

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Тверской государственный технический университет»

На правах рукописи

**Стадольникова Полина Юрьевна**

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

1.5.6. Биотехнология

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

Научный руководитель  
к.х.н., доцент Тихонов Б.Б.

Тверь – 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Иммобилизация на природных биополимерах как способ получения гетерогенных биокатализаторов .....	10
1.2 Биополимеры как альтернатива традиционным материалам .....	15
1.3 Альгинаты как перспективный биополимер для биотехнологических применений .....	19
1.3.1 Строение альгинатов.....	19
1.3.2 Получение альгинатов .....	20
1.3.3 Основные свойства альгинатов .....	22
1.3.4 Перспективы применения альгинатов .....	24
1.4 Микрочастицы альгината как эффективные носители для иммобилизации различных биообъектов и биологически активных веществ.....	26
1.4.1 Формирование альгинатных микрочастиц и техники их получения .....	28
1.4.1.1 Образование структуры «ячеистый контейнер».....	28
1.4.1.2 Основные техники получения альгинатных микросфер.....	30
1.4.2 Внешнее и внутреннее гелеобразование.....	35
1.5 Метод внутреннего гелеобразования как техника получения микрочастиц альгината .....	41
1.6 Глюкозооксидаза.....	49
1.6.1 Строение, свойства и продуценты фермента.....	49
1.6.2 Катализируемая реакция.....	52
1.6.3 Перспективы применения глюкозооксидазы.....	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ .....	55
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	57
2.1 Реактивы.....	57
2.2 Получение альгинатных микросфер методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования.....	57
2.3 Иммобилизация глюкозооксидазы.....	58

2.4	Определение активности глюкозооксидазы .....	59
2.5	Метод Брэдфорда .....	61
2.6	Изучение морфологии биополимерных микрочастиц с помощью методов оптической микроскопии .....	63
2.7	Физико-химическая характеристика альгинатных микросфер и биокатализатора на их основе .....	64
2.8	Физико-химическая характеристика используемого альгината .....	64
2.9	Термогравиметрические исследования биокатализатора .....	65
2.10	Испытания гетерогенного биокатализатора в качестве хлебопекарного улучшителя .....	65
2.11	Режим лиофильной сушки.....	66
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	67
3.1	Определение молекулярной массы и состава используемого альгината натрия .....	67
3.2	Обоснование условий синтеза альгинатных микросфер .....	70
3.3	Влияние концентрации альгината на размер и морфологию частиц .....	75
3.4	Изучение влияния количеств активирующих агентов и фермента на активность биокатализатора.....	80
3.5	Определение эффективности иммобилизации .....	84
3.6	Исследование биокатализатора с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии .....	86
3.7	Изучение кинетики каталитических реакций.....	88
3.7.1	Кинетика реакции при варьировании начальной концентрации субстрата и расчет кинетических параметров.....	88
3.7.2	Кинетика реакции при варьировании нагрузки на биокатализатор .....	90
3.7.3	Зависимость активности биокатализатора от рН .....	92
3.7.4	Зависимость активности биокатализатора от температуры.....	93
3.8	Термогравиметрические исследования биокатализатора .....	95
3.9	Использование биокатализатора в хлебопечении .....	98
3.10	Определение устойчивости биокатализатора при хранении и исследование его морфологии методом просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии .....	105
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	109



## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АМ – альгинатные микросферы
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИДК – измеритель деформации клейковины
- ПАВ – поверхностно активное вещество
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СФ – спектрофотометр
- ТР ТС – Технический регламент Таможенного союза (ЕАЭС)
- УФ – ультрафиолет
- ФАД – флавинадениндинуклеотид
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- А – активность биокатализатора
- ГМС – глюкоза-метанол-холин
- GOx – глюкозооксидаза
- GRAS – англ. Generally recognized as safe, общепризнанный статус безопасности для пищевых добавок
- EDC – N-(3-диметиламинопропил)-N'-этил-карбодиимид гидрохлорид
- HRP – пероксидаза хрена
- imGOx – ковалентно иммобилизованная на альгинатных микросферах глюкозооксидаза
- $K_M$  – константа Михаэлиса
- NHS – N-гидроксисукцинимид
- O/W – англ. oil-in-water, эмульсия «масло-в-воде»
- PGPR – полиглицерин полирицинолеат
- $V_m$  – предельная скорость реакции
- W/O – англ. water-in-oil, эмульсия «вода-в-масле»

## ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

Ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, в том числе - в пищевой индустрии в качестве безопасных технологических добавок, для повышения эффективности использования сырья и получения готового

продукта с высокими потребительскими свойствами. В частности, обработка пшеничной муки глюкозооксидазой приводит к положительным изменениям в структуре теста и образованию мякиша с улучшенными свойствами, а иммобилизация с использованием биополимеров способна решить трудности, связанные с применением нативных ферментов.

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

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1) Теоретически обосновать выбор альгинатных микросфер в качестве эффективной матрицы для иммобилизации глюкозооксидазы.

2) Экспериментально определить оптимальные условия синтеза альгинатных микросфер методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования.

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

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

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

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

7) Изучить устойчивость гетерогенного биокатализатора при хранении.

