</sup> SA-PREP<sup>TM</sup> (COULTER CORPORATION, США).
- 3. Весы электронные GX-200 (A&D Company, Limited, Япония).

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 термошкафу при температуре до + 200°С. Время сушки обычно 60 – 120 мин.

Стандартизованный образец поступает на А-РRЕР<sup>ТМ</sup>.

## 2) Подготовка образца на SA-PREP<sup>TM</sup>

Навеска стандартизованного образца (0.1 – 3.0 г) помещается в кварцевую предварительно взвешенную кювету, которая устанавливается в прибор подготовки образца SA-PREP<sup>TM</sup>. Сушка проводится в токе азота особой чистоты (99,999%, ГОСТ 9293-74), при температуре до + 400 <sup>0</sup>C. Время сушки обычно составляет 60 – 180 мин.

Подготовленный образец поступает в порт дегазации прибора SA 3100<sup>тм</sup>.

3) Дегазация образца на приборе SA  $3100^{\text{TM}}$ .

Кварцевая кювета с образцом устанавливается в порт дегазации SA-PREP<sup>TM</sup>.

Температура – до + 350 °C; 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  $3100^{TM}$ 

Исследование поверхности образца включает несколько последовательных анализов.

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

Распределение пор от 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 адсорбциидесорбции; 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 адсорбциидесорбции; зависимость Ленгмюра; зависимость БЭТ; t-график; распределение пор по объему; распределение пор по площади.

В) Если образец мезо-, или 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 адсорбциидесорбции; 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 адсорбциидесорбции; зависимость Ленгмюра; зависимость БЭТ; t-график; распределение пор по объему; распределение пор по площади.

## 2.5.3 Рентгенофотоэлектронная спектроскопия

Рентгенофотоэлектронная спектроскопия (РФЭС) представляет особую важность для биокатализа, поскольку является поверхностно чувствительным методом [202.]. РФЭ спектры позволяют определить химические сдвиги аналитических подуровней элементов и концентрации атомов на поверхности.

Методом РФЭС образцов биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на магнитоотделяемые носители, был установлен качественный состав поверхности.

Измерения проводились с помощью спектрометра ЭС 2403 М-Т СКБ АП РАН (Россия), оснащенного анализатором энергий PHOIBOS 100-5MCD (SPECS, Германия) и источником рентгеновских лучей XR-50 (SPECS, Германия) в Институте нано- и биотехнологий Тверского государственного технического университета. Для фотоэлектронного возбуждения использовалось характеристическое Mg Kα излучение (hv = 1253.6 эВ). Мощность источника излучения 250 Вт. Для компенсации статической зарядки образца, которая

происходит в диэлектриках из-за медленного возмещения потери части электронов, вызываемой рентгеновскими лучами, была применена низковольтная электронная 2·10<sup>-6</sup> Па давлении с пушка. Спектры записаны при предварительно дегазированных в сверхвысоком вакууме образцов [202]. В качестве референтного пика был использован пик С 1s (285.0 эВ). Обзорные спектры регистрировались в диапазоне 1100-0 эВ с шагом по энергии 0.5 эВ при энергии пропускания анализатора 80 эВ. Спектры высокого разрешения регистрировались с шагом по энергии 0.05 эВ при энергии пропускания анализатора 7 эВ, что соответствует ПШВП стандарта Ag 3d<sub>5/2</sub> 0.85 эВ. Обработка спектров проводилась с применением программного пакета CasaXPS.

По данному методу измеряется кинетическая энергия электронов, выбитых из образца под действием рентгеновских лучей определенной энергии. РФЭ спектры - графики зависимости интенсивности потока эмитированных электронов от энергий связи этих электронов в образце, рассчитанных по классической формуле (2.9):

$$E_{cB} = hv - E_{KUH} + \phi, где$$
(2.9)

Е<sub>св</sub> – энергия связи электрона на энергетическом подуровне;

Екин – кинетическая энергия электрона;

hv – энергия рентгеновского кванта;

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.

## 2.5.4 ИК-Фурье спектроскопия

Инфракрасные спектры Фурье-преобразования с диффузным отражением (DRIFTS) регистрировали при комнатной температуре с помощью спектрометра Nicolet 460 Protégé (США), снабженного насадкой для диффузного отражения. Все образцы обрабатывали в вакууме при 300 ° С в течение 2 ч до сбора спектров FTIR. Чтобы получить удовлетворительное отношение сигнал / шум, было собрано 500 сканов для каждого спектра. Спектры измеряли от 400 до 6000 см<sup>-1</sup> с разрешением 4 см<sup>-1</sup>. Молекулы зонда для кислотных центров (CD<sub>3</sub>CN) и для основных центров (CCl<sub>3</sub>D) были адсорбированы при комнатной температуре и давлении насыщенных паров 12,8 и 18,7 кПа соответственно.

### 2.5.5 Рентгеновская дифракция

Рентгенофазовый анализ исходных образцов оксидов и после введения МНЧ был выполнен на дифрактометре PANalytical на химическом факультете университета Индианы (США). Использовали монохроматизированное СuКαизлучение с длиной волны 1.5418 Å. Щели Соллера, щели против рассеяния, щели с расходимостью и никелевый фильтр были на пути луча. Во время измерения в режиме отражения образец вращался со временем оборота 4 с. Измерения проводились с различными размерами шагов и скоростями счета. Размер шага для экспериментов составлял 0,02. Программа HighScore (PANalytical) использовалась для обработки рентгенограмм.

#### 2.5.6. Просвечивающая электронная микроскопия

Анализ синтезированных образцов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) был выполнен на химическом факультете университета Индианы (США) на приборе JEOL JEM1010. Электронно-прозрачные образцы для ПЭМ готовили путем помещения капли суспензии образца на покрытую углеродом медную решетку. Изображения были получены при ускоряющем напряжении 80 кв

на просвечивающем электронном микроскопе. Для оценки полученного изображения использовалась программа обработки изображений ImageJ.

2.5.7. Сканирующая энергодисперсионная спектроскопия

Сканирующая ПЭМ (СПЭМ) энергодисперсионная спектроскопия (ЭДС) проводилась при ускоряющем напряжении 300 кВ на просвечивающем электронном микроскопе JEOL 3200FS, оснащенном системой ЭДС Oxford Instruments INCA (химический факультет университета Индианы (США)). Для анализа использовались те же электронно-прозрачные образцы, что и для ПЭМ.

## ГЛАВА ТРЕТЬЯ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Результаты физико-химического исследования магнитоотделяемых мезопористых оксидов кремния и алюминия и биокатализаторов на их основе

3.1.1 Результаты исследования методом низкотемпературной адсорбции азота

Для синтеза магнитоотделяемых носителей: диоксида кремния (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>) и оксида алюминия (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) - использовались коммерческие мезопористые оксиды (SiO<sub>2</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) с порами  $\approx$ 6 нм, в порах которых формировались МНЧ оксида железа (глава 2, раздел 2.2). Данные низкотемпературной адсорбции азота использовались для оценки пористости Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и представлены на рисунках 3.1 и 3.2.

Изотермы адсорбции-десорбции (рис. 3.1, 3.2) относятся к типу IV, что характерно для мезопористых материалов [203]. Площадь поверхности по БЭТ составляет 304 м<sup>2</sup>/г и 106 м<sup>2</sup>/г для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> соответственно (таблица 3.1). Для магнитоотделяемого оксида кремния наблюдается уменьшение площади поверхности на ~ 34% по сравнению с площадью исходного SiO<sub>2</sub> (458 м<sup>2</sup>/г). В тоже время для магнитоотделяемого оксида алюминия уменьшение площади составляет ~ 23% по сравнению с исходным Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (133 м<sup>2</sup>/г).

Носитель	SiO <sub>2</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	$Al_2O_3$	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -
		SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> - NH <sub>2</sub>		Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
Площадь	458	304	244	133	106	70
поверхности,						
$M^2/\Gamma$						

Таблица 3.1 - Площадь поверхности по БЭТ для носителей на основе оксидов кремния и алюминия



Рисунок 3.1 - Изотермы адсорбции-десорбции  $N_2$  (a, c и e) и распределение пор по размерам (b, d и f) исходного диоксида кремния (a, b), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> (c, d), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (e, f)



Рисунок 3.2 - Изотермы адсорбции-десорбции N<sub>2</sub> (a, c) и распределение пор по размерам (b, d) исходного оксида алюминия (a, b) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (c, d)

Распределение пор по размерам для  $Fe_3O_4$ -SiO<sub>2</sub> показывает широкий максимум при ~ 6 нм, который близок к максимуму исходного оксида кремния (рис. 3.1). Эти данные показывают, что МНЧ  $Fe_3O_4$  располагаются в стыках пор, блокируя при этом только маленькие поры. В случае  $Fe_3O_4$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (рис.3.2) распределение пор по размерам с максимумом при 4,5 нм также практически не изменяется после образования наночастиц магнетита в порах оксида алюминия. На примере образца магнитоотделяемого оксида кремния, показано, что после функционализации поверхности APTES -  $Fe_3O_4$ -SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> распределение пор не изменилось (рис. 3.1 е, f). Площадь поверхности при этом составила 244 м<sup>2</sup>/г.

3.1.2 Результаты исследования методами просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции

Для точного установления размера и структуры МНЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, которые сформировались в порах мезопористых оксидов, использовали ПЭМ и рентгеновскую дифракцию. Изображения ПЭМ и рентгенограммы представлены на рисунке 3.3 a и b.



Рисунок 3.3 - ПЭМ-изображение (a) и рентгенограмма (b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>. На вставке в (a) показано изображение с большим увеличением. Красные стрелки указывают на оксиды железа

Изображение ПЭМ четко отображает присутствие МНЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в порах диоксида кремния, однако низкий электронный контраст между оксидом железа и диоксидом кремния не позволяет точно провести измерение размера МНЧ. Для определения кристаллического строения МНЧ были использованы данные рентгеновской дифракции. Рентгенограмма показывает широкий пик около 22, который относится к аморфному оксиду кремния. Кроме того, наблюдается ряд более острых брэгговских пиков, интенсивность и положение которых типичны для шпинели (магнетит, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) [204]. Средний размер кристаллитов, рассчитанный по уравнению Шеррера для отражения (311), составляет 12,7 нм. Следует отметить, что по данным ПЭМ наночастицы оксида железа находятся в порах диоксида кремния с размерами 4-8 нм (рис.3.3 а). Таким образом, данные рентгеновской дифракции ПЭМ свидетельствуют о И том, что несколько наночастиц

объединяются друг с другом внутри поры за счет ориентированного присоединения (oriented attachment manner) [205], образуя единичные кристаллы большего размера.

Для синтеза магнитоотделяемого оксида алюминия использовался аналогичный подход с использованием коммерчески доступного мезопористого оксида алюминия. Для более эффективного включения МНЧ в поры, оксид алюминия дополнительно обрабатывался гидроксидом аммония. Изображение ПЭМ и рентгенограмма магнитоотделяемого оксида алюминия представлены на рисунке 3.4.



Рисунок 3.4 - ПЭМ-изображение (а) и рентгенограмма (b) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. На вставке в (а) показано изображение с большим увеличением. Красные стрелки указывают на оксиды железа

Изображение ПЭМ показывает пористый материал с небольшими МНЧ внутри пор (рис.3.4 a). Рентгенограмма (рис.3.4 b) сложна из-за кристалличности исходного оксида алюминия. Она показывает набор пиков (обозначены черным), которые соответствуют  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [206], несколько (частично а также перекрывающихся) пиков, которые можно отнести К шпинели. Размер кристаллитов оксида железа, полученных с использованием уравнения Шеррера для пика (511) (без перекрытия), составляет 15,6 нм. Опять же, как и в случае Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>, нанокристаллы магнетита намного больше, чем размер пор (~ 4,5 нм, см. Рисунок 3.2), что указывает на ориентированное присоединение наночастиц магнетита внутри поры с образованием более крупных монокристаллов.

#### 3.1.3 Результаты рентгенофотоэлектронной спектроскопии

Для определения состава поверхности магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия, а также степени окисления железа в МНЧ были проведены измерения методом РФЭС для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Полученные данные представлены на рисунке 3.5 и в таблицах 2 и 3.



Рисунок 3.5 - HR XPS Fe 2p-спектры Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> (a) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (б). Синие кривые представляют компоненты Fe<sup>2+</sup>, а зеленые- компоненты Fe<sup>3+</sup>. Оранжевый цвет представляет собой смешанные компоненты. Красная кривая — это соответствие экспериментальных данных (черные точки)

Спектр высокого разрешения Fe 2p РФЭС образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> показывает основной пик с энергией связи (Есв) 711,4 эВ, что характерно для оксидов железа. Сателлитная структура, обычно наблюдаемая для Fe<sup>3+</sup> при Есв на 8 эВ выше основного пика, отсутствует, что указывает на соотношение Fe<sup>3+:</sup> Fe<sup>2+</sup>=2:1, соответствующее магнетиту [207]. Комбинация сателлитов Fe<sup>3+</sup> и Fe<sup>2+</sup> в спектре магнетита приводит к плато между пиками Fe 2p<sub>3/2</sub> и Fe 2p<sub>1/2</sub> (аналогично нашему случаю), что указывает на образование исключительно наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [208]. Аналогичные результаты были получены для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Содержание железа для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> составляет 4,5 ат. % и 7,6 ат. %, соответственно. Параметры деконволюции приведены в таблицах 3.2 и 3.3.

Таблица 3.2 - Параметры деконволюции для спектра высокого разрешения Fe 2p РФЭС образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>

Полоса	Есв, эВ	Расстояние	Полная	% Пиков	%	$\chi^2$
		от первого	ширина на	Гаусса	площади	
		пика в	половине		пика от	
		модели,	высоты,		общей	
		эВ	эВ		площади	
1	709.61	0.00	3.14	84	13.12	
2	711.01	1.40	3.70	80	26.24	
3	714.40	4.79	5.30	100	21.45	
4	719.34	9.74	4.91	100	4.42	0.95
5	722.51	12.91	2.88	100	5.90	
6	724.57	14.96	3.50	80	11.81	
7	727.62	18.01	5.51	100	12.99	
8	732.68	23.08	4.60	100	4.07	

Таблица 3.3 - Параметры деконволюции для спектра высокого разрешения Fe 2p РФЭС образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Полоса	Есв, эВ	Расстояние	Полная	% Пиков	%	$\chi^2$
		от первого	ширина на	Гаусса	площади	
		пика в	половине		пика от	
		модели,	высоты,		общей	
		эВ	эВ		площади	
1	709.90	0.00	2.84	80	14.49	
2	711.35	1.45	3.70	80	28.98	
3	714.12	4.21	5.63	100	15.42	
4	719.20	9.29	5.00	100	9.11	1.59
5	722.50	12.60	3.00	80	6.52	
6	724.55	14.65	3.50	99	13.04	
7	727.34	17.44	5.10	96	8.74	
8	732.72	22.81	4.60	100	3.71	

3.1.4 Физико-химическое исследование биокатализаторов на основе магнитоотделяемых мезопористых оксидов кремния и алюминия

Для ковалентного присоединения GOx к магнитоотделяемому носителю, последний сначала функционализировали аминогруппами с использованием APTES, затем проводили реакцию со связывающим агентом GA, после чего проводили реакцию альдегидных групп GA с аминогруппами GOx. На рисунке 3.6 представлено схематическое изображение иммобилизации GOx на магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия.



Рисунок 3.6 - Схематическое изображение синтеза биокатализатора

Результаты низкотемпературной адсорбции азота показали, что после функционализации поверхности носителей  $Fe_3O_4$ -SiO<sub>2</sub> и  $Fe_3O_4$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> аминогруппами, площадь поверхности уменьшается. Так, для образца  $Fe_3O_4$ -SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> площадь поверхности по БЭТ уменьшается с 304 м<sup>2</sup>/г до 244 м<sup>2</sup>/г (таблица 3.1). Распределение пор по размерам смещается к меньшим значениям и показывает дополнительный максимум примерно при 4 нм, демонстрируя уменьшенные размеры пор из-за прикрепления APTES (рисунок 3.1 e, f). Аналогичные изменения пористости наблюдаются для  $Fe_3O_4$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> при уменьшении площади поверхности по БЭТ со 106 м<sup>2</sup>/г до 70 м<sup>2</sup>/г (таблица 3.1).

Изображения ПЭМ для магнитоотделяемых носителей, функционализированных аминогруппами (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>), представлены на рисунке 3.7. В полученных изображениях не наблюдается
видимых изменений в исходных магнитоотделяемых оксидах кремния и алюминия (рисунки 3.3 a и 3.4 a) по сравнению с функционализированными APTES.



Рисунок 3.7 - ПЭМ-изображение Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (a) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (b)

Результаты анализа методом инфракрасной спектроскопии образцов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> показали, что FTIR-спектры Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> практически идентичны (рис. 3.8). Для обоих образцов четко выражены полосы, характерные для SiO<sub>2</sub> (Si-O-Si, 1070-1080 см<sup>-1</sup>), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (~1390 см<sup>-1</sup>). После введени АРТЕЅ ожидалось появление полосы, характерной для -CH<sub>2</sub>- групп (за счет пропильных радикалов), в диапазоне 2800-3000 см<sup>-1</sup> для образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. Но такая же полоса наблюдается и для исходного образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>, что может быть объяснено присутствием остатков поверхностно-активного вещества (соответственно и наличием -CH<sub>2</sub>- групп ) в исходном оксиде кремния. Для образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, к сожалению, не наблюдалось полосы, характерной для аминогрупп (~ 1600 см<sup>-1</sup>). Считается, что возможна адсорбция NH<sub>2</sub>-групп на соседних наночастицах магнетита, что ослабляет колебания аминогрупп, которые проявляются полосой FTIR при ~ 1600 см<sup>-1</sup>. Можно отметить, что эта полоса обычно довольно слабая для оксида кремния, функционализированного APTES[133,209].



Рисунок 3.8 - ИК-Фурье спектры Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> (красный) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (синий)

Для количественной оценки адсорбированного APTES на поверхности магнитоотделяемых носителей был проведен термогравиметрический анализ. Кривые ТГА магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия до и после 3.9. функционализации APTES представлены на рисунке Потеря веса адсорбированной воды учитывалась до 200°С. Конечная разница в потере веса определялась при 550 °C между образцами с адсорбированным APTES и исходными магнитоотделяемыми оксидами кремния и алюминия. Дальнейший расчет учитывал молекулярную массу органической части APTES (радикал аминопропил), число Авогадро и площадь поверхности образца для определения поверхностной плотности аминопропила (соответственно, плотности аминогрупп). Полученные значения составляют 1,6 и 1,2 единиц аминогрупп на квадратный нм для  $Fe_3O_4$ -SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> и  $Fe_3O_4$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> соответственно, демонстрируя близкую функционализацию APTES для обоих магнитоотделяемых носителей.



Рисунок 3.9 - Кривые ТГА Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (а) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (б) по сравнению с исходными магнитоотделяемыми оксидами кремния и алюминия

Для количества иммобилизованного GOx, рассчитывался оценки коэффициент иммобилизации по формуле 2.1 (раздел 2.2.5). Для этого определялась каталитическая активность супернатанта до и после иммобилизации фермента и отделения биокатализатора. Согласно этим данным, исходные оксиды кремния и алюминия связывают ~ 65% GOx, рассчитанного от количества фермента, использованного для иммобилизации. Для носителей, содержащих МНЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, количество иммобилизованной GOx увеличивается до 70%. Такое количество иммобилизованного GOx соответствует количеству аминогрупп на магнитоотделяемых носителях, функционализированных APTES. Увеличение на 5% иммобилизованного GOx на магнитоотделяемых носителях по сравнению с исходными SiO<sub>2</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, может быть связано с облегчением реакции с функциональными группами GA в присутствии наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [210, 211]. Необходимо отметить, что увеличение нагрузки нативного GOx для иммобилизации с 10 до 15 мг не влияло на количество иммобилизованного GOx, что ограниченное количество молекул GOx может быть демонстрируя, прикреплено к поверхности магнитоотделяемого носителя, и эта емкость была достигнута для магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия.

3.1.5 Исследование каталитических свойств магнитоотделяемых биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на оксидах кремния и алюминия, в окислении D-глюкозы

3.1.5.1 Изучение влияние pH на активность биокатализаторов на основе оксидов кремния и алюминия

Хорошо известно, что активность фермента сильно зависит от степени ионизации аминокислот в активном центре, что делает pH ключевым фактором в каталитической реакции [212]. Синтезированные магнитоотделяемые биокатализаторы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GOx были исследованы в реакции окисления D-глюкозы в диапазоне pH 4-8. В качестве сравнения эксперименты проводились (при одинаковых условиях) с нативным ферментом, GOx, иммобилизованной на исходные SiO<sub>2</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Для характеристики поведения

75

биокатализаторов использовался параметр относительной активности (раздел 2.3), который позволил сравнить их активность (рисунок3.10 а и таблица 3.4). Зависимость относительной активности для нативного GOx показывает четко выраженный максимум (100%) при pH 6, тогда как при более высоких и более низких значениях рН относительная активность резко уменьшается. Для синтезированных биокатализаторов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GOx И относительная активность высока в диапазоне pH от 4 до 8 (рисунок 3.10 а и таблица 3.4). При pH 7 GOx на основе оксида алюминия показывает более низкую относительную активность (82%), чем GOx на основе оксида кремния (89%) (таблица 3.4). В случае магнитоотделяемых носителей, иммобилизованная GOx (образцы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GOx) при pH 7, демонстрирует более высокую относительную активность - 95 и 90% для указанных образцов соответственно (рис.3.10 а, табл. 3.4). Наилучшая относительная активность 95% при pH 6 и 7 наблюдалась для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx, тогда как нативный GOx при pH 7 показывает только 40%. Полученные результаты согласуются с данными литературы, т.к. известно, что иммобилизация GOx на гетерогенные носители обеспечивает высокую относительную активность в широком диапазоне рН [127, 132, 213].



Рисунок 3.10 - Влияние pH (а) и температуры (b) на относительную активность свободного и иммобилизованного GOx

pН	Относительная активность биокатализаторов, %						
				Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - SiO <sub>2</sub> -		
	GOx	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	SiO <sub>2</sub> -GOx	GOx	GOx		
4	20	71	75	79	82		
5	72	76	84	86	92		
6	100	79	88	89	95		
7	40	82	89	90	95		
7.5	38	79	85	87	91		
8	30	69	72	76	81		

Таблица 3.4 - Влияние pH на относительную активность нативного и иммобилизованного GOx на оксиды кремния и алюминия

3.1.5.2 Изучение влияние температуры на активность биокатализаторов\_на основе оксидов кремния и алюминия

Влияние температуры на окисление D-глюкозы изучалось в интервале от 30 до 60°С при рН 6 для лучшего сравнения с нативным GOx. Зависимость относительной активности биокатализаторов от температуры представлена на рисунке 3.10 b и в таблице 3.5. Нативный фермент проявляет максимальную активность при 40 ° C с последующим резким снижением выхода продукта, что указывает на потерю активности фермента, наиболее вероятную из-за денатурации при более высоких температурах [165]. В случае иммобилизованного GOx наблюдается более низкая относительная активность (на 5-18%) при 40 ° С (в зависимости от носителя) по сравнению с активностью нативного GOx. Это согласуется с данными литературы о снижении реактивности и подвижности GOx после иммобилизации [214]. С повышением температуры до 50 °С относительная активность значительно увеличивается (на 8-30%) для иммобилизованных катализаторов по сравнению с активностью нативного фермента. При 60°С (самая высокая температура, используемая для тестирования биокатализатора в этой работе), нативный фермент теряет около 60% каталитической активности, в то время как активность иммобилизованных катализаторов GOx снижается только на 4-18%, в зависимости от типа катализатора. Лучшие результаты были получены для биокатализатора Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx, который показал относительную активность 95% в температурном диапазоне от 35 до 50°C. Такая температурная стабилизация фермента согласуется с данными, полученными другими исследователями для иммобилизованного GOx, но превышает лучшие результаты, по крайней мере на 5% для диапазона температуры 45-50°C [132]. Таким образом, из всех синтезированных катализаторов, образец Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx показывает высокую относительная активность в достаточно широком для ферментов диапазоне pH и температуры.

T, ⁰C	Относительная активность биокатализаторов, %						
				Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - SiO <sub>2</sub> -		
	GOx	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	SiO <sub>2</sub> -GOx	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	GOx		
30	70	75	87	88	94		
35	93	78	88	89	95		
40	100	79	88	89	95		
45	93	82	90	93	95		
50	73	79	82	92	95		
60	39	67	74	84	91		

Таблица 3.5 - Влияние температуры реакции на относительную активность свободного и иммобилизованного на оксиды кремния и алюминия GOx

3.1.5.3 Определение кинетических параметров глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия

Константа Михаэлиса (*Km*) и максимальная скорость реакции (*Vmax*) являются наиболее важными кинетическими параметрами, позволяющими оценить эффективность фермента и основные характеристики иммобилизованного фермента. Более низкое значение *Km* соответствует более высокой аффинности между субстратом и ферментом, тогда как более высокое значение *Vmax* отражает более высокую скорость реакции. Отношение *Vmax/Km* позволяет сравнить каталитическую эффективность в каждой системе фермент-субстрат. Поскольку

здесь используется один субстрат (D-глюкоза), то оба значения характеризуют иммобилизованный GOx.

Для определения вышеуказанных параметров ферментативной реакции, были построены кинетические кривые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Для процесса, катализируемого ферментом, зависимость скорости реакции (v) от концентрации субстрата ([S]) получается из уравнения Михаэлиса-Ментен, основные параметры которого можно получить из уравнения Lineweaver-Burk согласно уравнению (3.1) [200]:

$$\frac{1}{\nu} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$
(3.1)

Графики Lineweaver-Burk были получены для свободного и иммобилизованного GOx, как показано на рисунке 3.11. Полученные результаты суммированы в таблице 3.6.



Рисунок 3.11 - Зависимость 1/Vmax от 1/S в реакции окисления D-глюкозы в присутствии нативного и иммобилизованного на мезопористые оксиды кремния и алюминия GOx

Таблица 3.6 - Кинетические параметры для окисления D-глюкозы в D-глюконовую кислоту, катализируемые нативным и иммобилизованным на оксиды кремния и алюминия GOx

Биокатализатор	<i>Кт</i> , мм	<i>Vmax</i> , мкМ / мин	$Vmax/Km \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>
GOx	78	173	2,2
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	140	43	0,3
SiO <sub>2</sub> -GOx	132	77	0.6
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	125	104	0.8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> -GOx	118	152	1,3

Для нативного GOx значение Km является самым низким, в то время как значения Vmax и Vmax/Km являются самыми высокими по сравнению с иммобилизованным GOx. Это указывает на более высокую активность нативного GOx, что согласуется с данными, обсуждаемыми в предыдущих разделах о влиянии pH и температуры. Среди синтезированных биокатализаторов с иммобилизованным GOx самое низкое значение Km и высокое Vmax наблюдаются для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx. Для объяснения высокой активности именно этого образца, было проведено изучение кислотных и основных центров на поверхности исходных (SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и магнитоотделяемых (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) носителей.

## 3.1.5.4 Влияние пористости и кислотности магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия на активность иммобилизованного фермента

Сравнение биокатализаторов на основе диоксида кремния и оксида алюминия (как магнитоотделяемых, так и исходных) показывает, что активность катализаторов на основе диоксида кремния всегда выше, чем у катализаторов на основе оксида алюминия. Более того, активность биокатализаторов на основе магнитоотделяемых носителей выше, чем у исходных. Известно, что размер пор влияет на каталитическую активность иммобилизованных ферментов [215, 216]. На рисунке 3.1 показано, что оксид кремния действительно содержит более крупные поры (рисунок 3.1 b) (некоторые из них могут вмещать GOx размером 7.6 нм) по сравнению с оксидом алюминия (рис.3.2 b). Это соответствует активности

80

биокатализаторов на основе оксидов кремния и алюминия, т.к. известно, что наличие более крупных пор способствует усилению ферментативного катализа [217, 218] Однако после образования МНЧ оксида железа в порах диоксида кремния и оксида алюминия размеры пор уменьшаются, а каталитическая активность увеличивается. Возможно, что другие факторы также могут быть ответственны за различия в каталитической активности.

Хильтерхаус и соавторы [219] показали, что присутствие кислотных центров Льюиса и Бренстеда на поверхности носителя может влиять на активность иммобилизованного фермента. Чтобы оценить кислотные и основные центры Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) использовалась DRIFT носителей,  $(SiO_2,$  $Al_2O_3$ , спектроскопия адсорбции дейтерированного ацетонитрила  $(CD_3CN)$ И дейтерированного хлороформа (CCl<sub>3</sub>D) соответственно. На рис. 3.12 приведены DRIFT спектры адсорбированного CD<sub>3</sub>CN при комнатной температуре. Для исходных оксида кремния и оксида алюминия адсорбция CD<sub>3</sub>CN приводит к ИКполосам низкой интенсивности при 2273 и 2118 см<sup>-1</sup> для первого и при 2318, 2259 и 2108 см<sup>-1</sup> для второго. Для магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия ИКполосы наблюдались при 2302, 2272 и 2115 см<sup>-1</sup> (для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>,) и при 2303, 2262 и 2110 см<sup>-1</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Полосы в диапазоне 2302-2318 см<sup>-1</sup> относятся к валентным колебаниям C≡N CD<sub>3</sub>CN, адсорбированного на Льюисовских кислотных центрах (ЛКЦ). Полоса 2259-2273 см<sup>-1</sup> относится к валентным колебаниям  $C \equiv N CD3CN$ , адсорбированного на бренстедовских кислотных центрах (БКЦ), тогда как полосы 2108-2118 см<sup>-1</sup> относятся к валентным колебаниям CD [220-222].



Рисунок 3.12 - DRIFT спектры адсорбированного CD<sub>3</sub>CN при 20 °C и 96

Topp 81 Голубой сдвиг частоты валентных колебаний С=N на ЛКЦ составляет 65 см<sup>-1</sup> (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 50 см<sup>-1</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и 49 см<sup>-1</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>) по сравнению с частотой в газовой фазе CD<sub>3</sub>CN (2253 см<sup>-1</sup>). Значение сдвига валентных колебаний C=N показывает наличие сильного ЛКЦ (координация ненасыщенных катионов Al<sup>3+</sup> и Fe<sup>3+</sup>). Силу ЛКЦ можно выразить следующим образом: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>> Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  $\approx$  Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>.

Исходный оксид кремния не содержит ЛКЦ. Очевидно, что сила ЛКЦ не оказывает влияния на активность биокатализаторов.

Голубой сдвиг частоты валентных колебаний С=N на БКЦ составляет 6 см<sup>-1</sup> (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 9 см<sup>-1</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 20 см<sup>-1</sup> (SiO<sub>2</sub>) и 19 см<sup>-1</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>). Значение сдвига колебаний С=N показывает наличие слабокислотного БКЦ (группы OH). На рис. 3.13 показаны ИК-спектры в области OH-группы, записанные при адсорбции CD<sub>3</sub>CN. Можно видеть, что CD<sub>3</sub>CN вызывает незначительные сдвиги в положениях полос OH-групп, зарегистрированных до и после адсорбции. Основываясь на смещении полосы валентного колебания OH, сила БКЦ может быть выражена следующим образом: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>> SiO<sub>2</sub>> Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>> Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Эта зависимость согласуется с различиями в каталитической активности GOx, иммобилизованной на исходных и магнитоотделяемых оксидах кремния и алюминия.



Рисунок 3.13 - DRIFT спектры OH-групп до (сплошной) и после (тире) адсорбции CD<sub>3</sub>CN

Спектры DRIFT дейтерированного хлороформа на исходных и магнитоотделяемых оксидах (рисунок 3.14) показывают, что основность носителя 82

не коррелирует с каталитической активностью биокатализатора. Основность кислородных центров можно определить по красному сдвигу колебаний растяжения связи C-D относительно частоты в газовой фазе CCl<sub>3</sub>D (2263 см<sup>-1</sup>). Больший сдвиг соответствует более сильному основному центру. Анионы кислорода как исходного, так и магнитоотделяемого оксидов кремния практически не взаимодействуют с хлороформом (наблюдается только физическая адсорбция), в то время как анионы кислорода как исходного, так и со связью О...D-C. Кислород исходного оксида алюминия является более основным (сдвиг 22 см<sup>-1</sup>) по сравнению с кислородом магнитоотделяемого оксида алюминия (сдвиг 16 см<sup>-1</sup>).



Рисунок 3.14 - DRIFT спектры адсорбированного CCl<sub>3</sub>D на исходных и магнитоотделяемых оксидах кремния и алюминия при 20 °C и 12.8 кПа

Таким образом, основываясь на данных DRIFTS, можно сделать вывод, что более высокая активность наблюдается, когда носитель содержит более сильный БКЦ, что можно объяснить облегчением окисления. Однако этот вывод не согласуется с более высокой активностью Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GOx, чем у SiO<sub>2</sub>-GOx (таблица 3.4 и 3.5). Несоответствие между DRFITS и кинетическими данными может быть объяснено присутствием МНЧ оксида железа [223, 224], которые усиливают активность иммобилизованной GOx, являясь сокатализаторами фермента [225].

3.1.5.5 Исследование стабильности биокатализаторов на основе оксидов кремния и алюминия

Для исследования стабильности магнитоотделяемых биокатализаторов при многократном использовании GO, было проведено десять последовательных экспериментов окисления D-глюкозы в оптимальных условиях (pH 6 и 40 °C). Биокатализатор отделялся от реакционного раствора с помощью редкоземельного магнита в течение 30-40 секунд после каждой каталитической реакции (рис. 3.15) и снова использовался в следующем эксперименте.



Рисунок 3.15 - Реакционный раствор с Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx до (а) и после (б) магнитного разделения

На рисунке 3.16 показано, что для биокатализаторов на основе оксидов алюминия и кремния относительная активность уменьшается на 30 и 24% соответственно, после десяти последовательных экспериментов, что согласуется с данными литературы [127,130]. Для биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов алюминия и кремния относительная активность уменьшается только на 13 и 11% соответственно, после того же количества последовательных реакций, демонстрируя гораздо более высокую стабильность катализатора. Для сравнения, в работе Янга и соавторов для GOx, иммобилизованном на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @ C- SiO<sub>2</sub>, потеря активности на 20% произошла уже после семи каталитических циклов [132].