**Научная новизна работы.** Впервые теоретически обоснована и экспериментально подтверждена целесообразность физико-химической модификации альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, с целью получения носителей, способных к ковалентной сшивке с ферментами, проведена ковалентная пришивка

глюкозооксидазы к поверхности альгинатных микросфер. Изучено влияние способа и условий синтеза и хранения разработанного ковалентно иммобилизованного фермента на его активность и стабильность. Впервые ковалентно иммобилизованная глюкозооксидаза использована для улучшения хлебопекарных свойств теста из пшеничной муки. Проведенные исследования являются основой для разработки новой технологической добавки (хлебопекарного улучшителя) на основе глюкозооксидазы, ковалентно иммобилизованной на поверхности частиц полимерного геля.

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

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

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



для молодежи «Качество и экологическая безопасность пищевых продуктов и производств» (Тверь, Россия, 2020 г.); X Международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика» (Великий Новгород, Россия, 2020 г.); IX Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, Россия, 2021 г.); X Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Алушта, Россия, 2022 г.); Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2022» (Тула, Россия, 2022 г.).

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

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

**Объем и структура диссертации.**Работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Текст изложен на 135 страницах, включает 34 рисунка, 10 таблиц. Список использованных источников содержит 215 наименований.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Иммобилизация на природных биополимерах как способ получения гетерогенных биокатализаторов

Ферменты – это многофункциональные катализаторы биологического происхождения, которые могут катализировать реакции с высокой специфичностью и стереоселективностью в мягких условиях окружающей среды (невысокая температура, атмосферное давление, водная среда и т.д.) [1]. Промышленный потенциал ферментов постоянно растет. В основном они применяются в качестве эффективных катализаторов различных реакций биотрансформации, в результате которых получается множество коммерчески ценных биотехнологических продуктов.

Применение ферментов приносит много ощутимых преимуществ как для повышения эффективности процессов, так и для защиты окружающей среды. К наиболее важным отличительным признакам энзимов относятся следующие [2]:

- высокая хемо-, стерео- и региоселективность;
- мягкие условия эксплуатации;
- отсутствие токсичных побочных продуктов реакции.

Однако на производительность ферментов в значительной степени влияет окружающая среда, что ограничивает их использование. Ферменты чувствительны к различным денатурирующим и ингибирующим факторам и оптимально функционируют лишь в достаточно мягких условиях их природных систем, теряя эффективность в более жестких и изменяющихся технологических средах [3]. Также применение ферментов в нативной форме ограничивается высокими затратами на их очистку (стоимость выделения и очистки во много раз выше, чем у обычных химических катализаторов) и относительно низкой стабильностью при эксплуатации. Кроме того, в отличие от традиционных гетерогенных химических катализаторов, большинство ферментов работают в водных гомогенных каталитических системах, что приводит к загрязнению продукта и исключает их восстановление для повторного использования в активной форме из большинства реакционных смесей [4].

Для преодоления данных ограничений исследователями было разработано несколько биоинженерных подходов. Одним из наиболее перспективных является иммобилизация, обычно направленная на повышение стабильности ферментов и предоставляющая возможность их повторного использования в непрерывных биопроцессах при сохранении каталитической активности [3]. Иммобилизация фермента предусматривает сочетание селективности, стабильности и кинетических особенностей этого фермента с физическими и химическими свойствами носителя в рамках специальной методики, применение которой играет главную роль в увеличении физической и ферментативной стабильности биокатализаторов [5]. Помимо повышения стабильности ферментов, иммобилизация дает множество других ощутимых преимуществ, таких как возможность повторного использования фермента без значительного снижения его каталитической активности, а также меньшая подверженность денатурации, вызванной различными факторами окружающей среды (например, температурой, pH, ионной силой) [2]. Таблица 1.1 демонстрирует в общем достоинства и трудности, связанные с использованием иммобилизованных катализаторов [5, 6].

Разработаны различные методы иммобилизации, классифицируемые на физические (адсорбция, включение в тело матрицы, инкапсуляция) и химические (ковалентная сшивка, перекрестная сшивка) [5], различающиеся между собой образованием слабых (физической природы) или ковалентных (химической природы) связей фермента с носителем различной природы. В целом физическое связывание сравнительно слабое и практически неспособно удерживать фермент на носителе или в матрице в промышленных условиях [4], что приводит к закономерному уменьшению каталитической активности системы. Однако, не существует единого универсального метода иммобилизации или единственной подходящей подложки для всех существующих ферментов и способов их применения. Это связано с сильными различиями в химическом составе и свойствах ферментов, их субстратов и продуктов реакций, а также с различными сферами их применения. Исследователями за последние десятилетия было разработано множество методик иммобилизации ферментов, и каждая имеет свои особенности, достоинства и недостатки.

Таблица 1.1 – Преимущества и недостатки иммобилизации ферментов

Преимущества	Недостатки
Функциональность, позволяющая использование биокатализатора в непрерывных процессах, и уменьшение их стоимости	Скорости ферментативных реакций ниже, чем у нативных ферментов
Улучшенная стабильность в более широком диапазоне рабочих условий (расширенный диапазон рН, температур, стабильность по отношению к органическим растворам и т. д.)	Иммобилизация фермента в нежелательной конформации с последующей потерей активности
Простота отделения биокатализатора от конечного продукта	Высокая стоимость носителя и дополнительных подготовительных материалов и методов
Возможность повторного использования фермента	Массообменные ограничения
Иммобилизация в предпочтительной конформации и в предпочтительной локализации, а также возможность ко-иммобилизации с другими ферментами	Трудоемкие и длительные процессы иммобилизации

Для выбора подходящего носителя и метода иммобилизации необходимо контролировать несколько важных параметров связанных ферментов. Наиболее значимыми являются каталитическая активность и термическая, рН- и операционная стабильность, а также стабильность при хранении. Другим очень важным фактором является также степень высвобождения фермента из носителя, что является нежелательным явлением в промышленном применении. Таким образом, идеальный иммобилизованный биокатализатор для коммерческого использования должен характеризоваться прочным связыванием с носителем, нетоксичностью, достаточной устойчивостью к физико-химическим факторам микросреды, высокой каталитической активностью и возможностью

многократного использования или возможностью использования в непрерывном режиме [2].