Рисунок 3.16 - Стабильность иммобилизованного GOx в десяти циклах

Таким образом, впервые синтезированы магнитоотделяемые оксиды кремния и алюминия методом кристаллизации наночастиц магнетита *in-situ* в мезопорах оксидов. Проведена иммобилизация глюкозооксидазы за счет ковалентного связывания поверхности магнитоотделяемых Полученные на оксидов. использованием биокатализаторы были охарактеризованы полностью с комбинации физико-химических методов и протестированы в окислении Dглюкозы до D-глюконовой кислоты. Сравнение магнитоотделяемых и обычных биокатализаторов на основе оксидов кремния и алюминия показывает, что включение наночастиц магнетита в мезопоры носителя повышает каталитическую активность. В то же время биокатализаторы на основе диоксида кремния более активны, чем их аналоги на основе оксида алюминия. Оценка кинетических параметров реакции, Km и Vmax, а также их соотношения, показывает, что Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx имеет самое высокое сродство к субстрату и самую высокую скорость реакции по сравнению с другими катализаторами. Это может быть связано с большим размером пор в  $Fe_3O_4$ -SiO<sub>2</sub> по сравнению с  $Fe_3O_4$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, с более сильными катализирующими окисление. Кроме того, усиление каталитической БКЦ,

активности биокатализаторов на основе магнитноотделяемых носителей объясняется ферментоподобным свойством оксида железа.

Полученные результаты позволили предположить, что возможен синтез биокатализаторов путем иммобилизации глюкозооксидазы и на другие мезопористые носители, например, оксид циркония, который гораздо более устойчив к истиранию, чем оксиды кремния и алюминия.

3.2 Результаты физико-химического исследования магнитоотделяемых мезопористых оксидов циркония и биокатализаторов на их основе

Для синтеза мезопористого диоксида циркония использовался подход на основе темплатов путем получения реплики диоксида циркония из мезопористого диоксида кремния с использованием конденсации ZrOCl<sub>2</sub> × 8H<sub>2</sub>O. За этим последовало прокаливание при разных температурах (300 °C, 400 °C и 600 °C) для изменения структуры диоксида циркония. Наночастицы магнетита были сформированы в порах оксида циркония с использованием процедур, аналогичных для магнитоотделяемого диоксида кремния и оксида алюминия. Таким образом, были синтезированы три образца магнитоотделяемого носителя - оксида циркония: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- ZrO<sub>2</sub>-300, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600.

## 3.2.1 Данные низкотемпературной адсорбции азота

Измерения адсорбции жидкого азота были использованы для оценки пористости образцов исходного и магнитоотделяемого оксида. (Рисунок 3.17 и Таблица 3.7). Изотермы адсорбции-десорбции ZrO<sub>2</sub>-600 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (рис. 3.17) относятся к типу IV, что характерно для материалов, содержащих мезопоры [203]. Пористость носителей на основе оксида циркония зависит от температуры прокаливания (изменяется кристаллическая структура ZrO<sub>2</sub>) и уменьшается с ростом температуры. Для всех носителей пористость и диаметр пор (пример для пары ZrO<sub>2</sub>-600 / Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 представлен на рис. 3.17) уменьшаются после МНЧ, включения согласуется с данными, полученными что ДЛЯ магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия. Как показано в таблице 3.7,

86

площадь поверхности исходного носителя также уменьшается после синтеза наночастиц магнетита в порах.



Рис. 3.17 - Изотермы адсорбции-десорбции жидкого  $N_2$  (a, c) и распределение пор по размерам (b, d)  $ZrO_2$ -600 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- $ZrO_2$ -600

Таблица 3.7 - поверхности по БЭТ для носителей ZrO2 и Fe3O4-ZrO2

Носитель	ZrO <sub>2</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	ZrO <sub>2</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	ZrO <sub>2</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -
	300	ZrO <sub>2</sub> -300	400	ZrO <sub>2</sub> -400	600	ZrO <sub>2</sub> -600
Площадь	202	172	150	124	121	115
поверхности,						
$M^2/\Gamma$						

3.2.2 Данные просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции

На рисунке 3.18 показаны репрезентативные изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) ZrO<sub>2</sub>, полученного при 600°С, и магнитоотделяемого Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 на основе того же диоксида циркония. Оба изображения выглядят почти одинаково, потому что высокая электронная плотность ZrO<sub>2</sub> делает наночастицы оксида железа плохо видимыми. Несколько возможных маленьких НЧ оксида железа обозначены красными стрелками на вставке к рисунку 3.18 b. Примечательно, что все образцы ZrO<sub>2</sub>, полученные при разных температурах, выглядят одинаково и поэтому не показаны.



Рисунок 3.18 - Изображения ПЭМ ZrO<sub>2</sub>-600 (а) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (б)

Чтобы оценить распределение наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в ZrO<sub>2</sub>, было проведено картирование для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 с использованием сканирующей ПЭМ энергодисперсионной спектроскопии. На рисунке 3.19 показано, что карты Fe, Zr и O похожи по форме на изображение темного поля СПЭМ фрагмента Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600, что свидетельствует о равномерном распределении МНЧ в ZrO<sub>2</sub>. Суперпозиция карт Fe / Zr и Zr / Fe / O подтверждает этот вывод.



Рисунок 3.19 - СПЭМ изображение темного поля (a) и карты ЭДС Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 для Fe (b), Zr (c), O (d) и суперпозиции Fe и Zr (e) и Fe, Zr и O (f). Масштабная линейка составляет 100 нм

Для определения кристаллического строения исходного оксида циркония и наночастиц магнетита были использованы данные рентгеновской дифракции. На рисунке 3.20 представлены рентгенограммы ZrO<sub>2</sub>, приготовленного при разных температурах. В результате обработки при 300°С образуется аморфный ZrO<sub>2</sub> (рис. 3.20 а). Получение при 400°С (рис. 3.20 б), приводит в основном к тетрагональной структуре (t-ZrO<sub>2</sub>) [226]. Однако, различие между кубической и тетрагональной фазами затруднено, поскольку положения пиков перекрываются. [227]. Образец ZrO<sub>2</sub>, приготовленный при 600 °C (рис. 3.20 с), содержит отражения, относящиеся как к моноклинной (m-ZrO<sub>2</sub>, 62%), так и к t-ZrO<sub>2</sub> (или кубической, 38%) [228]. Рентгенограмма Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 (рисунок 3.20 d) выглядит очень похоже на рентгенограмму исходного образца ZrO<sub>2</sub>-400 (рисунок 3.20 b), отображая в основном t-ZrO<sub>2</sub>. Поскольку самые сильные отражения шпинели оксида железа перекрываются с отражениями t-ZrO<sub>2</sub>, была увеличена область 2  $\Theta$  между 47° и 63° (см. вставку на рис. 3.20 d), где имеет место наименьшее перекрытие. Очень слабое отражение при ~ 57° может быть связано со шпинелью, что указывает на то, что наночастицы оксида железа либо аморфны, либо очень малы.



Рисунок 3.20 - Рентгенограммы ZrO<sub>2</sub>-300 (a), ZrO<sub>2</sub>-400 (b), ZrO<sub>2</sub>-600 (c) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 (d)

## 3.2.3 Исследование магнитных свойств мезопористых носителей

Измерения намагниченности образцов проводились для всех магнитоотделяемого оксида циркония. Полученные кривые намагничивания исходных носителей представлены, как зависимость удельной намагниченности магнитных наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> от величины магнитного поля (рис 3.21). Измерения проводили при 25 и 40 °C (оптимальная температура для работы фермента). Результаты измерения, свидетельствуют о том, что исследованные образцы носителей являются 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. Анализ результатов показывает, что наиболее высокой намагниченностью (~2,2 эму/г) характеризуется образец Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400.



Рисунок 3.21 - Кривые гистерезиса (намагничивания и размагничивания) для магнитоотделяемых носителей на основе оксида циркония при 25 °C

Для МНЧ, синтезированных в матрице ZrO<sub>2</sub> при 600 и 300°C, намагниченность снижается и составляет ~ 2,0 и 1,8 эму/г, соответственно. При повышении температуры до 40 °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 (рис.3.22). Такое незначительное снижение не влияет на суперпарамагнитные свойства образцов.



Рисунок 3.22 - Кривые гистерезиса (намагничивания и размагничивания) для магнитоотделяемых носителей на основе оксида циркония при 40°С

Измерения намагниченности проводились и для биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов циркония. Для биокатализаторов получены результаты, аналогичные исходным носителям. Полученные данные позволяют сделать вывод, что модификация носителя и пришивка фермента GOx не оказывают влияния на магнитные свойства материала. Таким образом, разработан метод синтеза биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов циркония, которые можно легко отделять от реакционной среды с помощью магнита без использования сложной системы очистки, что очень важно для технологических процессов в промышленных масштабах.

3.2.4 Результаты рентгенофотоэлектронной спектроскопии

Для определения состава поверхности магнитоотделяемых оксидов циркония, а также степени окисления железа в МНЧ были проведены измерения методом РФЭС (на примере образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600). Для образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600, спектр РФЭС с высоким разрешением Zr 3d, представленный на рисунке 3.23 a,

демонстрирует два пика при 182,4 и 184,8 эВ, что согласуется со спектром немодифицированного ZrO<sub>2</sub>.



Рисунок 3.23 - а) HR XPS Zr 3d спектры для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600. Зеленая линия соответствует Zr 3d<sub>5/2</sub>, голубая - Zr 3d<sub>3/2</sub>. Красная кривая — это соответствие экспериментальных данных (черные точки). b) HR XPS Fe 2p-спектры дляFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600. Зеленая линия представляет компоненты Fe<sup>2+</sup>. Синий и лиловый цвета представляют октаэдральную и тетрагональную компоненты Fe<sup>3+</sup>, соответственно. Красная кривая — это соответствие экспериментальных данных (черные точки)

Спектр высокого разрешения Fe 2p Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO2-600 (рисунок 3.23 b) демонстрирует основной пик с энергией связи (Есв) 711,5 эВ, что типично для оксидов железа. Спектр может быть деконволюционирован в десять пиков, включая два пика для Fe<sup>2+</sup> при 709,91 и 723,36 эВ, четыре пика для октаэдрических (711,51 и 725,05 эВ) и тетраэдрических (713,51 и 727,01 эВ) компонентов Fe<sup>3+</sup> и четыре пика для сателлитов. Пик при  $\sim 715$  эВ принадлежит Fe<sup>2+</sup>, а сателлит при  $\sim$ 720 эВ является сверткой как октаэдрического, так и тетраэдрического Fe<sup>3+</sup>. Наличие этого сателлита указывает на присутствие Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> наряду с Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. [229] Стоит отметить, что для магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия образовывался исключительно магнетит, что указывает на то, что ZrO<sub>2</sub> способствует дальнейшему окислению Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> до γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, несмотря на идентичные атмосфера и присутствие этиленгликоля **VСЛОВИЯ** (инертная качестве В восстановителя). В таблицах 3.8 и 3.9 представлены параметры деконволюции.

93

Таблица 3.8 - Параметры деконволюции для РФЭС высокого разрешения Zr 3d Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600

Полоса	Есв, эВ	Расстояние	Полная	% Пиков	%	$\chi^2$
		от первого	ширина	Гаусса	площади	
		пика в	на		пика от	
		модели, эВ	половине		общей	
			высоты,		площади	
			эВ			
1	182.4	0.00	1.26	93	60.2	
2	184.8	2.37	1.32	97	39.8	3.95

Таблица 3.9 - Параметры деконволюции для РФЭС высокого разрешения Fe 2p Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600

Полоса	Есв, эВ	Расстояние	Полная	% Пиков	%	$\chi^2$
		от первого	ширина	Гаусса	площади	
		пика в	на		пика от	
		модели, эВ	половине		общей	
			высоты,		площади	
			эВ			
1	709.91	0.00	2.11	80	6.84	1.45
2	711.51	1.60	2.51	100	25.98	
3	713.51	3.60	2.41	89	8.89	
4	715.53	5.62	3.79	80	12.30	
5	720.01	10.10	4.40	95	11.62	
6	723.36	13.45	2.51	93	3.83	
7	725.01	15.10	2.91	85	15.04	
8	727.01	17.10	2.94	87	5.47	
9	729.21	19.30	4.47	100	5.47	
10	733.78	23.87	4.60	100	4.57	

3.2.5 Исследование каталитических свойств магнитоотделяемых биокатализаторов на основе GOx, иммобилизованной на оксидах циркония, в окислении D-глюкозы

Иммобилизацию макромолекул GOx на магнитоотделяемые оксиды циркония проводили в соответствии с методикой, представленной в главе 2 (аналогичная процедура использовалась для исходного ZrO<sub>2</sub>). Первоначально носитель модифицировали аминогруппами с использованием APTES, которые затем взаимодействовали со сшивающим агентом GA. Затем альдегидные группы GA реагировали с аминогруппами GOx, как представлено на схеме (рисунок 3.24).



Рисунок 3.24 - Схематическое изображение иммобилизации GOx на магнитоотделяемом оксиде циркония

Для определения количества иммобилизованного GOx на исходном и магнитоотделяемом носителях ZrO<sub>2</sub>, проверялась активность иммобилизованного GOx и активность супернатанта после отделения биокатализатора. Значения коэффициента иммобилизации (IC), рассчитанного по формуле (2.1)представлены в таблице 3.10. Полученные значения указывают, что IC в основном зависит от температуры кальцинирования ZrO<sub>2</sub>, причем самые высокие значения получены для ZrO<sub>2</sub>-600 (70%) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (76%), а самые низкие для ZrO<sub>2</sub>-300 (52%) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300 (55%). В то же время, различия между образцами, обработанными при 400°C и 600 °C (оба кристаллических носителя), являются незначительными. Кроме того, эффективность иммобилизации несколько выше для магнитоотделяемых образцов, что можно отнести к вкладу наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Аналогичное увеличение коэффициента иммобилизации наблюдалось для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> (70%) по сравнению с SiO<sub>2</sub> (65%).

Таблица 3.10 - Коэффициенты иммобилизации фермента на различных оксидах циркония

Биокатализатор	IC, %
ZrO <sub>2</sub> -300-GOx	52
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -300-GOx	55
ZrO <sub>2</sub> -400-GOx	68
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -400-GOx	70
ZrO <sub>2</sub> -600-GOx	70
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -600-GOx	76

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

3.2.5.1 Изучение влияние pH на активность биокатализаторов на основе оксида циркония

Как уже говорилось выше, значение pH является одним из решающих факторов в ферментативных реакциях, поскольку оно определяет ионизацию аминокислот в активном центре. Синтезированные биокатализаторы на основе оксидов циркония (ZrO<sub>2</sub>-300-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300-GOx, ZrO<sub>2</sub>-400-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400-GOx, ZrO<sub>2</sub>-600-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx) были протестированы в окислении D-глюкозы при варьировании pH в интервале 4-8. Активность биокатализатора выражали в виде относительной активности (формула 2.3), т.е. активности по сравнению с активностью нативного GOx в идентичных условиях. Полученные

96

данные представлены в таблице 3.11 и на рисунке 3.25 а. Зависимость активности нативной GOx от pH демонстрирует резкий максимум (100%) при pH 6 с сильным снижением относительной активности при более высоких и более низких pH. Для биокатализаторов на основе диоксида значениях циркония С иммобилизованным GOx значения относительной активности одинаковы при рН б и 7 и медленно уменьшаются с увеличением или уменьшением pH, что указывает на большую устойчивость к изменениям pH по сравнению с нативным GOx. Хорошо известно, что иммобилизация GOx приводит к сохранению относительной активности в широком диапазоне pH, что согласуется с нашими данными. Рисунок 3.25а также показывает, что температура прокаливания ZrO<sub>2</sub> влияет на каталитические свойства, хотя различия между образцами, обработанными при 400 и 600°С, незначительные. Кроме того, относительная активность образцов, содержащих Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, выше по сравнению с исходными образцами ZrO<sub>2</sub>, что указывает на стимулирующее влияние оксида железа, наиболее вероятно, из-за его ферментоподобной активности [230]. Однако для пары ZrO<sub>2</sub>-300-GOx и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300-GOx наблюдались незначительные различия. Наибольшая относительная активность 98% при рН 6 и 7 наблюдалась для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx.

Таблица 3.11 - Относительная активность нативного и иммобилизованного на оксиды циркония GOx при различных значениях pH

pН	Относительная активность биокатализатора, %						
					Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -
	Free	ZrO <sub>2</sub> -300-	ZrO <sub>2</sub> -400-	ZrO <sub>2</sub> -600-	ZrO <sub>2</sub> -	ZrO <sub>2</sub> -	ZrO <sub>2</sub> -
	GOx	GOx	GOx	GOx	300-GOx	400-GOx	600-GOx
4	20	42	63	65	48	65	72
5	72	71	75	79	74	80	81
6	100	78	83	88	80	94	98
7	40	79	86	90	80	94	98
7.5	38	72	80	86	75	85	90
8	30	56	64	73	64	72	75



Рисунок 3.25 - Влияние pH (а) и температуры (b) на относительную активность нативного и иммобилизованного GOx на оксиды циркония

## 3.2.5.2 Изучение влияние температуры на активность биокатализаторов на основе оксида циркония

Для температуры относительную оценки влияния на активность биокатализаторов температуру варьировали в диапазоне 30-70 °C при pH 6, что позволяет лучше проводить сравнение с нативным GOx. Данные, представленные на рис. 3.25 b и в таблице 3.12, показывают, что нативный GOx демонстрирует максимальную активность при 40°С, но активность резко снижается при более высоких температурах, скорее всего, из-за денатурации. Биокатализаторы с иммобилизованным GOx демонстрируют лучшую устойчивость к изменениям температуры. Однако, при 40 °С активность иммобилизованного фермента ниже, чем у нативного. Вероятно, это связано с потерей подвижности и реактивности изза связывания GOx с носителем [214]. Среди синтезированных биокатализаторов лучшие результаты были получены для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx с относительной активностью 98% при 40-45°С. При 50 °С относительная активность Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx составляет 91%, тогда как у нативного GOx – 73%. Такая температурная устойчивость GOx после иммобилизации согласуется с литературными данными, но превосходит лучшие примеры как минимум на 3-5% при 45-50°С [132].