Стоимость носителя, доступность, стабильность, конкретное состояние и тип реактора – это основные факторы, влияющие на выбор того или иного материала в качестве носителя. Также учитываются некоторые физико-химические свойства, такие как размер частиц, наличие и структура пор, площадь поверхности и типы функциональных групп, связанных с ней [7]. Существует огромное разнообразие материалов различного происхождения, которые могут быть использованы в качестве подложек. Однако в вопросе выбора подходящей матрицы для иммобилизации и для создания стабильного взаимодействия между ферментом и подложкой необходимо принимать во внимание некоторые существующие ограничения, поскольку матрица не должна оказывать негативного влияния на структуру фермента и не должна нарушать работу фермента в степени выше допустимого предела. Кроме того, должно существовать сродство между функциональными группами двух составляющих иммобилизованного биокатализатора, чтобы обеспечить взаимодействие конкретного фермента с матрицей и эффективное его связывание с подложкой, что особенно важно в случае ковалентной иммобилизации. Основные требования, предъявляемые к материалам матриц для эффективной иммобилизации, представлены на рисунке 1.1. Тем не менее, следует помнить, что правильный выбор матрицы напрямую связан с типом фермента и процессом, в котором будет использоваться биокаталитическая система [8].

В настоящее время предметом интенсивных исследований в качестве матриц для производства биокатализаторов промышленного значения, особенно в области пищевой промышленности, является группа материалов, включающая в себя гидрогели природного происхождения. Биополимеры природного происхождения, такие как альгинат, хитозан, целлюлоза, агароза, гуаровая камедь/гуаран, агар, каррагинан, желатин, декстран, ксантан, пектины и т. д., привлекли к себе значительное внимание исследователей за последние несколько лет из-за их широкой распространенности в природе и доступности. Неоспоримыми преимуществами использования природных гидрогелей являются: экологичность, нетоксичность, биоразлагаемость, мягкие условия производства, относительно

низкие производственные затраты [2]. Кроме того, их дополнительные универсальные свойства, такие как биосовместимость, эксплуатационная гибкость, возобновляемость и наличие многочисленных реакционноспособных участков для включения новых функциональных компонентов, предлагают значительные функциональные возможности для многоцелевого применения [9].



Рисунок 1.1 – Основные характеристики вспомогательных материалов, используемых для изготовления матриц для иммобилизации ферментов

Использование биополимеров и их усовершенствованных композитов в качестве носителей и матриц для иммобилизации множества различных ферментов позволяет разрабатывать биокатализаторы с желаемой каталитической активностью и характеристиками для новых приложений. В последние годы уникальные и творческие способы использования материалов на основе биополимеров обеспечили прогрессивное развитие устойчивых биотехнологий и биоэкономики. Использование биополимеров демонстрирует замечательные преимущества с точки зрения улучшения биокаталитических характеристик и

стабильности за счет создания биосовместимого микроокружения для молекулы фермента, для оптимального направления каталитической реакции [9].

Таким образом, ряд природных биополимеров демонстрирует потенциал применения в качестве идеальной и многообещающей иммобилизационной матрицы для различных биотехнологических приложений в рамках пищевой, биомедицинской, экологической, фармацевтической, а также биотопливной/энергетической отраслей. Ферменты, связанные с биополимерами, проявляют большую стабильность, надежность и восстанавливаемость, чем ферменты в свободной форме, и могут использоваться для непрерывных биокаталитических реакций [2, 9].

## **1.2 Биополимеры как альтернатива традиционным материалам**

Природные полимеры – это высокомолекулярные соединения, имеющие в качестве основной структуры линейную длинную цепь, образованную повторяющимися звеньями [10]. Биополимеры – это полимеры, полученные из природных источников, либо полностью биосинтезированные живыми организмами или синтезированные химическим путем из биологического материала. Разнообразный состав, особенные физико-химические свойства и возможность их регулирования, широкая распространенность в природе, невысокая стоимость и возобновляемый характер делают этот класс материалов особенно привлекательным для таких дорогостоящих секторов, как пищевая, биомедицинская и фармацевтическая промышленность [11].

В последние годы появилось множество разнообразных способов и разработок для использования материалов на основе биополимеров. Мировой рынок биополимеров к концу 2021 года должен достигнуть около 10 миллиардов долларов США, увеличившись почти на 17% за 2017–2021 гг. Западная Европа составляет самый крупный сегмент рынка (41,5%) [12]. Биополимерам присущ ряд таких важных характеристик, как биоразлагаемость, устойчивость и стабильность, биорезорбируемость, упругость, вязкость, эластичность и прочность на разрыв, антибактериальная активность, возобновляемость, биосовместимость, отсутствие токсичности и канцерогенности [13]. На эти свойства полимеров напрямую влияют

такие параметры, как тип структурной матрицы (распределение заряда, молекулярная масса и конформация), внешние условия при образовании пленок и модификации полимера (концентрация, pH, растворитель, температура и т. д.), а также вид и концентрация добавочных компонентов (антимикробные средства, сшивающие агенты, пластификаторы, антиоксиданты и др.) [14]. По сравнению с синтетическими полимерами биополимеры представляют собой более сложные молекулярные сборки с разнообразной структурой и химическим составом, которые принимают точные и определенным образом заданные трехмерные формы и конструкции. Данное очень важное свойство делает биополимеры молекулами, активными *in vivo*. Определенная форма и строение действительно являются ключевыми факторами, обеспечивающими функциональность данных структур [15].

Существует несколько классификаций биополимеров. В соответствии с методом их производства или на основании источника получения биополимеры можно разделить на три основные категории [16]:

- 1) полимеры, непосредственно извлекаемые из биомассы растений (крахмал, целлюлоза, пектины, агар и т.д.) или животных (казеин, желатин, хитин и хитозан и т.д.);
- 2) полимеры, произведенные классическим химическим синтезом на основе биомономеров, такие как полимолочная кислота;
- 3) полимеры, получаемые с помощью микробного синтеза (полигидроксиалканоаты, бактериальная целлюлоза, ксантан, пуллулан, декстраны и т.д.).

В зависимости от используемого мономерного звена и образующейся структуры биополимеры разделены на 3 основных обширных класса [17]:

- 1) Полинуклеотиды (ДНК, РНК), состоящие из 13 и более нуклеотидов.
- 2) Полипептиды (шелк, коллаген/желатин, эластин, казеин и т.д.), состоящие из аминокислот.
- 3) Полисахариды (крахмал, целлюлоза, ксилан, агар, альгинат, каррагинан, пектин, ксантан, декстран, геллан, поллулан, хитин и т.д.), представляющие собой углеводные структуры из мономерных единиц – моносахаридов.



Биополимеры представляют собой перспективные материалы для замены синтетических пластмасс из-за повышенного интереса к развитию экологичных технологий, т.к. эти соединения перерабатываются естественным путем в условиях окружающей среды с помощью биологических процессов (микробная деградация). Возобновляемые биоматериалы – это «зеленые» варианты сокращения загрязнения окружающей среды и уменьшения количества токсичных и трудно утилизируемых отходов. Комбинация биополимеров с синтетическими полимерами (такими как поливиниловый спирт, полиэтилен) и пластификаторами позволяет получить частично биоразлагаемый материал [18, 19]. Кроме того, производство 1 кг традиционных пластиков требует на 65% больше энергии, чем на получение такого же количества биополимерных материалов. Другим огромным преимуществом биополимеров является возможность включения различных функциональных наночастиц, обладающих рядом положительных характеристик и способных модифицировать структуру биополимерного материала заданным образом [20].

Основные биотехнологические области применения биополимеров представлены на рисунке 1.2 [13]. Биополимеры используются в различных формах, таких как пленки, мембраны, волокна, гидрогели, оболочки, нано- и микрочастицы, губки и аэрогели.



Рисунок 1.2 – Сферы применения биополимеров

Большинство используемых в промышленности полимеров относится к группе полисахаридов из-за их улучшенных свойств по сравнению с другими категориями полимеров [13]. Широкий диапазон молекулярно-массового распределения и различного химического состава полисахаридов обусловлен существованием множества разных изомерных вариаций, возможных для сахаров, и различных химических связей, которые могут быть использованы для связывания отдельных моносахаридных единиц вместе [21], что предоставляет широкие возможности для модификации и изменения химической структуры. Также полисахариды являются наиболее широкодоступным в природе классом биополимеров: их получают из животных, растений, водорослей и микробных источников. Полисахариды высокостабильные, возобновимые, нетоксичные, биологически разлагаемые, относительно дешевые и гидрофильные по своей природе полимеры благодаря наличию функциональных групп, таких как амино- и карбоксильные группы, что предлагает фундамент для всевозможных модификаций [22]. В присутствии зарядов, полисахариды могут вести себя как полиэлектролиты со специфической способностью ионизироваться в водной среде. Ионизация способствует солюбилизации полиэлектролитов, и, кроме того, отвечает за их уникальные свойства. Отрицательные заряды обычно представлены карбоксильными группами ( $\text{COO}^-$ ) с рКа около 3-5 или сульфогруппами ( $\text{SO}_3^-$ ) с рКа около 0,5-1,5, положительно заряженные группы представляют собой группы аммония ( $\text{NH}_3^+$ ) с рКа около 7–10. Это позволяет проводить самосборку разноименно заряженных полисахаридов за счет взаимодействий между отрицательными и положительными группами [23]. Разработка гидрогелей на основе полисахаридов – один из лучших методов, на которых исследователи сосредоточили свое внимание в последние несколько лет для изучения различных приложений гидрогелей на основе полисахаридов [22].

## 1.3 Альгинаты как перспективный биополимер для биотехнологических применений

### 1.3.1 Структура альгинатов

Альгинаты – ( $C_{12}H_{20}O_{12}P_2$ , 418,23 г/моль) – водорастворимые природные полианионные полимеры из класса полисахаридов, неиммуногенные, нетоксичные и биоразлагаемые [12]. Этот термин обычно относится к альгиновой кислоте и ее солям, но он также может использоваться для всех производных альгиновой кислоты. Альгинаты – линейные биополимеры, состоящие из остатков 1,4- $\beta$ -D-маннуроной кислоты (M) и 1,4- $\alpha$ -L-гулуруновой кислоты (G), упорядоченных в гомогенные (-G-G-G-G-, -M-M-M-M) или гетерогенные (-M-G-M-G-) блоки (рисунок 1.3) [24-26].