Следовательно, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx проявляет высокую относительную активность в достаточно широком для ферментов диапазоне pH и температуры. Иммобилизация GOx обеспечивает окисление D-глюкозы в широком диапазоне pH и температур с высоким выходом продукта, что делает его полезным для промышленного производства и повышения устойчивости процесса.

Таблица 3.12 - Относительная активность свободного и иммобилизованного на оксиды циркония GOx при различной температуре

Τ,	Относительная активность биокатализатора, %						
°C					Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -
	Free	ZrO <sub>2</sub> -	ZrO <sub>2</sub> -400-	ZrO <sub>2</sub> -600-	ZrO <sub>2</sub> -	ZrO <sub>2</sub> -	ZrO <sub>2</sub> -
	GOx	300-GOx	GOx	GOx	300-GOx	400-GOx	600-GOx
30	70	68	73	76	71	75	82
35	93	74	80	83	76	88	91
40	100	78	83	88	80	94	98
45	93	79	86	90	80	94	98
50	73	70	78	81	72	87	91
60	39	58	63	69	61	73	76
70	15	42	45	52	50	52	55

3.2.5.3 Определение кинетических параметров глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемый оксид циркония

Для сравнительной характеристики биокатализаторов на основе магнитоотделяемых оксидов циркония были определены кинетические параметры: максимальная скорость реакции (*Vmax*) и константа Михаэлиса (*Km*). Так же как в случае биокатализаторов на основе оксидов кремния и алюминия, были построены зависимости скорости реакции (v) от концентрации субстрата ([S]). В таблице 3.13 представлены кинетические параметры окисления D-глюкозы в D-глюконовую кислоту, катализируемые нативным и иммобилизованным GOx.

Биокатализатор	<i>Кт</i> , мМ	<i>Vmax</i> , мкМ /	<i>Vmax/</i> Км · 10 <sup>3</sup> , мин <sup>-1</sup>
		МИН	
GOx	78	173	2,2
ZrO <sub>2</sub> -300-GOx	133	88	0.7
ZrO <sub>2</sub> -400-GOx	125	113	0.9
ZrO <sub>2</sub> -600-GOx	115	151	1,3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -300-GOx	124	104	0.8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -400-GOx	113	148	1,3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -600-GOx	105	164	1,6
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	140	43	0,3
SiO <sub>2</sub> -GOx	132	77	0.6
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -GOx	125	104	0.8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> -GOx	118	152	1,3

Таблица 3.13 - Кинетические параметры окисления D-глюкозы в D-глюконовую кислоту, катализируемые нативным и иммобилизованным GOx

Из представленных данных видно, что для нативного GOx Vmax и Vmax/Km являются самыми высокими, а значение Кт является самым низким, что коррелирует с его более высокой активностью по сравнению с иммобилизованным GOx (см. обсуждение влияния pH и температуры). Для иммобилизованного GOx уменьшение *Кт* и увеличение *Vmax* и *Vmax/Кт* с увеличением температуры кальцинирования  $ZrO_2$ наблюдается как лля исходных. так И ЛЛЯ магнитноотделяемых носителей ZrO<sub>2</sub>. Биокатализатор Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx показывает параметры *Km*, *Vmax* и *Vmax/Km*, значения которых наиболее близки к значениям нативного GOx, что согласуется с его лучшей каталитической активностью (98% от активности нативного фермента) среди иммобилизованных биокатализаторов GOx. Вероятно, что синергия между активностью GOx и присущей ферментоподобной активностью МНЧ способствует повышению эффективности биокатализатора. В этом случае МНЧ ведут себя как сокатализатор для фермента [223 - 224].

Сравнение кинетических параметров для биокатализаторов на основе оксидов кремния алюминия и циркония (таблица 3.13), свидетельствует, что

значения *Km*, *Vmax* и *Vmax/Km* отличаются незначительно. Во всех случаях. для магнитоотделяемых биокатализаторов значение *Km* меньше, а *Vmax* и *Vmax/Km* больше по сравнению с GOx, иммобилизованном на обычные оксиды. Наиболее близкие к нативному ферменту значения кинетических параметров проявляет биокатализатор на основе оксида циркония кристаллической структуры - Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- ZrO<sub>2</sub>-600-GOx.

3.2.5.4 Влияние пористости и кислотности магнитоотделяемых оксидов циркония на активность иммобилизованного фермента

Как уже обсуждалось выше, включение наночастиц магнетита в мезопоры оксида циркония способствует увеличению относительной активности иммобилизованного GOx, наиболее вероятно, собственной из-за ИХ ферментоподобной активности [230]. В то же время, различия в активности биокатализаторов на основе исходного и магнитоотделяемого оксида циркония требуют объяснения. Текстурные свойства носителей могут влиять как на иммобилизацию фермента, так и на его активность. Однако данные по адсорбциидесорбции жидкого азота, представленные на рисунке 3.17 и в таблице 3.7, показывают, что изменения площади поверхности ВЕТ и диаметра пор не соответствуют данным о степени иммобилизации и относительной активности фермента (рисунке 3.25 и таблицы 3.10). Действительно, самые высокие площади поверхности наблюдаются для носителя, обработанного при 300°C, в то время как после иммобилизации GOx эти биокатализаторы проявляют самую низкую каталитическую активность. Примечательно, что диаметры пор для ZrO<sub>2</sub>-600 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 составляют  $\sim$  6 и 4,5 нм соответственно (рис. 3.17 b, d), что ниже гидродинамического диаметра GOx 7,6 нм. Вероятно, это приводит к тому, что макромолекулы GOx, располагаются не в порах, а на поверхности носителя, что обеспечивает большую подвижность молекулы фермента.

Другим возможным фактором, влияющим на активность иммобилизованного фермента, является кислотность или основность носителя. На примере оксидов кремния и алюминия (глава 3.1) было показано, что кислотные центры Льюиса (ЛКЦ) и Бренстеда (БКЦ) на поверхности носителя влияют на активность

101

иммобилизованных ферментов. Чтобы оценить кислотность и основность исходных и магнитоотделяемых оксидов циркония, использовали DRIFTS для адсорбции дейтерированных ацетонитрила (CD<sub>3</sub>CN) и хлороформа (CCl<sub>3</sub>D). Исследованы две серии образцов носителей:  $ZrO_2$ -300,  $ZrO_2$ -400,  $ZrO_2$ -600, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- $ZrO_2$ -300, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- $ZrO_2$ -400, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- $ZrO_2$ -600. На рисунке 3.26 представлены DRIFT-CD<sub>3</sub>CN спектры, зарегистрированные в процессе адсорбции-десорбции дейтерированного ацетонитрила на  $ZrO_2$ -400 and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- $ZrO_2$ -400.

В спектре образца ZrO<sub>2</sub>-400 в присутствии адсорбата CD<sub>3</sub>CN видны две полосы C=N валентных колебаний при 2300 и 2264 см<sup>-1</sup>. Полоса при 2113 см<sup>-1</sup> в спектрах принадлежит C-D валентным колебаниям. Малоинтенсивная полоса C=N валентных колебаний при 2300 см<sup>-1</sup> может быть отнесена к ацетонитрилу, адсорбированному на сильном ЛКЦ. Голубой сдвиг частоты колебаний C=N составляет 47 см<sup>-1</sup> по сравнению с таковым в газовой фазе (2253 см<sup>-1</sup>). Эта полоса исчезает из спектра при десорбции в вакууме при 100 °C. Полоса C=N при 2264 см<sup>-1</sup>, которая смещается к 2271 см<sup>-1</sup> при вакуумировании, может быть отнесена к ацетонитрилу, адсорбированному на БКЦ. Голубой сдвиг частоты этой полосы при адсорбции составляет 11-18 см<sup>-1</sup>.



Рисунок 3.26 - DRIFT-CD<sub>3</sub>CN спектры на ZrO<sub>2</sub>-400 (a) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 (b)

Для образца ZrO<sub>2</sub>-300 (рис.3.27 b) спектры адсорбции CD<sub>3</sub>CN полностью идентичны спектрам адсорбции ZrO<sub>2</sub>-400, в то время как для ZrO<sub>2</sub>-600 спектры DRIFT-CD<sub>3</sub>CN очень похожи, но имеют более низкую интенсивность (рис.3.27 а).



Рисунок 3.27 - DRIFT-CD<sub>3</sub>CN спектры на ZrO<sub>2</sub>-600 (a) and ZrO<sub>2</sub>-300 (b)

Необходимо отметить, что для исходных образцов ZrO<sub>2</sub>, концентрация ЛКЦ (координация ненасыщенных Zr<sup>+4</sup>) невелика при той же силе ЛКЦ (рисунок 3.28).



Рисунок 3.28 - DRIFT спектры адсорбированного CD<sub>3</sub>CN на исходных оксидах циркония при 20 °C и 12.8 кПа(IO – Оксид железа (II, III) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>))

Для всех образцов магнитоотделяемого оксида циркония DRIFT спектры адсорбированного CD<sub>3</sub>CN различны. Спектр Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 (рис. 3.26 b) показывает одну полосу колебания С≡N при 2262 см<sup>-1</sup>. Полоса С≡N показывает голубой сдвиг частоты на 9 см<sup>-1</sup> по сравнению с газовой фазой. Для образца Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300 полоса C≡N при 2263 см<sup>-1</sup> (переход в положение 2271 см<sup>-1</sup> при вакуумировании) демонстрирует несколько больший голубой сдвиг частоты на 10-18 см<sup>-1</sup> по сравнению с газовой фазой (рис. 3.29 а). В случае Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 в спектрах адсорбции CD<sub>3</sub>CN имеются две полосы C≡N при 2290 и 2261 см<sup>-1</sup> (Рис. 3.29 b). Малоинтенсивная полоса при 2290 см<sup>-1</sup> относится к  $CD_3CN$ , адсорбированному на Льюисовских кислотных центрах средней силы (координированных ненасыщенных катионов Zr<sup>4+</sup> и/или Fe<sup>3+</sup>) (рис. 3.30). Голубой сдвиг частоты валентных колебаний по сравнению с газовой фазой составляет 37 см<sup>-1</sup>. Полоса С≡N при 2261 см<sup>-1</sup> может быть отнесена к ацетонитрилу, адсорбированному на Бренстедовских кислотных центрах ZrO<sub>2</sub> с голубым частотным сдвигом 8 см<sup>-1</sup>.



Рисунок 3.29 - DRIFT спектры адсорбции – десорбции CD<sub>3</sub>CN на Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>- 300 (а) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (b)



Рисунок 3.30 - DRIFT спектры адсорбированного CD<sub>3</sub>CN на магнитоотделяемых оксидах циркония при 20 °C и 12.8 кПа (IO – Оксид железа (II, III) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>))

Однако, чтобы сделать правильные выводы, необходимо оценить положение ОН-группы. На рис. 3.31 представлены ИК-спектры диффузного отражения в районе OH-групп на исходных и магнитоотделяемых образцах ZrO<sub>2</sub> после вакуумной обработки. На рис. 3.31 (а) показана одна интенсивная полоса при 3733 см<sup>-1</sup> для всех образцов и слабая широкая полоса при 3500 см<sup>-1</sup> для ZrO<sub>2</sub>-300 и ZrO<sub>2</sub>-400. Полоса при 3733 см<sup>-1</sup> относится к изолированным ОН-группам, в то время как полоса 3500 см<sup>-1</sup> характерна для водородных связей ОН-групп. Обе полосы характерны для БКЦ и идентичны для ZrO<sub>2</sub>-300 и ZrO<sub>2</sub>-400. DRIFT спектры магнитоотделяемых оксидов циркония (рис. 3.31 b) малоинтенсивные из-за почти черного цвета магнетита. Спектр Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300 содержит широкую полосу с приблизительным максимумом при 3715 см<sup>-1</sup> и плечом при 3674 см<sup>-1</sup>. Спектр Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO2-400 содержит одну широкую полосу с максимумом при 3721 см<sup>-1</sup>, в то время как спектр Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO2-600 содержит плечо при 3732 см<sup>-1</sup> и широкую полосу при 3669 см<sup>-1</sup>. По литературным данным [231], полосы в диапазоне 3715-3731 см<sup>-1</sup> относятся к изолированным ОН-группам, а полосы в диапазоне 3669-3674 см<sup>-1</sup> характерны для водородных связей ОН-групп.



Рис. 3.31 - DRIFT спектры OH-групп для исходных (а) и магнитотделяемых (b) оксидов циркония (IO – Оксид железа (II, III) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>))

О силе БКЦ можно судить по сдвигу полос ОН-групп. На рисунке 3.32 представлено сравнение спектров ОН-групп, зарегистрированных до и после адсорбции дейтерированного ацетонитрила на исходных (рис.3.32 а) и магнитоотделяемых (рис.3.32 b) оксидах циркония.


Рисунок 3.32 - DRIFT спектры до и после адсорбции CD<sub>3</sub>CN для исходных (а) и магнитотделяемых (b) оксидов циркония (IO – Оксид железа (II, III) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>))

На рис. 3.33 представлены спектры, полученные при вычитании спектров до адсорбции из спектров после адсорбции. Из приведенных данных, можно достаточно точно подсчитать сдвиг БКЦ при адсорбции CD<sub>3</sub>CN. Для образцов ZrO<sub>2</sub>-300 и ZrO<sub>2</sub>-400 сдвиг составляет 167 см<sup>-1</sup> (3733-3566), а для ZrO<sub>2</sub>-600 эта величина будет намного меньше 66 см<sup>-1</sup> (3733-3667). Таким образом, можно заключить, что сила БКЦ на поверхности ZrO<sub>2</sub>-300 и ZrO<sub>2</sub>-400 больше, чем на ZrO<sub>2</sub>-600. При этом необходимо отметить, что на всех изученных образцах ZrO<sub>2</sub> БКЦ обладают средней силой. Кроме того, можно отметить, что протоны OH-групп

обладают подвижностью и способны обменивать протон на дейтерий. Появление OD-групп можно видеть на Рис. 3.32 в районе 2600 см<sup>-1</sup>. На рис.3.33 (b) показано, что для магнитных носителей сдвиг положения OH-группы при адсорбции CD<sub>3</sub>CN наблюдается только для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300.



Рисунок 3.33 - Спектры, полученные при вычитании спектров до адсорбции из спектров после адсорбции для исходных (а) и магнитотделяемых (b) оксидов циркония (IO – Оксид железа (II, III) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>))

Учитывая, что сдвиг положения OH-группы при адсорбции CD<sub>3</sub>CN (индикатор БКЦ) наблюдается только для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300, обе полосы при 2262 и 2261 см<sup>-1</sup> в DRIFT спектрах Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 (рис. 3.27 b) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 (рис. 3.31 b) следует отнести к слабым ЛКЦ, а не к БКЦ. Таким образом, все исходные оксиды циркония содержат участки ЛКЦ и БКЦ кислот. Включение наночастиц магнетита в ZrO<sub>2</sub> приводит к снижению кислотности ЛКЦ для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 и полной ее потере для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 (рис. 3.30). Кроме того, это приводит к потере кислотности БКЦ для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400, а также к ее сильному снижению для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300.

Для оценки основности кислорода носителя, проведено сравнение DRIFT спектров с использованием адсорбции CCl<sub>3</sub>D в качестве тестовой молекулы, поскольку дейтерированный хлороформ может взаимодействовать как с Zr-OH, так и с Zr-O-Zr (на поверхности ZrO<sub>2</sub>) через водородно-дейтериевую связь. Основность определяется красным смещением колебаний растяжения C-D по сравнению с таковым в газовой фазе (2263 см<sup>-1</sup>). Больший сдвиг указывает на более высокую основность кислорода. На рис. 3.34 а показано, что кислород Zr-O-Zr в ZrO<sub>2</sub>-300 и ZrO<sub>2</sub>-400 проявляет несколько более высокую основность, чем у ZrO<sub>2</sub>-600 со сдвигами 12 см<sup>-1</sup> и 9 см<sup>-1</sup> соответственно. В случае Zr-OH-групп, взаимодействие с CCl<sub>3</sub>D определяется через смещение полосы OH-групп.



Рисунок 3.34 - DRIFT спектры адсорбированного CCl<sub>3</sub>D на исходных (а) и магнитоотделяемых (b) оксидах циркония при 20 °C и 18.7

На рисунке 3.35 показано, что кислород ОН-группы обладает одинаковой основностью для всех исходных образцов ZrO<sub>2</sub>. Для всех магнитоотделяемых носителей сдвиг колебаний растяжения C-D для Zr-O-Zr одинаков (15 см<sup>-1</sup>) (Рис. 3.34 b), в то же время для кислорода ОН-групп взаимодействие отсутствует (рис. 3.36). Таким образом, включение наночастиц магнетита приводит к увеличению основности структуры Zr-O-Zr и отсутствию основности ОН-группы.



Рисунок 3.35 - DRIFT спектры, полученные до и после адсорбции CCl<sub>3</sub>D (а) и при вычитании спектров до адсорбции из спектров после адсорбции для исходных оксидов циркония (b)



Рисунок 3.36 - DRIFT спектры, полученные до и после адсорбции CCl<sub>3</sub>D (a) и при вычитании спектров до адсорбции из спектров после адсорбции для магнитоотделяемых оксидов циркония (b) (IO – Оксид железа (II, III) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>))

Чтобы лучше понять взаимосвязь между свойствами биокатализатора и силой ЛКЦ и БКЦ, сдвиги полосы DRIFTS суммированы в таблице 3.14. Кислотность и основность БКЦ не меняются при включении МНЧ в ZrO<sub>2</sub>-300, при этом кислотность ЛКЦ исчезает. Учитывая, что каталитическая активность ZrO<sub>2</sub>-300 и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300 практически одинаковы, корреляции между ЛКЦ и каталитическими характеристиками нет, в то время как значения кислотности и

основности БКЦ согласуются с относительными активностями для пары ZrO<sub>2</sub>-300-GOx / Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-300-GOx. Аналогичная корреляция наблюдается для пар ZrO<sub>2</sub>-400 / Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-400 и ZrO<sub>2</sub>-600 / Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600, где снижение кислотности БКЦ согласуется с увеличением каталитической активности для магнитоотделяемых носителей. Таким образом, можно предположить, что для носителей на основе ZrO<sub>2</sub> кислотность отрицательно влияет на каталитические характеристики GOx.

Таблица 3.14 - Сдвиг полосы DRIFTS, соответствующие группам CN и OH, для носителей на основе ZrO<sub>2</sub>

Носитель	ЛКЦ	БКЦ	БКЦ
	Сдвиг CN, см <sup>-1</sup>	Сдвиг CN, см <sup>-1</sup>	Сдвиг ОН, см-1
ZrO <sub>2</sub> -300	47	11-18	167
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -300	-	10-18	172
ZrO <sub>2</sub> -400	47	11-18	167
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -400	-	9	-
ZrO <sub>2</sub> -600	47	11-18	66
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ZrO <sub>2</sub> -600	37	8	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> *	49	19	156

\*Раздел 3.1

С другой стороны, значения кислотности Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>, представленные в разделе 3.1, значительно выше, чем кислотность Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600, и очень близки к кислотности ZrO<sub>2</sub>-300, тогда как относительная каталитическая активность Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx (95%) в тех же условиях значительно выше, чем у ZrO<sub>2</sub>-300-GOx (78%). Из этого следует, что ни кислотность, ни основность не являются ключевым фактором при определении активности биокатализатора. Можно предположить, что различия относительной активности в биокатализаторах на исходных и магнитоотделяемых оксидах циркония (таблицы 3.11 и 3.12) объясняются кристаллическим порядком поверхности ZrO<sub>2</sub> по сравнению с ее аморфным характером. Действительно, поверхность t-ZrO<sub>2</sub> (полученного при 400 °C) или смешанного t-ZrO<sub>2</sub>/m-ZrO<sub>2</sub> (полученного при 600°C) может лучше подходить для

сохранения нативной конформации GOx при иммобилизации, чем неупорядоченная поверхность аморфного ZrO<sub>2</sub> (полученного при 300 °C).

3.2.5.5 Исследование стабильности биокатализаторов на основе оксидов циркония

Для оценки возможности повторного использования биокатализаторов при многократном использовании,  $ZrO_2$ -600-GOx и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx были протестированы в десяти последовательных экспериментах при pH 6 и температуре 40°C. После каждой каталитической реакции  $ZrO_2$ -600-GOx отделяли с помощью центрифугирования, а Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx редкоземельным магнитом (в течение 60 с) и использовали в следующем эксперименте. Полученные результаты представлены на рисунке 3.37.



Рисунок 3.37 - Относительная активность иммобилизованного GOx при повторном использовании

Рисунок 3.37 демонстрирует, что относительная активность ZrO<sub>2</sub>-600-GOx уменьшается на 14% после десяти последовательных экспериментов, в то время как для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO2-600-GOx снижение относительной активности составляет всего 7%. Для биокатализаторов на основе оксидов кремния и алюминия (раздел 3.1.5.5) относительная активность снизилась на 24 и 30% соответственно. Для магнитоотделяемых оксидов кремния и алюминия снижение составило 11 и 13%

соответственно после десяти последовательных реакций. Это доказывает возможность повторного использования биокатализаторов на основе ZrO<sub>2</sub>. Стоит что не наблюдалось истирания катализатора после отметить, десяти последовательных реакций с ZrO<sub>2</sub>-600-GOx или  $Fe_3O_4$ - $ZrO_2$ -600-GOx. Это более объясняется высокой устойчивостью к истиранию  $ZrO_2$ [232]. Биокатализаторы, содержащие МНЧ, обладают большей стабильностью, что объясняется стабилизирующим/активирующим влиянием оксида железа как усилителя ферментативной активности. Также не исключено, что присутствие МНЧ в порах ZrO<sub>2</sub> оказывает стабилизирующее влияние на конформацию макромолекулы GOx, дополнительно улучшая возможность повторного использования.

Чтобы проверить долговременную инкубационную (функциональную) стабильность нативного GOx,  $ZrO_2$ -600-GOx и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- $ZrO_2$ -600-GOx, образцы инкубировали при 50 ° C в течение 120 часов. Зависимость относительной активности от времени представлена на рисунке 3.38.



Рисунок 3.38 - Долгосрочная инкубационная стабильность при 50°С.

Как показано на рисунке 3.38, нативный GOx потерял более 94% своей ферментативной активности всего через 6 часов, в то время как Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx и ZrO<sub>2</sub>-600-GOx сохранили 82% и 74% относительной активности соответственно. После 120 ч инкубации Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx показал 31%

относительной активности по сравнению с полной потерей активности нативного GOx. Аналогичные результаты были получены при 37°C. Сравнение с литературными данными показывает, что при 50° стабильность Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx значительно превышает таковую, продемонстрированную для ферментов, иммобилизованных на покрытых ДНК МНЧ. [233,234].

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

- 1. Для биокатализаторов на основе иммобилизованной глюкозооксидазы синтезированы гетерогенные носители, а именно мезопористые оксиды циркония с использованием в качестве жесткого шаблона мезопористого оксида кремния с размером пор 6 нм. При варьировании температуры прокаливания получены разные структуры: аморфная (при 300°С), тетрагональная (t-ZrO2, при 400°С), моноклинная (m-ZrO2, 62%) и t-ZrO2 (38%) при 600°С.
- 2. Подобраны оптимальные условия *in-situ* кристаллизации наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в мезопорах оксидов кремния, алюминия и циркония и получены магнитоотделяемые носители по следующей схеме: пропитка мезопористого оксида этанольным раствором нитрата железа (III) в течение 12 часов сушка под вакуумом в течение 2 часов, восстановление этиленгликолем, отжиг под аргоном при 250 °C в течение 6 часов.
- 3. Синтезированы новые биокатализаторы путем ковалентного связывания глюкозооксидазы с исходными и магнитоотделяемыми мезопристыми оксидами кремния, алюминия и циркония. Предварительно поверхность носителя функционализировали аминогруппами при помощи 3аминопропилтритоксисилана. В качестве сшивающего агента был выбран глутаровый альдегид.
- 4. Исследование методом низкотемпературной адсорбции азота для оксидов кремния, алюминия и циркония показало, что они относятся к мезопористым материалам с размером пор 4-8 нм. Данные просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции показали, что наночастицы магнетита формируются в порах (размер 4-8 нм) и в стыках пор (размер 12-13 нм). Кривые намагничивания подтверждают, что полученные наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, независимо от природы оксида, обладают суперпарамагнитными свойствами.
- 5. ИК-Фурье спектроскопия с диффузным отражением показала для оксидов кремния и алюминия, что сила Бренстедовских кислотных центров коррелирует

с активностью глюкозооксидазы, иммобилизованной на исходных и магнитоотделяемых оксидах кремния и алюминия.

- 6. Для магнитоотделяемых биокатализаторов, выявлено, что включение наночастиц магнетита увеличивает относительную активность на 7-10%, что связано с корреляцией между активностью глюкозооксидазы и ферментоподобной активностью Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.
- 7. Магнитоотделяемые биокатализаторы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-GOx, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Gox, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx в процессе окисления D-глюкозы показали соответственно 95%, 93% и 98% активности нативного фермента. Рассчитаны кинетические параметры и показано, что наибольшее сродство субстрата и фермента наблюдается для биокатализатора Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx.
- 8. Изучена стабильность глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитоотделяемые мезопористые оксиды, в процессе окисления D-глюкозы до **D**-глюконовой кислоты. В десяти последовательных циклах лучший магнитоотделяемый биокатализатор Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ZrO<sub>2</sub>-600-GOx теряет не более 7% своей активности, что объясняется высокой устойчивостью к истиранию ZrO<sub>2</sub>. Высокая ферментативная активность биокатализаторов в широком диапазоне рН и температуры делает их перспективными для практического применения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Zdarta, J. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility /J. Zdarta, S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo // Catalysts. – 2018.- Vol. 8. – P. 92.

2. Cowan, D.A. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes bychemical modification and immobilization / D.A. Cowan, R. Fernandez-Lafuente // Enzyme Microb. Technol.- 2011.-Vol. 49.- P.326–346.

3. Wohlgemuth, R. Biocatalysis - Key to sustainable industrial chemistry / R. Wohlgemuth // Curr. Opin. Biotechnol. – 2010. – Vol. 21. – P.713–724.

4. Jesionowski, T. Enzymes immobilization by adsorption: A review / T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska // Adsorption. – 2014. – Vol. 20. – P. 801–821.

Zhang, Y. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes / Y.
 Zhang, J. Ge, Z. Liu // ACS Catal. – 2015. – Vol. 5. – P. 4503–4513.

 Marzadori, C. Immobilization of jack bean urease on hydroxyapatite: Ureaseimmobilization on alkaline soils / C. Marzadori, S. Miletti, C. Gessa, S. Ciurli // S. Soil Biol. Biochem. – 1998. – Vol. 30. – P. 1485–1490.

7. Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lafuente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of activity, stability and selectivity via immobilization techniques /C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lafuente, J.M Guisan, R. Fernandez-Lafuente // Enzyme Microb. Technol.- 2007. – Vol. 40. – P.1451–1463.

Sheldon, R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance / R.A.
 Sheldon // Adv. Synth. Catal.- 2007. – Vol. 49. – P. 1289–1307.

 Guzik, U. Immobilization as a strategy for improving enzymeproperties -Application to oxidoreductases / U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszynska // Molecules. – 2014. – Vol. 19. – P. 8995–9018.

10. Sheldon, R.A.; van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how? / R.A. Sheldon, S. van Pelt // Chem. Soc. Rev. – 2013.-Vol. 42. – P. 6223–6235.

11. Rodrigues, R.C. Coupling chemical modification andimmobilization to improve the catalytic performance of enzymes / R.C. Rodrigues, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente // Adv. Synth. Catal. - 2011. – Vol. 353. – P. 2216–2238.

12. Cao, L. Carrier-Bound Immobilized Enzymes / L.Cao // Wiley-VCH: Weinheim, Germany. - 2005. – Vol.3. – P. 1092-1095

Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation / R. Fernandez-Lafuente // Enzyme Microb. Technol. – 2009.- Vol. 45. – P. 405–418.

Wong, L.S. Selective covalent protein immobilization: Strategies and applications
 /L.S. Wong, F. Khan, J. Micklefield //Chem. Rev. – 2009. Vol. 109. – P. 4025–4053.

15. Muhammad, B. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design / B. Muhammad, A. Muhammad, C. Hairong, Y. Yunjun, M. Hafiz, N. Iqbal // Critical reviews in biotechnology. – 2019. - Vol. 39. - No. 2. – P. 202–219.

 Asgher, M. al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology / M. Asgher, M. Shahid, S. Kamal // J Mol Catal B: Enzym. – 2014. – Vol. 101. – P. 56–66.

17. Amin, F. Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase / F. Amin, H. Bhatti, M. Bilal // Int J Biol Macromol. – 2017. – Vol. 95. – P. 974–984.

18. Bilal, M. Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants–a review / M. Bilal, M. Asgher, R. Parra-Saldivar // Sci Total Environ. – 2017. – Vol. 576. – P. 646–659.

19. Rehman, S. Improved catalytic properties of Penicillium notatum lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films / S. Rehman, H. Bhatti // Int J Biol Macromol. – 2017. – Vol. 97. – P. 279–286.

20. Bilal, M. State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: a review from immobilization to implementation view point / M. Bilal, H. Iqbal, G. Shuqi // Int J Biol Macromol. – 2018. – Vol. 108. – P. 893–901.

21. Bilal, M. Peroxidase sassisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes / M. Bilal, T. Rasheed, H. Iqbal // Sci Total Environ. -2018. - Vol. 644. - P. 1–13.

22. Bilal, M. Smart chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials / M. Bilal, T. Rasheed, Y. Zhao // Int J Biol Macromol. – 2018. – Vol. 119. – P. 278–290.

23. Tsutsumi, M. Site-directed mutation at residues near the catalytic site of histamine dehydrogenase from Nocardioides simplex and its effects on substrate inhibition. / M. Tsutsumi, N. Tsuse, N. Fujieda // J. Biochem. – 2010. - Vol. 147. – P. 257–264.

Kumar, A. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications /
A. Kumar, S. Singh // Crit Rev Biotechnol. – 2013. – Vol. 33. – P. 365–378.

Kumar, L. Awasthi G. Singh B. Extremophiles: a novel source of industrially important enzymes / L. Kumar, G. Awasthi, B. Singh // Biotechnology. -2011. – Vol. 10. – P. 121–135.

26. Sheldon, R. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance / R. Sheldon //Adv Synth Catal. – 2007. – Vol. 349. – P. 1289–1307.

27. Hanefeld, U. Understanding enzyme immobilization / U. Hanefeld, L. Gardossi, E.
Magner // Chem Soc Rev. – 2009. – Vol. 3. – P. 453–468.

28. Tran, D. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes / D. Tran,
KJ. Balkus // ACS Catal. - 2011. - Vol. 1. - P. 956–968.

29. Mateo, C. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C. Mateo, JM. Palomo, G. Fernandez-Lorente // Enzyme Microb Technol. – 2007. – Vol. 40. – P. 1451–1463.

30. Iyer, PV. Enzyme stability and stabilization— aqueous and non-aqueous environment / PV. Iyer, L. Ananthanarayan // Process Biochem. – 2008. – Vol. 43. – P. 1019–1032.

Liese, A. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications / A.
 Liese, L. Hilterhaus // Chem Soc Rev. – 2013. – Vol. – 42. – P. 6236–6249.

32. Hartmann, M. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends / M. Hartmann, D. Jung // J Mater Chemi. – 2010. – Vol. 20. – P. 844–857.

Santos, J. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes / J. Santos, O. Barbosa, C. Ortiz // ChemCatChem. - 2015. – Vol. 7. – P. 2413–2432.

34. Sheldon, RA. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how / RA. Sheldon, S. van Pelt // Chem Soc Rev. – 2013. Vol. 42. – P. 6223–6235.

Cao, L. Immobilised enzymes: science or art? / L. Cao // Curropin Chem Biol. –
 2005. – Vol. 9. - P. 217–226.

Jesionowski, T. Enzyme immobilization by adsorption: a review / T. Jesionowski,
J. Zdarta, B. Krajewska // Adsorption. – 2014. – Vol. 20. – P. 801–821.

37. Hernandez, K. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance / K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente // Enzyme Microb Technol. – 2011. -Vol. 48. – P. 107–122.

Barbosa, O. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties / O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz // Biomacromolecules. – 2013. – Vol. 14. – P. 2433–2462.

39. Santos, JCD. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment / JCD. Santos, N. Rueda, O. Barbosa // Application to chymotrypsin. RSC Adv. - 2015. – Vol. 5. – P. 20639–20649.

40. Cha, T. Enzymatic activity on a chip: the critical role of protein orientation / T. Cha, A. Guo, XY. Zhu // Proteomics. – 2005. Vol. 5. – P. 416–419.

41. Seong, SY. Current status of protein chip development in terms of fabrication and application / SY. Seong, CY. Choi // Proteomics. – 2003. – Vol. 3. – P. 2176–2189.

42. Camarero, JA. Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports / JA. Camarero // Pept. Sci. - 2008. – Vol. 90. – P. 450–458.

43. Peluso, P. Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays / P. Peluso, DS. Wilson, D. Do // Anal Biochem. -2003. –Vol. 312. – P. 113–124.

44. Soellner, MB. Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation / MB. Soellner, KA. Dickson, BL. Nilsson // J Am Chem Soc. – 2003. – Vol. 125. – P. 11790–11791.

45. Butterfield, DA. Catalytic biofunctional membranes containing sitespecifically immobilized enzyme arrays: a review / DA. Butterfield, D. Bhattacharyya, S. Daunert // J Membr Sci. - 2001. – Vol. 181. – P. 29–37.