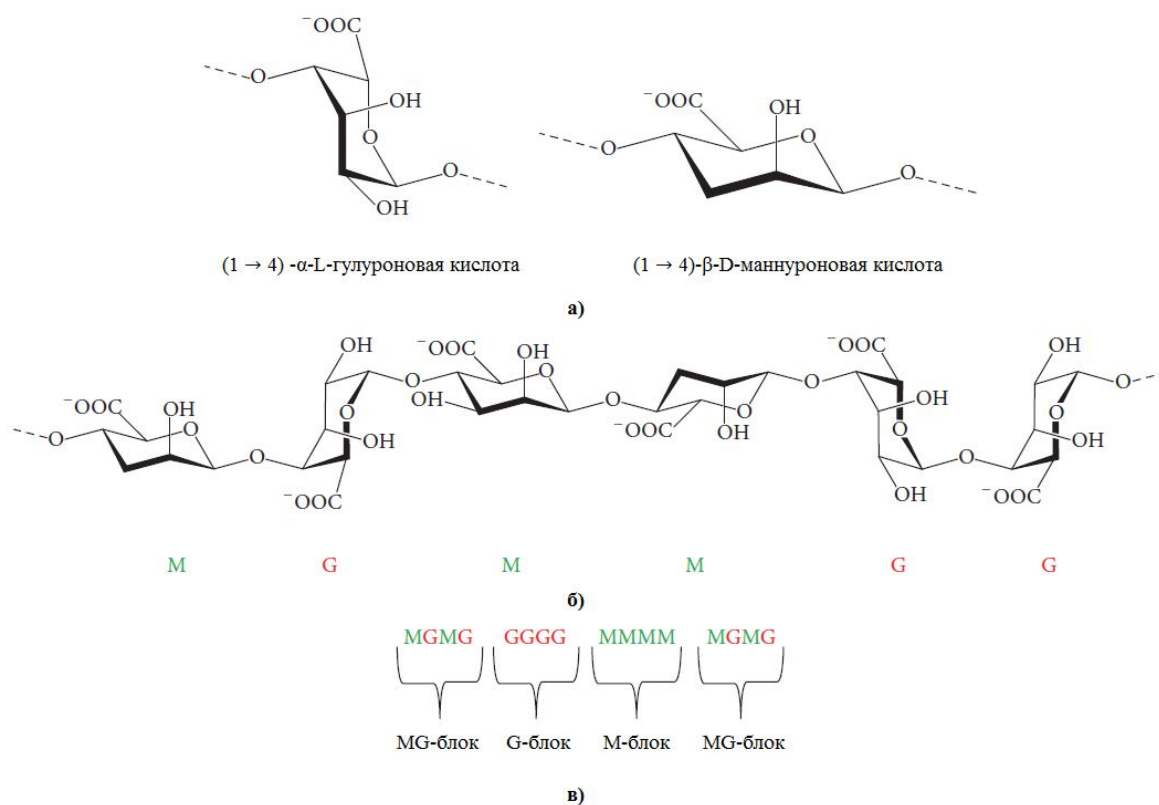


Рисунок 1.3 – Структура альгината: а) – мономеры; б) – конформация цепи; в) – распределение блоков

[24]

Из-за специфических профилей мономеров и способов их связывания в полимере, геометрии G-блоков, M-блоков и чередующихся областей значительно многообразны [27]. Молекулярная масса коммерческих альгинатов (выраженная как средняя величина всех молекул в образце) колеблется в пределах 32 000 – 400 000 г/моль [28]. Альгинаты, извлеченные из различных сырьевых источников, различаются остатками M и G, а также длиной каждого блока, и в зависимости от процентного содержания мономеров, альгинат и его соли доступны в 200 различных разновидностях [28, 29].

Как анионный полисахарид, альгинат имеет на поверхности полимерной цепи множество реакционноспособных отрицательно заряженных группировок (сайтов), которые могут быть использованы в химической модификации (рисунок 1.4) [30].

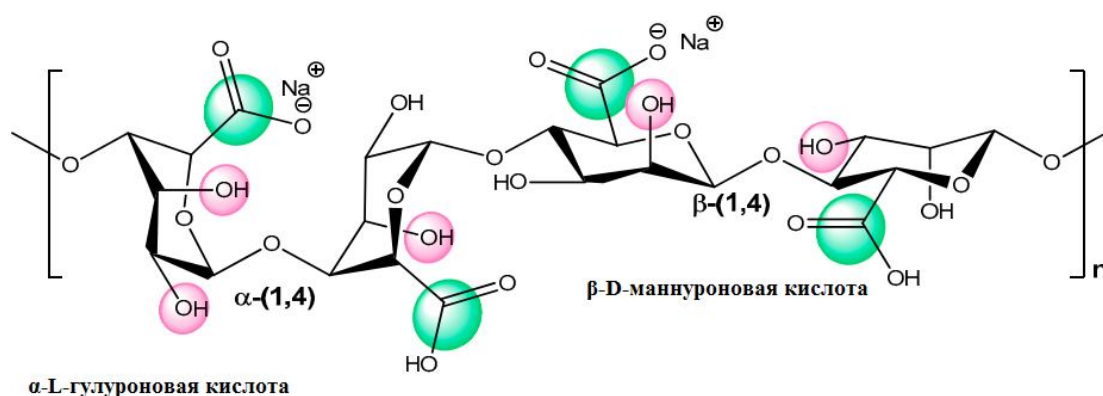


Рисунок 1.4 – Схематическое изображение реакционноспособных группировок альгинатного полимера, подходящих для химической модификации (выделенные зеленым цветом – карбоксильные группы, розовым – гидроксильные группы) [30]