46. Srere, PA. Functional groups on enzymessuitable for binding to matrices. Meth Enzymol / PA. Srere, K. Uyeda // Academic Press. – 197. – Vol. 44. – P. 11–19.

47. Brady, D. Advances in enzyme immobilization / D. Brady, J. Jordaan // Biotechnol Lett. – 2009. – Vol. 31. – P. 1639.

48. Zucca, P. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms / P. Zucca, E. Sanjust // Molecules. – 2014. – Vol. 19. – P. 14139–14194.

49. Hwang, ET. Gu MB. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials /
ET. Hwang, MB. Gueng // Life Sci. – 2013. – Vol. 13. - P. 49–61.

50. Guisan, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilizationstabilization of enzymes / J. Guisan // Enzyme Microb Technol. – 1988. – Vol. 10. – P. 375–382.

51. Pedroche, J. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme–support linkages and thermal stability / J. Pedroche, M. del Mar, C. Yust Mateo // Enzyme Microb Technol. – 2007. – Vol. 40. – P. 1160–1166.

Salis, A. Laccase from Pleurotussajor-caju on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds / A. Salis, M. Pisano, M. Monduzzi // J Mol Catal B: Enzym. – 2009. – Vol. 58. -P. 175–180.

53. Betancor, L. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions / L. Betancor, F, Lopez-Gallego, A. Hidalgo // Enzyme Microb Technol. – 200. – Vol. 39. - P. 877–882.

54. Melo, RRD. New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: a tool for enzyme immobilization at neutral pH / RRD. Melo, RC. Alnoch, AFL. Vilela // Molecules. – 2017. – Vol. 22. - P. 1088.

55. Mateo, C. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins / C. Mateo, O. Abian, M. Bernedo // Enzyme Microb Technol. – 2005. – Vol. 37. – P. 456–462.

56. Bolivar, JM. The co-operative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports / JM. Bolivar, C. Mateo, C. Godoy // Process Biochem. – 2009. – Vol. 44. – P. 757–763.

57. Liu, Y. Preparation of magnetic silica nanoparticles and their application in laccase immobilization / Y. Liu, C. Guo, F. Wang // Chinese J Process Eng. – 2008. – Vol. 8. – P. 583–588.

58. Bryjak, J. Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate / J. Bryjak, P. Kruczkiewicz, A. Rekuc // BiochemEng J. – 2007. – Vol. 35. – P. 325–332.

 Jesionowski, T. Preparation of colloidal silica from sodium metasilicate solution and sulphuric acid inemulsion medium / T. Jesionowski // Colloids Surf. – 2001. – Vol. 190. – P. 153–165.

60. Jesionowski, T. Preparation of the hydrophilic/hydrophobic silica particles / T. Jesionowski, A. Krysztafkiewicz // ColloidsSurf. – 2002. – Vol. 207. – P. 49–58.

 Zucca, P. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods andmechanisms / P. Zucca, E. Sanjust // Molecules. - 2014. – Vol. 19. – P. 14139–14194.

62. Kramer, M. Enantioselective transestrification by Candidaantarctica lipase B immobilized on fumed silica / M. Kramer, J.C. Cruz, P.H. Pfromm, E. Rezac, P. Czermak // J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 150. – P. 80–86.

63. Falahati, M. Aminopropyl functionalizedcubic Ia3d mesoporous silica nanoparticle as an efficient support for immobilization of superoxide dismutase / M. Falahati, L. Mamani, A.A. Sabuory, A. Shafiee, A. Foroumadi, A.R. Badiei // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1814. – P. 1195–1202.

64. Godjevargova, T. Immobilization of glucose oxidase by acronitrile copolymercoated silica supports / T. Godjevargova, R. Nenkova, V. Konsulov // J. Mol. Catal. B. – 2006. – Vol. 38. – P. 59–64.

Zdarta, J. Immobilization of Amano Lipase A onto Stobersilica surface: Process characterization and kinetic studies / J. Zdarta, K. Sałek, A. Kołodziejczak-Radzimska, K. Siwinska-Stefanska, K. Szwarc-Rzepka, M. Norman, L. Klapiszewski, P. Bartczak, E. Kaczorek, T. Jesionowski // Open Chem. – 2015. – Vol. 13. – P. 138–148.

66. Kołodziejczak-Radzimska, A. Physicochemical and catalytic properties of acylaseI fromAspergillusmelleusimmobilized on amino- and carbonyl-grafted Stober silica. Biotechnol / A. Kołodziejczak-Radzimska, J. Zdarta, T. Jesionowski // Prog. - 2018.

67. Narwal, S.K. Characterization and catalytic properties of free and silica-bound lipase: A comparative study / S.K. Narwal, N.K. Saun // Oleo Sci. – 2014. – Vol. 63.- P. 599–603.

68. Zou, B. Effect of surface modification of low cost mesoporousSiO2 carriers on the properties of immobilized lipase / B. Zou, Y. Hua, F. Cui, L. Jiang, D. Yu, H. Huang // Colloids Interface Sci. - 2014. – Vol. 417. – P. 210–216.

69. Foresti, M.L. FTIR, SEM and fractal dimensioncharacterization of lipase B from Candida antarctica immobilized onto titania at selected conditions / M.L. Foresti, G. Valle, R. Bonetto, M.L. Ferreira, L.E. Briand // Appl. Surf. Sci. – 2010. – Vol. 256. – P. 1624–1635.

 Valles, D. Adsorption onto alumina and stabilization of cysteineproteinases from crude extract of solanum granuloso-leprosum fruits / D. Valles, S. Furtado, C.
 Villadoniga, A. Cantera // Process Biochem. – 2011. – Vol. 46. – P. 592–598.

71. Reshmi, R. Immobilization of α-amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalystfor starch hydrolysis / R. Reshmi, G. Sanjay, S. Sugunan // Catal. Commun. – 2007. – Vol. 8. – P. 393–399.

72. Yang, Z. Study on the activity and stability of urease immobilized ontonanoporous aluminamembranes / Z. Yang, S. Si, C. Zhang // Microporous Mesoporous Mater. – 2008. – Vol. 111. – P. 359–366.

73. Ota, S. High-throughput proteindigestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula / S. Ota, S. Miyazaki, H. Matsuoka, K. Morisato, Y. Shintani, K. Nakanishi // J. Biochem. Biophys. Meth. – 2007. – Vol. 70. P. 57–62.

74. de Cazes, M. Characterization of laccase-graftedceramic membranes for pharmaceuticals degradation / M. de Cazes, P. Belleville, M. Mougel, H. Kellner, J. Sanchez-Marcano // J. Membr. Sci. – 2015. – Vol. 476. – P. 384–393.

75. Caldas, E.M. Pore size effect in the amount of immobilized enzyme for manufacturing carbon ceramicbiosensor / E.M. Caldas, D. Novatzky, M. Deon, E.W. de Menezes, P.F. Hertz, T.M.H. Costa, L.T. Arenas, E.V Benvenutt // Microporous Mesoporous Mater. – 2017. – Vol. 247. – P. 95–102.

76. Pazouki, M. Development of clay foam ceramic as a support for fungi immobilization for biodiesel production / M. Pazouki, F. Zamani, M. Khalili // Int. J. Eng. Trans. B Appl.- 2014. – Vol. 27. – P. 1691–1696.

77. Ebrahimi, M. A novel ceramic membrane reactorsystem for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides / M. Ebrahimi, L. Placido, L. Engel, K. Shams Ashaghi, P. Czermak // Desalination. – 2010. – Vol. 250. – P. 1105–1108.

78. Wang, W. Horseradish peroxidase immobilized on the silane-modified ceramics for thecatalytic oxidation of simulated oily water / W. Wang, Z. Li, W. Li, J. Wu // Sep. Purif. Technol. – 2012. – Vol. 89. – P. 206–211.

Singh, V. Polysaccharide-silica hybrids: Design andapplications / V. Singh, P. Srivastava, A. Singh, D. Singh, T. Malviya // Polym. Rev. – 2016. – Vol. 56. – P. 113–136.

Biochem.
 Grigoras, A.G. Catalase immobilization-A review / A.G. Grigoras // Biochem.
 Eng. J. – 2017. – Vol. 117. – P. 1–20.

Singh, V. Polysaccharidesilica hybrids: design and applications / V. Singh, P. Srivastava, A. Singh // Polym Rev. – 2016. - Singh, V. Srivastava, P. Singh A. Vol. 56. – P. 113–136.

82. Hu, C. Immobilization of Aspergillus terreus lipase in self-assembled hollow nanospheres for enantioselective hydrolysis of ketoprofenvinyl ester / C. Hu, N. Wang, W. Zhang, et al. // J Biotechnol. – 2015. – Vol. 194. – P. 12–18.

83. Cipolatti, EP. Nanomaterials for biocatalyst immobilization–state of the art and future trends / EP. Cipolatti, A. Valerio, RO. Henriques, et al. // RSC Adv. -2016. – Vol. 6. – P. 104675–104692.

84. Kotal, M. Fabrication of gold nanoparticle assembled polyurethane microsphere template in trypsin immobilization / M. Kotal, SK. Srivastava, TK. Maiti // J NanosciNanotechnol. – 2011. – Vol. 11. – P. 10149–10157.

Bolibok, P. Controlling enzymatic activity by immobilization on grapheme oxide /
P. Bolibok, M, Wisniewski, K, Roszek, et al. // Naturwissenschaften. – 2017. – Vol. 104.
– P. 36.

86. Hou, J. Preparation of titania based biocatalytic nanoparticles and membranes for CO2 conversion / J. Hou, G, Dong, B, Xiao, et al. // J Mater Chem A. -2015. – Vol. 3. – P. 3332–3342.

87. Garmroodi, M. Covalent binding of hyper-activated Rhizomucormiehei lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports / M. Garmroodi, M. Mohammadi, A. Ramazani, et al. // Int J Biol Macromol. – 2016. - Vol. 86. – P. 208–215.

88. Kim, J. Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells / J. Kim, H. Jia,
P. Wang // Biotechnol Adv. – 2006. – Vol. 24. – P. 296–308.

89. Cao, M. Food related applications of magneticiron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis / M. Cao, Z. Li, J. Wang, W. Ge, T. Yue, R. Li, V.L. Colvin, W.W. Yu // Trends Food Sci.Technol. -2012. – Vol. 27. – P. 47–56.

90. Li, X.S. Synthesis and applications of functionalized magneticmaterials in sample preparation / X.S. Li, G.T. Zhu, Y.B. Luo, B.F. Yuan, Y.Q Feng // TrAC Trends Anal. Chem. – 2013. – Vol. 45. – P. 233–247.

91. Netto, C.G. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes / C.G. Netto, H.E. Toma, L.H. Andrade // J. Mol. Catal. B Enzym. – 2013. – Vol. 85–86. – P. 71–92.

92. Mehrasbi, M.R. Covalent immobilization of Candida antarcticalipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. Renew / M.R. Mehrasbi, J. Mohammadi, M. Peyda, M. Mohammadi // Energy. – 2017. – Vol. 101. – P. 593–602.

93. Aber, S. Immobilization of glucose oxidase on Fe3O4 magneticnanoparticles and its application in the removal of Acid Yellow 12 / S. Aber, E. Mahmoudikia, A. Karimi, F. Mahdizadeh //Water Air Soil Pollut. – 2016. – Vol. 227. – P. 93-104.

94. Atacan, K. Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin onmodified Fe3O4 magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in thebovine milk / K. Atacan, B. Cakiroglu, M. Ozacar // Food Chem. – 2016. – Vol. 212. – P. 460–468.

95. Schuth, F. Endo- and exotemplating to create high-surface-area inorganic materials / F. Schuth // Angew. Chem. Int. Ed. – 2003. – Vol. 42. – P. 3604–3622.

96. Matuszek, K. Silica-supported chlorometallate (III) ionic liquids as recyclable catalysts for Diels-Alder reaction undersolventless conditions / K. Matuszek, A. Chrobok, P. Latos, M. Markiton, K. Szymanska, A. Jarzebski, M. Swadzba-Kwany // Catal. Sci. Technol. – 2016. – Vol. 6. – P. 8129–8137.

97. Hartmann, M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis /
M. Hartmann //Chem. Mater. - 2005. - Vol. 17. - P. 4577-4593.

98. Fan, J. Rapid and high-capacity immobilization of enzymes basedon mesoporous silicas with controlled morphologies / J. Fan, J.Lei, L. Wang, C. Yu, B. Tu, D. Zhao // Chem. Commun. – 2003. – Vol. 17. – P. 2140–2141.

99. Yiu, H.H.P. Enzyme immobilisation using siliceous mesoporous molecular sieves
/ H.H.P. Yiu, P.A. Wright, N.P. Botting // Microporous Mesoporous Mater. - 2001. Vol. 44-45. - P. 763-765.

100. Schuth, F. Non-siliceous mesostructured and mesoporous materials / F. Schuth // Chem. Mater. – 2001. – Vol. 13. – P. 3184–3195.

101. Moritz, M. Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences:
Principles and applications / M. Moritz, M. Geszke-Moritz // Mater. Sci. Eng. – 2015. –
Vol. 49. – P. 114–151.

102. Catalano, P.N. Wired enzymes in mesoporous materials: A benchmark for fabricating biofuel cells / P.N. Catalano, A. Wolosiuk, G.J.A.A. Soler-Illia, M.G. Bellino // Bioelectrochemistry. – 2015. – Vol. 106. – P. 14–21.

103. Cai, C. Immobilization of Candida antarctica lipase B onto SBA-15 andtheir application in glycerolysis for diacylglycerols synthesis / C. Cai, Y. Gao, Y. Liu, N. Zhong, N. Liu // Food Chem. – 2012. – Vol. 212. – P. 205–212.

104. Chen, Y. Efficient improving the activity and enantioselectivity of Candida rugosa lipasefor the resolution of naproxen by enzyme immobilization on MCM-41 mesoporous molecular sieve / Y. Chen, Y. Xu, X.M. Wu // Int. J. Bioautom. – 2015. – Vol. 19. – P. 325–334.

105. Zhuang, H. Study on alkalineprotease immobilized on mesoporous materials / H.
Zhuang, S. Dong, T. Zhang, N. Tang, N. Xu, B. Sun, J. Liu, M. Zhang, Y. Yuan // Asian
J. Chem. – 2014. – Vol. 26. – P. 1139–1144.

106. Mangrulkar, P.A. Tyrosinase-immobilized MCM-41for the detection of phenol /
P.A. Mangrulkar, R. Yadav, J.S. Meshram, N.K. Labhsetwar, S.S. Rayalu // Water Air
Soil Pollut. – 2012. – Vol. 223. – P. 819–825.

107. Wang, Y. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation / Y. Wang, F. Caruso // Chem. Mater. – 2005. – Vol. 17. – P. 953–961.

108. Sulman, E.M. Design of biocatalysts for efficient catalytic processes / E.M. Sulman, V.G. Matveeva, L.M. Bronstein // Current Opinion in Chemical Engineering. – 2019. – Vol. 26. – P. 1–8.

109. Perez-Anguiano, O. Transparent and robust silica coatings with dual range porosity for enzyme-based optical biosensing / O. Perez-Anguiano, B. Wenger, R. Pugin, E. Scolan, H. Hofmann // Adv. Funct. Mater. – 2017. – Vol. 2. – P. 27.

110. Francic, N. Immobilisation of organophosphate hydrolase on mesoporous and stober particles / N. Francic, A. Kosak, A. Lobnik // J. Sol-Gel. Sci. Technol. – 2016. – Vol. 79. – P. 497-509.

111. Del Arco, J. Structural and functional characterization of thermostable biocatalysts for the synthesis of 6-aminopurine nucleoside-5'-monophospate analogues / J. Del Arco,
E. Perez, H. Naitow, Y. Matsuura, N. Kunishima, J. Fernandez-Lucas // Bioresour Technol. – 2019. – Vol. 276. – P. 244-252.

112. Chapanian, R. Enhancement of biological reactions on cell surfaces via macromolecular crowding / R. Chapanian, DH. Kwan, I. Constantinescu, FA. Shaikh, NAA. Rossi, SG. Withers, JN. Kizhakkedathu // Nat. Commun. – 2014. – Vol. 5. – P. 4683.

113. Bolivar, JM. Mesoporous silica materials labeled for optical oxygen sensing and their application to development of a silica-supported oxidoreductase biocatalyst / JM. Bolivar, S. Schelch, T. Mayr, B. Nidetzky // ACS Catal. – 2015. – Vol. 5. – P. 5984-5993.

114. Bolivar, JM. Intensifying the o2-dependent heterogeneous biocatalysis: Superoxygenation of solid support from h2o2 by a catalase tailor-made for effective immobilization / JM. Bolivar, S. Schelch, M. Pfeiffer, B. Nidetzky // J. Mol. Catal . B: Enzym. – 2016. – Vol. 134. – P. 302-309.

115. Valikhani, D. A tailor-made, self-sufficient and recyclable monooxygenase catalyst based on coimmobilized cytochrome p450 bm3 and glucose dehydrogenase / D. Valikhani, JM. Bolivar, A. Dennig, B. Nidetzky // Biotechnol Bioeng. – 2018. – Vol. 115. – P. 2416-2425.

116. Cao, Y. Immobilization of bacillus subtilis lipase on a cu-btc based hierarchically porous metal-organic framework material: A biocatalyst for esterification / Y. Cao, Z. Wu, T. Wang, Y. Xiao, Q. Huo, Y. Liu // Dalton Trans. – 2016. – Vol. 45. – P. 6998-7003.

117. Aires-Trapote, A. synthesis of n-acetyllactosamine using an immobilized  $\beta$ -galactosidase on a tailor made porous polymer / A. Aires-Trapote, A. Tamayo, J. Rubio, A. Rumbero, MJ. Hernaiz // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5. – P. 40375-40383.

118. Zhang, S. An efficient, recyclable, and stable immobilized biocatalyst based on bioinspired microcapsules-in-hydrogel scaffolds / S. Zhang, Z. Jiang, J. Shi, X. Wang, P. Han, W. Qian // ACS Appl. Mater Interfaces. – 2016. – Vol. 8. – P. 25152-25161.

119. Moreno-Perez, S. Intense pegylation of enzyme surfaces: Relevant stabilizing effects / S. Moreno-Perez, Ah. Orrego, M. Romero-Fernandez, L. Trobo-Maseda, S. Martins-De Oliveira, R. Munilla, G. Fernandez-Lorente, JM. Guisan // Methods Enzymol. – 2016. – Vol. 571. – P. 55-72.

120. Soto, ID. Study of the physicochemical interactions between thermomyces lanuginosus lipase and silica-based supports and their correlation with the biochemical activity of the biocatalysts / ID. Soto, S. Escobar, M. Mesa // Mater Sci. Eng. C. - 2017. – Vol. 79. – P. 525-532.

121. Asmat, S. A robust nanobiocatalyst based on high performance lipase immobilized to novel synthesised poly(o-toluidine) functionalized magnetic nanocomposite: Sterling stability and application / S. Asmat, Q. Husain // Mater Sci. Eng. C. – 2019. – Vol. 99. – P. 25-36.

122. Vahidi, AK. Simple and efficient immobilization of extracellular his-tagged enzyme directly from cell culture supernatant as active and recyclable nanobiocatalyst: High-performance production of biodiesel from waste grease / AK. Vahidi, Y. Yang, TPN. Ngo, Z. Li // ACS Catal. – 2015. – Vol. 5. – P. 3157-3161.

123. Fathi, M. Use of Nanotechnology for Immobilization and Entrapment of Food Applicable Enzymes / M. Fathi, M Karim, S.R. Khoigani, V. Mosayebi// Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry. – 2019. – Vol. 5. – P. 2037-2061.

124. Gkantzou, E. Magnetic microreactors with immobilized enzymes-from assemblage to contemporary applications / E. Gkantzou, M. Patila, H. Stamatis // Catalysts. - 2018. – Vol. 8. – P.282-284.

125. Zhao, X. One-step purification and immobilization of extracellularly expressed sortase a by magnetic particles to develop a robust and recyclable biocatalyst / X. Zhao, H. Hong, X. Cheng, S. Liu, T. Deng, Z. Guo, Z. Wu // Sci Rep. - 2017. – Vol. 7. – P. 1-9.

126. Jesionowski, T. Enzyme immobilization by adsorption: a review / T. Jesionowski,
J. Zdarta, B. Krajewska // Adsorption. – 2014. – Vol. 20. – P. 801–821.

127. Zhao, B. Co-immobilization of glucose oxidase and catalase in silica inverseopals for glucose removal from commercial isomaltooligosaccharide / B. Zhao, L. Zhou, L. Ma, Y. He, J. Gao, D. Li, Y. Jiang // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol.107. – P. 2034-2043.

128. Yang, Y. M. Wang, J. W. Tan R. X. Immobilization of glucose oxidase on chitosan–SiO2 gel / Y. M. Yang, J. W. Wang, R. X. Tan // Enzyme Microb. Tech. – 2004. – Vol. 34. – P. 126–131.

129. Pecar, D. Process and kinetic characteristics of glucose oxidation catalyzed with immobilized enzyme / D. Pecar, A. Gorsek // Reac. Kinet. Mech. Cat. – 2017. – Vol. 122. – P. 43-51.

130. Pitzalis, F. A bienzymatic biocatalyst constituted by glucose oxidase and Horseradish peroxidase immobilized on ordered mesoporous silica / F. Pitzalis, M. Monduzzi, A. Salis // Micropor. Mesopor. Mat. – 2017. – Vol. 241. – P. 145-154.

131. Lei, Z. Spheres-on-sphere silica microspheres as matrix for horseradish peroxidase immobilization and detection of hydrogen peroxide / Z. Lei, X. Liu, L. Ma, D. Liu, H. Zhang, Z. Wang // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5. – P. 38665–38672.

132. Yang, Y. Robust glucose oxidase with a Fe3O4@C-silica nanohybrid structure /
Y. Yang, G. Zhu, G. Wang, Y. Li, R. Tang // Mater. Chem. – 2016. – Vol. 4. – P. 47264731.

133. Ai, J. NH2eFe3O4@SiO2 supported peroxidase catalyzed H2O2 for degradation of endocrine disrupter from aqueous solution: Roles of active radicals and NOMs / J. Ai, W. Zhang, G. Liao, H. Xia, D. Wang // Chemosphere. – 2017. – Vol. 186. – P. 733-742.

134. Chang, Q. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH2-Modified Magnetic
Fe3O4/SiO2 Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol / Q. Chang,
H. Tang // Molecules. – 2014. – Vol. 19. – P. 15768-15782.

135. Xu, R. Estrone removal by horseradish peroxidase immobilized on a nanofibrous support with Fe3O4 nanoparticles / R. Xu, J. Yuan, Y. Si, F. Li, B. Zhang // RSC Adv. – 2016. – Vol. 6. – P. 3927–3933.

136. Zhu, Y. Supported Ultra Small Palladium on Magnetic Nanoparticles Used as Catalysts for Suzuki Cross-Coupling and Heck Reactions /Y. Zhu, S. C. Peng, A. Emi, Z. Su, R. Monalisa // Adv. Synth. Catal. – 2007. – Vol. 349. – P. 1917-1922. 137. Polshettiwar, V. Magnetically Recoverable Nanocatalysts / V. Polshettiwar, R. Luque, A. Fihri, H. Zhu, M. Bouhrara // Basset, J.-M. Chem. Rev. - 2011. – Vol. 111. – P. 3036-3075.

138. Rossi, L. M. Superparamagnetic Nanoparticle-Supported Palladium: a Highly Stable Magnetically Recoverable and Reusable Catalyst for Hydrogenation Reactions /L.
M. Rossi, F.P. Silva, L.L. Vono, P.K. Kiyohara, E.L. Duarte, R. Itri, R. Landers, G. Machado // GreenChem. – 2007. – Vol. 9. – P. 379-385.

139. Saha, A. O-Allylation of Phenols with Allylic Acetates in Aqueous Media Using a Magnetically Separable Catalytic System / A. Saha, J. Leazer, R.S. Varma // GreenChem. – 2012. – Vol. 14. – P. 67-71.

140. Vaddula, B. R. A Simple and Facile Heck-type Arylation of Alkenes with Diaryliodonium Salts Using Magnetically Recoverable Pd-Catalyst / B. R. Vaddula, A. Saha, J. Leazer, R. S.Varma // GreenChem. – 2012. – Vol. 14. – P. 2133-2136.

141. Wang, D. Fast-Growing Field of Magnetically Recyclable Nanocatalysts / D.
Wang, D. Astruc // Chem. Rev. – 2014. - Vol. 114. – P. 6949-6985.

142. Lu, A.H. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application / A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schueth, N. Angew // Chem. Int. Ed. - 2007. – Vol. 46. – P. 1222-1244

143. Bazgir, A. Copper Ferrite Nanoparticles: An Efficient and Reusable Nanocatalyst for a Green One-Pot, Three-component Synthesis of Spirooxindoles in Water / A. Bazgir, G. Hosseini, R. Ghahremanzadeh // ACS Comb. Sci. – 2013. – Vol. 15. – P. 530-534.

144. Kundu, D. Magnetically Separable CuFe2O4 Nanoparticles Catalyzed Ligand-Free C-S Coupling in Water: Access to (E)- and (Z)-Styrenyl-, Heteroaryl and Sterically Hindered Aryl Sulfides / D. Kundu, T. Chatterjee, B.C. Ranu // Adv. Synth. Catal. – 2013. – Vol. 355. – P. 2285-2296.

145. Manaenkov, O. V. Ru-Containing Magnetically Recoverable Catalysts: A Sustainable Pathway from Cellulose to Ethylene and Propylene Glycols / O. V. Manaenkov, J.J. Mann, O.V. Kislitza, Y. Losovyj, B.D. Stein, B. D.; D.G. Morgan, M. Pink, O.L. Lependina, Z.B. Shifrina, V.G. Matveeva, L.M. Bronstein // ACS Appl. Mater. &Interfaces. - 2016. – Vol. 8. – P. 21285-21293.

146. Mann, J. Metal Oxide-Zeolite Composites in Transformation of Methanol to Hydrocarbons: Do Iron Oxide and Nickel Oxide Matter? / J. Mann, V.Y. Doluda, C.

Leonard, Y.B. Losovyj, D.G. Morgan, S.S. Bukalov, Z. Shifrina, B.D. Stein, N. Cherkasov, E.V. Rebrov, Z.D. Harms, M. Pink, E. M. Sulman, L. M. Bronstein // RSC Adv. – 2016. – Vol. 6. – P. 75166-75177.

147. Bin, L. In-Situ Crystallization Route to Nanorod-Aggregated Functional ZSM-5
Microspheres / L. Bin, S. Bo, Q. Xufang, L. Wei, W. Zhangxiong, S. Zhenkun, Q. Minghu // J. Am. Chem. Soc. – 2013. – Vol. 135. – P. 1181–1184.

148. Braga, T. P. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles dispersed in mesoporous aluminum oxide or silicon oxide / T. P. Braga, A. N. Pinheiro, W. T. Herrera, Y. T. Xing, E. Baggio-Saitovitch, A. Valentin // J. Mater. Sci. – 2011. – Vol. 46. – P. 766-773.

149. di Luca, C. Iron-alumina synergy in the heterogeneous Fenton-type peroxidation of phenol solutions / C. di Luca, F. Ivorra, P. Massa, R. Fenoglio // Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.) – 2015. – Vol. 268. – P. 280-289.

150. Gabelica, Z. degradation of iron chelate complexes adsorbed on mesoporous silica and alumina / Z. Gabelica, A. Charmot, R. Vataj, R. Soulimane, J. Barrault, S. Valange // J. Therm. Anal. Calorim. – 2009. – Vol. 95. – P. 445-454.

151. Kim, I. H. Low Temperature CO oxidation over Iron Oxide Nanoparticles Decorating Internal Structures of a Mesoporous Alumina / I. H. Kim, H. O. Seo, E. J. Park, S. W. Han, Y. D. Kim // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 40497.

152. Schneider, J. J. Metallorganic routes to nanoscale iron and titanium oxide particles encapsulated in mesoporous alumina: formation, physical properties, and chemical reactivity / J. J. Schneider, N. Czap, J. Hagen, J. Engstler, J. Ensling, P. Gutlich, U. Reinoehl, H. Bertagnolli, F. Luis, L. J. De Jongh, M. Wark, G. Grubert, G. L. Hornyak, R. Zanoni // Chem. - Eur. J. – 2000. – Vol. 6. - P. 4305-4321.

153. Vistak, M. Sensing of carbon monoxide with porous Al2O3 intercalated with Fe3O4 nanoparticles-doped liquid crystal / M. Vistak, O. Sushynskyi, Z. Mykytyuk, O. Aksimentyeva, Y. Semenova // Sens. Actuators. – 2015. – Vol. 235. – P. 165-170.

154. Huckel, M. Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization / M. Huckel, H.J. Wirth, M.T. Hear // J. Biochem. Biophys. Methods. – 1996. – Vol. 31. – P. 165-179.

155. Kroll, S. Highly Efficient Enzyme-Functionalized Porous Zirconia Microtubes for Bacteria Filtration. Environ / S. Kroll, C. Brandes, J. Wehling, L. Treccani, G. Grathwohl, K. Rezwan // Sci. Technol. – 2012. – Vol. 46. – P. 8739-8747.

156. Reshmi, R. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis / R. Reshmi, G. Sanjay, S. Sugunan // Catal. Commun. – 2007. – Vol. 8. – P. 393-399.

157. Pirozzi, D. Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol-gel synthesis and catalytic properties / D. Pirozzi, E. Fanelli, A. Aronne, P. Pernice, A. Mingione // J. Mol. Catal.
B: Enzym. – 2009. – Vol. 59. – P. 116-120.

158. Chen, Y. Z. Immobilization of Lipases on Hydrophobilized Zirconia Nanoparticles: Highly Enantioselective and Reusable Biocatalysts / Y. Z. Chen, C. T. Yang, C. B. Ching, R. Xu // Langmuir. – 2008. – Vol. 24. – P. 8877-8884.

159. Srinivasan, R. Influence of zirconium salt precursors on the crystal structures of zirconia / R. Srinivasan, B. H. Davis // Catal. Lett. – 1992. – Vol. 14. P. 165-170.

 Cao, W. Fabrication of Porous ZrO2 Nanostructures with Controlled Crystalline Phases and Structures via a Facile and Cost-Effective Hydrothermal Approach / W. Cao, J. Kang, G. Fan, L. Yang, F. Li // Ind. Eng. Chem. Res. – 2015. – Vol. 54. – P. 12795-12804.

161. Lamas, D. G. Crystal structure of pure ZrO2 nanopowders / D. G. Lamas, A. M. Rosso, M. S. Anzorena, A. Fernandez, M. G. Bellino, M. D. Cabezas, N. E. Walsoee de Reca, A. F. Craievich // Scr. Mater. – 2006. – Vol. 55. – P. 553-556.

162. Liu, J. Nano-sized ZrO2 derived from metal-organic frameworks and their catalytic performance for aromatic synthesis from syngas / J. Liu, Y. He, L. Yan, K. Li, C. Zhang, H. Xiang, X. Wen, Y. Li // Catal. Sci. Technol. – 2019. – Vol. 9. – P. 2982-2992.

163. Salavati-fard, T. Lewis Acid Site and Hydrogen-Bond-Mediated Polarization Synergy in the Catalysis of Diels-Alder Cycloaddition by Band-Gap Transition-Metal Oxides / T. Salavati-fard, E. S. Vasiliadou, G. R. Jenness, R. F. Lobo, S. Caratzoulas, D. J. Doren // ACS Catal. – 2019. – Vol. 9. – P. 701-715.

164. Santos, K. M. A. The Role of Bronsted and Water-Tolerant Lewis Acid Sites in the Cascade Aqueous-Phase Reaction of Triose to Lactic Acid / K. M. A. Santos, E. M.

Albuquerque, G. Innocenti, L. E. P. Borges, C. Sievers, M. A. Fraga // ChemCatChem. - 2019. - Vol. 11. – P. 3054-3063.

165. Wong, C.M. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications / C.M. Wong, K. H. Wong, X. D. Chen // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2008. - Vol. 78. - P.927-938

166. Jagdish, S. Glucose oxidase from Aspergillus niger: Production, characterization and immobilization for glucose oxidation / S. Jagdish, V. Neelam // Advances in Applied Science Research. – 2013. - Vol. 4(3). - P.250-257.

167. Singh, A. Methods of Enzyme Immobilization and Its Applications in Food Industry / A. Singh, M. S. Negi, A. Dubey, V. Kumar A. K. Verma // Enzymes in Food Technology. - 2018. – Vol. 34. - P.103-124.

168. Brice, I. Whispering gallery mode resonator and glucose oxidase based glucose biosensor / I. Brice, K. Grundsteins, A. Atvars, J. Alnis, R. Viter // Sensors and Actuators, B: Chemical. - 2020. – Vol. 318. – P. 128004.

169. Wang, Y. Molecular crowding and a minimal footprint at a gold nanoparticle support stabilize glucose oxidase and boost its activity / Y. Wang, R. Jonkute, L. Lindmark, K. Keighron, D. J. Cans // ChemRxiv. - 2019. – Vol.36. – P. 1-11.

170. Hu, Z. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized on multi-vacancy TiO2 nanotube arrays / Z. Hu, J. Rong, Z. Zhan, X. Yu // International Journal of Electrochemical Science. - 2019. – Vol. 14(10). – P. 9661-9670.

171. Zhang, Y. A point-of-care diagnostics logic detector based on glucose oxidase immobilized lanthanide functionalized metal-organic frameworks / Y. Zhang, Y. Bing // Nanoscale. – 2019. – Vol. 11(47). – P. 22946-22953.

172. Xu, Y. In Situ Enzyme Immobilization with Oxygen-Sensitive Luminescent Metal-Organic Frameworks to Realize "All-in-One" / Y.Xu, S. Liu, J. Liu, L. Zhang, D. Chen, J. Chen, Y. Ma, J. Zhang, Z. Dai, Zong, X. Zou // Multifunctions Chemistry - A European Journal. – 2019. – Vol. 25(21). – P. 5463-5471.

173. Liang, T. Rising Mesopores to Realize Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase toward Highly Sensitive Detection of Glucose Advanced Functional Materials / T. Liang, L. Zou, X. Guo, X. Ma, Z. Xiaoqing, Z. Chenke; Z. Zhuo, H. F, Hu, Z. Lu, K. Tang // - 2019. – Vol. 29(44). – P. 1903026.