### 1.3.2 Получение альгинатов

Альгинаты представляют собой неразветвленные полисахариды, присутствующие в клеточных стенках морских водорослей [31], а также некоторых бактерий, таких как *Azotobacter vinelandii* [32] и *Pseudomonas aeruginosa* [33]. Как правило, основными источниками коммерческого альгината являются бурые водоросли (*Phaeophyceae*): *Laminaria spp.* (*L. hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*),

*Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica*, *Nereocystis spp.*, *Cystoseira spp.*, *Alariaspp.* и *Sargassum spp.* [31, 34]. Принципиальное различие между альгинатами водорослей и бактерий по молекулярному уровню – наличие О-ацетильных групп у атомов С2 и/или С3 остатков маннуроновой кислоты в бактериальных альгинатах, которые влияют на вязкость и упругость альгината [35]. Микробный синтез позволяет получать альгинаты с разными составами, а также заданными физико-химическими свойствами и характеристиками, что представляет собой потенциальный коммерческий интерес [32], однако бактериальные альгинаты на данный момент широко коммерчески не доступны, и, кроме того, имеют больший молекулярный вес по сравнению с водорослевыми полимерами [36, 37].

Доля альгината в составе водорослей варьирует от 20 до 60% содержания сухого вещества, но в среднем виды бурых водорослей содержат 40% альгината. Альгинат в бурых водорослях встречается в виде гелей, содержащих ионы натрия, кальция, стронция, магния и бария, и располагается в межклеточных областях и клеточных стенках, являясь структурным веществом, обеспечивающим растению механическую прочность и гибкость. Его биологические функции в водорослях бывают структурного и ионообменного типа. Альгинат, обогащенный полиманнуроновой кислотой, содержится в молодой ткани клеточной стенки и/или межклеточных областях, тогда как альгинат, богатый полигулууроновой кислотой, обнаруживается в клеточной стенке; имея высокое сродство к  $Ca^{2+}$ , он в основном отвечает за прочность геля. Альгинатный полимер синтезируется в цитоплазме, а затем транспортируется на поверхность клетки [31].

Процесс экстракции альгината из морских водорослей и получения самой распространенной формы – альгината натрия, несложен, однако является многостадийной процедурой (рисунок 1.5), которая обычно начинается с предварительной обработки собранного, промытого и высушенного сырьевого материала с использованием разбавленной минеральной кислоты (такой как HCl).

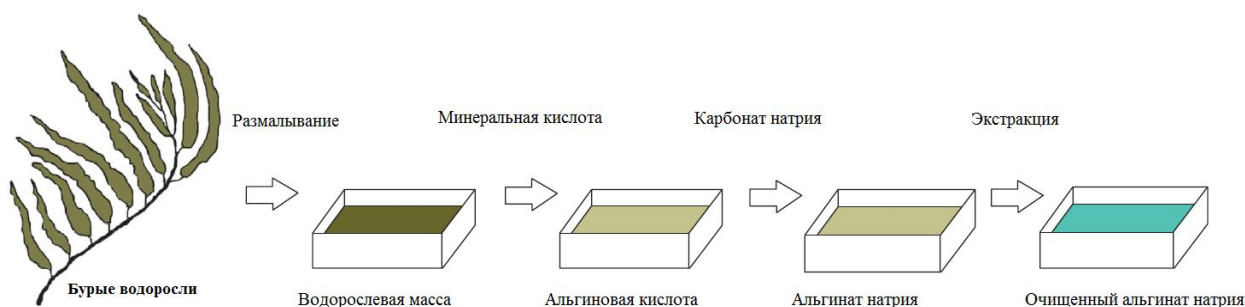


Рисунок 1.5 – Получение альгината натрия [24]

После дальнейшей очистки полученная альгиновая кислота переводится в форму водорастворимой натриевой соли в присутствии карбоната натрия (или посредством нейтрализации сильной щелочью). Нерастворимый остаток удаляют фильтрацией, флотацией или центрифугированием, и растворимый альгинат осаждается путем превращения обратно в кислоту или ее целевую соль [24, 31].

### 1.3.3 Основные свойства альгинатов

Альгинаты коммерчески доступны в различных категориях молекулярной массы, структуры и характера распределения М- и G-блоков (зависит от сырьевого источника); данные факторы ответственны за физико-химические свойства, такие как вязкость, золь/гель трансформация и способность поглощать влагу. Гелеобразующие свойства тесно связаны со структурой полимера и пропорциями М-, G- и MG-блоков [24, 27]. Увеличение содержания G-блоков в альгинате позволяет образовывать гели, являющиеся более жесткими, хрупкими и механически более стабильными. Они также обладают высокой пористостью, небольшой усадкой во время гелеобразования и никогда не набухают после высыхания. Напротив, альгинат, характеризующийся высокой долей М-блоков, формирует мягкие и более эластичные гели с пониженной усадкой и пористостью, однако в результате более высокой абсорбции воды проще обменивается ионами. MG-блоки в геле определяют его усадку и более высокую упругость [24, 27, 38].

Одной из главных особенностей и ценных свойств альгината является его способность к образованию гидрогелей с регулируемыми свойствами в мягких условиях и в присутствии двухвалентных катионов, таких как  $Ba^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ , которые

сшивают цепи полимера с образованием особой трехмерной структуры с G-блоками, т.е. так называемое ионотропное гелеобразование [21, 23, 38]. Механизм ионотропного гелеобразования более подробно будет рассмотрен далее в п. 1.4.1.