174. Tian, K. J. Amperometric detection of glucose based on immobilizing glucose oxidase on g-C3N4 nanosheets Colloids and Surfaces / K.J. Tian, H. Liu, Y.P. Dong, X.F. Chu // Physicochemical and Engineering Aspects. – 2019. – Vol. 58 - P. 123808.

175. Zhang, D. Direct electrochemistry of glucose oxidase based on one step electrodeposition of reduced graphene oxide incorporating polymerized L-lysine and its application in glucose sensing / D. Zhang, X. Chen, W. Ma, T. Yang, D. Li, B. Dai, Z. Zhang // Materials Science & Engineering, C: Materials for Biological Applications. - 2019. – Vol. 104. – P. 109880

176. Dinesh, B. a Stable High Surface Excess of Glucose Oxidase on Pristine Multiwalled Carbon Nanotubes for Glucose Quantification / B. Dinesh, D. Shalini K. S. Krishnan, U. Maheswari // ACS Applied Bio Materials. – 2019. – Vol. 2(4). – P. 1740-1750.

177. Ning, Y. N. Glucose oxidase immobilized on a functional polymer modified glassy carbon electrode and its molecule recognition of glucose Polymers / Y. N. Ning, B.L. Xiao, N.N. Moosavi-Movahedi, A. Akbar; J. Hong // Basel, Switzerland. – 2019. – Vol. 11(1). – P. 115-123.

178. Liu, J. Immobilized Ferrous Ion and Glucose Oxidase on Graphdiyne and Its Application on One-Step Glucose Detection / J. Liu, X. Shen, D. Baimanov, L. Wang, Y. Xiao, H. Liu, Y. Li, X. Gao, Y. Zhao, C. Chunying // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2019. – Vol. 11(3). – P. 2647-2654.

He, D. Construction of ZnCo2O4 nanowire arrays 3D binder-free electrode with highly catalytic activity towards glucose oxidation / D. He, M. Wang, X, Wang, S, Feng, J. Chen, P. Jiang // Journal of Solid State Chemistry. – 2020. – Vol. 284. – P. 121214.

180. Ortega-Liebana, M. Gold-based nanoparticles on amino-functionalized mesoporous silica supports as nanozymes for glucose oxidation / M. Ortega-Liebana, C. Bonet-Aleta, H. Javier; L. Jose, J. Santamaria // From Catalysts. – 2020. – Vol. 10(3). – P. 333.

181. Yadav, V.D. In-situ silver nanoparticles formation as a tool for non-enzymatic glucose sensing: Study with an enzyme mimicking salt From Colloids and Surfaces / V.D. Yadav, R.A. Krishnan, R. Jain, P. Dandekar, A. Prajakta // Physicochemical and Engineering Aspects. – 2019. – Vol. 580. – P. 123715.

182. Kang, S. Performance improvement of the glucose oxidation reactions using methyl red mediator / S. Kang, Y. Chung, K. Hyun, K.S. Yoo, Y. Kwon, // International Journal of Hydrogen Energy. – 2020. – Vol. 45(7). – P. 4821-4828.

183. Sun, Y. Hierarchically Porous and Water-Tolerant Metal-Organic Frameworks for Enzyme Encapsulation / Y. Sun, J. Shi, S. Zhang, Y. Wu, M. Mei, W. Qian, Z. Jiang // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2019. – Vol. 58(28). – P. 12835-12844.

184. Pal, P. Manufacture of Gluconic Acid: A ReviewTowards Process Intensification for Green Production / P. Pal, R. Kumar, S. Banerjee // Chem. Eng. Process. – 2016. – Vol. 104. – P. 160-171.

185. Da Via, L. Visible-Light-Controlled Oxidation of Glucose using Titania-Supported Silver Photocatalysts / L. Da Via, C. Recchi, T. E. Davies, N. Greeves, J.A. Lopez-Sanchez // ChemCatChem. - 2016. – Vol. 22. – P. 3475–3483.

186. Megias-Sayago, C. Gold Catalysts Screening in Base-free Aerobic Oxidation of Glucose to Gluconic Acid / C. Megias-Sayago, S. Ivanova, C. Lopez-Cartes, M. A. Centeno, J. A. Odriozola // Catal. Today. - 2017. – Vol. 279. – P. 148-154.

187. Lee, J. Pt Catalysts for Efficient Aerobic Oxidation of Glucose to Glucaric Acid in Water / J. Lee, B. Saha, D. G. Vlachos // Green Chem. – 2016. -Vol. 18 (13). – P. 3815-3822.

188. Morawa Eblagon, K. One-pot Oxidation of Cellobiose to Gluconic Acid. Unprecedented High Selectivity on Bifunctional Gold Catalysts over Mesoporous Carbon by Integrated Texture and Surface Chemistry Optimization / K. Morawa Eblagon, M. F. R. Pereira, J. L. Figueiredo // Appl. Catal. B: Environ. – 2016. – Vol. 184. – P. 381-396.

 Xiuhua, L. Glucose-Responsive Micelles for Controlled Insulin Release Based on Transformation from Amphiphilic to Double Hydrophilic / L. Xiuhua, S. Hui, W. Wei, L. Shuai, L. Zaifu, D. Jiawei, X. Lisa, L. Jianshu // Nanosci. Nanotechnol. – 2016. – Vol. 16 (6). – P. 5457-5463.

190. Lang, N. J. Characterization of Glucose Oxidation by Gold Nanoparticles Using Nanoceria / N. J. Lang, B. Liu, J. Liu // Colloid Interf Sci. – 2014. – Vol. 428. – P. 78-83.
191. Taketoshi, A. Reprint of "Synergetic Combination of an Enzyme and Gold Catalysts for Glucose Oxidation in Neutral Aqueous Solution". / A. Taketoshi, S. Takenouchi, T. Takei, M. Haruta // Appl. Catal. B: Environ. – 2014. – Vol. 474. – P. 257-262.

192. Singh, J. Glucose Oxidase from Aspergillus Niger: Production, Characterization and Immobilization for Glucose Oxidation / J. Singh, N. Verma // Adv. Appl. Sci. Res. – 2013. – Vol. 4 (3). – P. 250-257.

193. Tischer, W. Enzymes: Methods and Applications / W. Tischer, F. Wedekind // Top. Curr. Chem. – 1999. – Vol. 200. – P. 95-126.

194. Guisan, J. M. Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology /
J. M. Guisan // Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey. – 2006. – P. 449.

195. Lai, Y. Controlled Embedding of Metal Oxide Nanoparticles in ZSM-5 Zeolites through Preencapsulation and Timed Release/Y. Lai, M.N. Rutigliano, G. Veser.// Langmuir. – 2015. – Vol. 31. – P. 10562-10572.

196. Liu, B. Factors affecting the preparation of ordered mesoporous ZrO2 using the replica method / B. Liu, R. T. Baker // J. Mater. Chem. – 2008. – Vol. 18. – P. 5200-5207.

197. Nguyen, L. T. Combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase for catalyzing cascade chemical reactions / L. T. Nguyen, K.L Yang // Enzyme Microb. Technol. – 2017. – Vol. 100. – P. 52-59.

198. Acosta, L. C. Large Cosolutes, Small Cosolutes, and Dihydrofolate Reductase Activity / L. C. Acosta, G. M. Perez Goncalves, G. J. Pielak, , A.H. Gorensek-Benitez // Protein Sci. – 2017. – Vol. 26. – P. 2417-2425.

199. Bautista, F. M. Properties of a glucose oxidase covalently immobilized on amorphous AlPO support / F. M. Bautista, J. M. Campelo, A. Garcia, A. Jurado, D. Luna, J. M. Marinas, A. A. Romero // J. Mol. Catal. – 2001. – Vol. 11. – P. 567–577.

200. Tavares, T. S. Soybean peroxidase immobilized on  $\delta$ -FeOOH as new magnetically recyclable biocatalyst for removal of ferulic acid. Bioprocess / T. S. Tavares, J. A. Torres, M. C. Silva, F. G. E. Nogueira, A. C. Silva, T. C. Ramalho // Biosyst. Eng. – 2018. – Vol. 41. – P. 97–106.

201. Абуткина, Е. Сорбционное оборудование Quantachrome для анализа удельной поверхности и распределения нанопор по размерам / Е. Абуткина // Наноиндустрия. - 2009. - №4. - С.54-59.

202. Бриггс, Д. Анализ поверхности методами Оже- и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии / Д. Бриггс, М.П. Сих // М.: Мир. - 1987. – С. 598.

203. Sing, K. S. W. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity / K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska // Pure Appl. Chem. – 1985. – Vol. 57. – P. 603-619.

204. Tian, Y. Facile Solvothermal Synthesis of Monodisperse Fe3O4 Nanocrystals with Precise Size Control of One Nanometre as Potential MRI Contrast Agents / Y. Tian, B. Yu, X. Li, K. Li // J. Mater. Chem. – 2011. – Vol. 21. – P. 2476-2481.

205. Niederberger, M. Oriented Attachment and Mesocrystals: Non-classical Crystallization Mechanisms Based on Nanoparticle Assembly / M. Niederberger, H. Coelfen // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2006. – Vol. 8. – P. 3271-3287.

206. Dabbagh, H. A. Effects of vacuum and calcination temperature on the structure, texture, reactivity, and selectivity of alumina: Experimental and DFT studies / H. A. Dabbagh, K. Taban, M. Zamani // J. Mol. Catal. A: Chem. – 2010. – Vol. 326. - P. 55-68.

207. Yamashita, T. Analysis of XPS Spectra of Fe2+ and Fe3+ Ions in Oxide Materials / T. Yamashita, P. Hayes // Appl. Surf. Sci. – 2008. – Vol. 254. – P. 2441-2449.

208. Fujii, T. In situ XPS Analysis of Various Iron Oxide Films Grown by NO2assisted Molecular-beam Epitaxy / T. Fujii, F. M. F. de Groot, G. A. Sawatzky, F. C. Voogt, T. Hibma, K. Okada // Phys. Rev. B. – 1999. – Vol. 59. – P. 3195-3202.

209. Gunda, N. S. K. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker / N. S. K. Gunda, M. Singh, L. Norman, K. Kaur, S. K. Mitra // Appl. Surf. Sci. – 2014. – Vol. 305. – P. 522-530.

210. Azizi, N. A magnetic nanoparticle catalyzed eco-friendly synthesis of cyanohydrins in a deep eutectic solvent / N. Azizi, Z. Rahimi, M. Alipour // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5. – P. 61191-61198.

211. Jain, P. U. A Facile One-Pot Transformation of Aromatic Aldehydes/Ketones to Amides: Fe2O3@SiO2 as an Environmentally Benign Core-Shell Catalyst / P. U. Jain, S. D. Samant // ChemistrySelect. – 2018. – Vol. 3. – P. 1967-1975.

212. Bankar, S. Glucose oxidase - An overview / S. Bankar, M. Bule, R. Singhal, L.
Ananthanarayan // Biotechnol. Adv. - 2009. - Vol. 27. - P. 489-501.

213. Singh, J. Glucose Oxidase from Aspergillus Niger: Production, Characterization and Immobilization for Glucose Oxidation / J. Singh, N. Verma // Adv. Appl. Sci. Res. – 2013. – Vol. 4. – P. 250-257.

214. Pieters, B. Enzyme Immobilization on a Low-cost Magnetic Support: Kinetic Studies on Immobilized and Coimmobilized Glucose Oxidase and Glucoamylase / B. Pieters, R. Bardeletti // Microb. Technol. – 1992. – Vol. 14. – P. 361-370.

215. Pavel, I.-A. Effect of Meso vs Macro Size of Hierarchical Porous Silica on the Adsorption and Activity of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase / I.-A. Pavel, S. F. Montalvo, G. Prazeres, C. Garcia Ruiz, V. Nicolas, A. Celzard, F. Dehez, L. Canabady-Rochelle, N. Canilho, A. Pasc // Langmuir. – 2017. – Vol. 33. – P. 3333-3340.

216. Wang, Y. Small-sized and large-pore dendritic mesoporous silica nanoparticles enhance antimicrobial enzyme delivery / Y. Wang, Y. Nor, H. Song, Y. Yang, C. Xu, M. Yu, C. Yu // J. Mater. Chem. B. – 2016. – Vol. 4. – P. 2646-2653.

217. Gonzalez-Delgado, I. β-galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS) / I. Gonzalez-Delgado, Y. Segura, A. Martin, M.J. Lopez-Munoz, G. Morales // Microporous Mesoporous Mater. – 2018. – Vol. 257. – P. 51-61.

218. Lue, Y. Immobilized penicillin G acylase on mesoporous silica: The influence of pore size, pore volume and mesophases /Y. Lue, Y. Guo, Y. Wang, X. Liu, Y. Wang, Y. Guo, Z. Zhang, G. Lu // Microporous Mesoporous Mater. – 2008. – Vol. 114. – P. 507-510.

219. Hilterhaus, L. Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications / L. Hilterhaus, A. Liese, U. Kettling, G. Antranikian // Wiley-VCH: Weinheim, Germany. – 2016. – P. 429.

220. Purcell, K. F. Bonding in acetonitrile adducts / K. F. Purcell, R. S. Drago // J. Am. Chem. Soc. – 1966. – Vol. 88. – P. 919-924.

221. Haney, M.A. Mass spectrometric determination of the proton affinities of various molecules / M.A. Haney, J.L. Franklin // J. Phys. Chem. – 1969. – Vol. 73. – P. 4328-4331.

222. Angell, C. L. Infrared spectroscopic investigation of zeolites and adsorbed molecules. IV. Acetonitrile / C. L. Angell, M. V. Howell // J. Phys. Chem. – 1969. – Vol. 73. – P. 2551–2554.

223. Gao, L. Iron Oxide Nanozyme: A Multifunctional Enzyme Mimetic for Biomedical Applications / L. Gao, K. Fan, X. Yan // Theranostics. – 2017. – Vol. 7. – P. 3207-3227.

224. Uc-Cayetano, E. G. Enhancement of Electrochemical Glucose Sensing by Using Multiwall Carbon Nanotubes decorated with Iron Oxide Nanoparticles / E.G. Uc-Cayetano, L.C. Ordóñez, J.V. Cauich-Rodríguez, F. Avilés // Int. J. Electrochem. Sci. – 2016. – Vol. 11. – P. 6356 – 6369.

225. Yang, Z. Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activity and stability / Z.Yang, S. Si, C. Zhang // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – Vol. 367. – P. 169-175.

226. Del Monte, F. Stabilization of tetragonal ZrO2 in ZrO2-SiO2 binary oxides / F.
Del Monte, W. Larsen, J. D. Mackenzie // J. Am. Ceram. Soc. – 2000. – Vol. 83. – P.
628-634.

227. Jayakumar, S. Nanosize stabilization of cubic and tetragonal phases in reactive plasma synthesized zirconia powders / S. Jayakumar, P. V. Ananthapadmanabhan, T.K. Thiyagarajan, K. Perumal, S.C. Mishra, G. Suresh, L.T. Su, A.I.Y. Tok // Mater. Chem. Phys. – 2013. – Vol. 140. – P. 176-182.

228. Toraya, H. Calibration curve for quantitative analysis of the monoclinic-tetragonal zirconium dioxide system by x-ray diffraction / H. Toraya, M. Yoshimura, S. Somiya // J. Am. Ceram. Soc. – 1984. – Vol. 67. – P. 119-121.

229. Yamashita, T. Analysis of XPS Spectra of Fe2+ and Fe3+ Ions in Oxide Materials
/ T. Yamashita, P. Hayes // Appl. Surf. Sci. – 2008. – Vol. 254. – P. 2441-2449.

230. Chen, Z. Dual Enzyme-like Activities of Iron Oxide Nanoparticles and Their Implication for Diminishing Cytotoxicity / Z. Chen, J. Yin, Y. Zhou, Y. Zhang, L. Song, M. Song, S. Hu, N. Gu // ACS Nano. – 2012. – Vol. 6. – P. 4001-4012.

231. Koeck, E.M. Surface Chemistry of Pure Tetragonal Zro2 and Gas-Phase Dependence of the Tetragonal-to-Monoclinic ZrO2 Transformation / E.M. Koeck, M. Kogler, T. Goetsch, L. Schlicker, M. Bekheet, A. Doran, A. Gurlo, B. Kloetzer, B. Petermueller, D. Schildhammer, et al. // Dalton Trans. – 2017. – Vol. 46. – P. 4554-4570.
232. Cherkasov, N. Hydrogenation of bio-oil into higher alcohols over Ru/Fe3O4-SiO2

catalysts / N. Cherkasov, V. Jadvani, J. Mann, Y.B. Losovyj, Z.B. Shifrina, L. M. Bronstein, E.V. Rebrov // Fuel Process. Technol. – 2017. – Vol. 167. – P. 738-746.

233. Song, J. Attachment of enzymes to hydrophilic magnetic nanoparticles through DNA-directed immobilization with enhanced stability and catalytic activity / J. Song, T. Lei, Y. Yang, N. Wu, P. Su, Y. Yang // New J. Chem. – 2018. – Vol. 42. – P. 8458-8468.

234. Song, J. Efficient immobilization of enzymes onto magnetic nanoparticles by DNA strand displacement: a stable and high-performance biocatalyst /J. Song, P. Su, Y. Yang, Y. Yang // New J. Chem. – 2017. – Vol. 41. – P. 6089-609.