Альгиновая кислота не растворима в воде и органических растворителях, тогда как моновалентные соли и эфиры альгинатов являются водорастворимыми, формируя стабильные вязкие растворы [24, 38, 27]. 1% (масс./об.) водный раствор альгината натрия имеет динамическую вязкость 20-400 мПа·с при 20°C [24]. Вязкость альгината зависит от рН раствора: уменьшение значений рН вызывает увеличение вязкости из-за протонирования карбоксилатных групп в альгинатной основной цепи, что приводит к образованию водородных связей. Снижение рН ниже рКа альгинатных мономеров до 3,38–3,65 вызывает осаждение альгинатного биополимера. Также на растворимость альгинатных солей влияют такие факторы, как ионная сила и наличие гелеобразующих ионов. Увеличение молекулярной массы альгината может повлиять на физические свойства полученного геля (например, раствор альгината с высоким молекулярным весом становится очень вязким) [27]. Помимо молекулярной массы, способность альгинатов образовывать вязкие растворы может варьироваться в зависимости от их концентрации, рН растворителя, температуры и присутствия дивалентных ионов. Молекулы альгината с поли-М или поли-G структурой осаждаются при низком рН, в то время как альгинат с более гетерогенной структурой (MG-блоки) растворим при тех же условиях [24].

Однако из-за своих характеристик альгинат также имеет ряд недостатков, такие как плохая стабильность размеров, слабая прочность на разрыв, несовместимость с тяжелыми металлами и деполимеризация при термообработке (60°C), некоторые из которых невозможно исправить. Эти свойства могут быть улучшены при сочетании альгината с другими биополимерами, особенно на белковой основе, или с синтетическими полимерами, путем модификации или комбинирования обработок, применяемых во время производства [37].

### 1.3.4 Перспективы применения альгинатов

Альгинаты считаются одними из наиболее биосинтезируемых полимеров, причем 70% ежегодного производства альгината выделяется для фармацевтических и биомедицинских приложений, остальное преимущественно используется в пищевой промышленности [34]. Общий объем промышленного производства альгинатов составляет приблизительно 30 000 тонн/год [37]. Легкодоступность, простота получения и обработки вкупе с несколькими другими преимуществами, такими как биосовместимость, нетоксичность и неиммуногенность, привели к развитию множества применений на основе альгината в широком спектре отраслей, основными из которых являются пищевая, биомедицинская и фармацевтическая, а также косметическая промышленность и сельское хозяйство [12, 37]. Таким образом, альгинатные биополимеры крайне востребованы в различных биотехнологических сферах.

В биомедицине и фармацевтике альгинат ценится за ряд своих уникальных характеристик. Хелатирующие, биосовместимые, биоразлагаемые, мукоадгезивные, механические и вязкоупругие свойства альгината, а также отсутствие у него антигенности, способность к набуханию и формированию устойчивых гидрогелей, делают полимер привлекательным для ряда применений в рамках регенеративной медицины, таких как создание поддерживающих биоматериалов и имплантатов для тканевой (кожа, зубы, кости и хрящи) реконструкции, проектирование систем доставки лекарственных препаратов и клеток, а также получение лекарств, предотвращающих гастроэзофагеальный рефлюкс [39]. Важной сферой использования альгинатов в медицине является создание нетканых перевязочных материалов с пористой трехмерной структурой, способных набухать и обмениваться ионами с раневыми жидкостями, а в сочетании с другими антимикробными агентами (например, наночастицами серебра) предотвращают развитие инфекционных и воспалительных процессов, ускоряя заживление, что обычно используется для лечения экссудирующих повреждений или инфицированных хирургических ран [40-42].

Также были разработаны многочисленные системы доставки с контролируемым высвобождением лекарственных препаратов, созданные с



использованием альгината, такие как гидрогели [43], липосомы [44], наночастицы [45, 46], шарики, микросферы и микрокапсулы [47, 48] и др.

Изначальной и основной сферой применения альгинатов остается пищевая промышленность. Согласно документам Европейского агентства по безопасности продуктов питания (англ. European Food Safety Authority), альгиновая кислота и ее соли: натриевая, калиевая, аммониевая и кальциевая (пищевые добавки E400–E404), – разрешены для использования в количестве *quantum satis* в широком ассортименте продуктов питания, в том числе в продуктах для младенцев и детей младшего возраста со специальными медицинскими целями. Рассмотренные данные показывают, что альгиновая кислота и ее соли практически не абсорбируются в исходном виде независимо от применимой формы и не метаболизируются ферментами желудочнокишечного тракта, однако они частично ферментируются кишечной микробиотой человека без образования токсических продуктов. Данные об испытаниях токсичности на грызунах не проявили побочных эффектов при наивысшей испытанной дозе 13,5 мг альгината натрия/кг/день в 90-дневном исследовании. Также нет оснований для беспокойности в отношении генной токсичности альгиновой кислоты и ее солей [49].

Согласно Техническому регламенту Таможенного союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств», альгиновая кислота и ее соли (E400–E404) разрешены для применения в пищевой промышленности в качестве безопасных добавок для производства продуктов и продуктов диетического назначения, в том числе и для питания детей в возрасте от года до трех лет. Также альгинаты (в частности альгинат натрия) являются разрешенными вспомогательными средствами (материалами и носителями) для иммобилизации ферментативных препаратов для нужд пищевой промышленности. Максимальный уровень в продукции определяется технической документацией [50].

Вследствие уникальной способности к золь/гель трансформации в мягких условиях, в пищевой промышленности альгинат используется как гелеобразователь, загуститель, стабилизатор суспензий и эмульсий или эмульгатор [51]. Также альгинат в сочетании с другими натуральными субстратами используется для упаковки пищевых продуктов, в том числе съедобными пленками

и покрытиями (чаще всего для овощей, фруктов и мяса, а также некоторых водорастворимых порошковых продуктов) [36], представляющими собой тонкослойную биополимерную структуру, которую можно употреблять в пищу и которая обычно наносится на поверхность пищевых продуктов. Такие пленки и покрытия считаются барьером, предотвращающим потерю летучих ароматических соединений и для защиты продукта от повреждения микроорганизмами, и таким образом улучшающими срок хранения, безопасность и качество упакованных пищевых продуктов [52]. Таким образом, альгинатные пленки, а также капсулы (также в сочетании антиоксидантами, добавками, консервантами, красителями) помогают улучшить внешний вид продукта и сделать его более привлекательным для потребителя [37]. Также альгинат используется для получения различных гидрогелевых форм для включения в них различных пищевых ингредиентов. Особенно в качестве носителей ценятся альгинатные гелевые частицы, имеющие регулируемые химические и механические свойства [53]. Перечень биологически активных веществ и биообъектов для нужд пищевой промышленности, иммобилизованных в альгинатные частицы, довольно велик: ароматические соединения [54], масла и липиды [55-57], витамины и антиоксиданты [58, 59], белковые и ферментные препараты [60-63], пробиотические культуры [64, 65], микроводоросли [66] и т.д.

#### **1.4 Микрочастицы альгината как эффективные носители для иммобилизации различных биообъектов и биологически активных веществ**

Применение частиц гидроколлоидных гелей имеет огромные перспективы в различных прикладных биотехнологических приложениях в рамках пищевой, химической и фармацевтической промышленности. Альгинат, природный полисахарид, извлекаемый из бурых водорослей, также способен образовывать такие гели. Одной из технологических форм, в которой альгинатный гель часто используется, является форма гелевых частиц. Диаметр частиц альгинатного геля находится в следующем размерном диапазоне [53, 67]:

- 1) от 1 мм (макрочастицы);
- 2) от 1 до 1000 мкм (микрочастицы);

3) от 10 до 1000 нм (наночастицы).

Альгинатные гелевые частицы весьма привлекательны для различных биотехнологических применений и являются одними из самых часто используемых частиц гидроколлоидных гелей вследствие неоспоримых преимуществ самого альгината, таких как дешевизна, нетоксичность, биосовместимость и биоразлагаемость полимера [53, 68]. Получение частиц малого размера является наиболее предпочтительным и желанным направлением исследований и разработок технологий производства гидрогелевых носителей, т.к. диаметр шариков менее 1 мм облегчает массоперенос, улучшает параметры ферментации и биокаталитических реакций и минимизирует повреждение сфер в процессе их синтеза [69].

Термин «альгинатные микросферы» (АМ) часто используется в литературе как синоним для обозначения альгинатных микрогелей, альгинатных микрокапсул, альгинатных микрочастиц или альгинатных микрошариков [70]. Внутри самого семейства микросфер некоторые авторы выделяют отличия между формами альгинатного геля в зависимости от используемого метода иммобилизации. Например, если иммобилизованный биообъект находится на поверхности микрочастиц, их называют микроносителями [71]. В зависимости от способа инкапсуляции микросферы подразделяются на 2 типа: микрокапсулы и микроматрицы. Микроматрицы содержат инкапсулянт, равномерно диспергированный в полимерной матрице. В микрокапсулах инкапсулированный агент (лекарство, фермент, клетка и т.п.) является ядром частицы, покрытым полимерным материалом [68]. Инкапсулированное вещество внутри микрокапсулы может быть не только в сердцевине, но и располагаться агломератами во внутренних полостях частицы [72]. Таким образом, гелевые частицы могут существовать как одно- или многоядерные системы. В одноядерной (однослойной) системе материал ядра сосредоточен в середине геля, окруженного слоем альгинатной гелевой матрицы. Пример такой системы – это когда одна капля масла или клетка заключены в одиночной частице геля. В многоядерной системе сердцевинный материал участками диспергирован по всей гелевой матрице, что приводит к появлению многочисленных ядер внутри единственной частицы [73].

подавляющее большинство вышеперечисленных форм носителей получают методом ионного гелеобразования, при котором раствор альгината превращается в гель в присутствии двухвалентного катиона [70]. Альгинатные микрочастицы особенно ценятся за их применение в иммобилизации различных биообъектов и биологически активных веществ. Таким образом, основное применение альгинатных гелей в виде частиц – инкапсуляция пищевых, фармацевтических, биомедицинских и сельскохозяйственных материалов [53].

#### **1.4.1 Формирование альгинатных микрочастиц и техники их получения**

##### **1.4.1.1 Образование структуры «ячеистый контейнер»**

По сравнению с другими полисахаридами, такими как желатин или агар, альгинат может образовывать гель независимо от температуры. Образования альгинатных гелей можно добиться двумя основными способами: ионным сшиванием мультивалентными катионами/ионотропным гелеобразованием (ионные гели) или кислотным осаждением (кислые гели) [53]. При получении кислых гелей быстрое снижение pH приводит к осаждению альгиновых молекул в виде агрегатов при медленном и неуклонном падении pH. В отличие от ионных гелей, кислые гели альгината стабилизированы водородными связями и остатками М-блоков. Гели альгиновой кислоты менее изучены по сравнению с ионными гелями из-за ограниченного применения [74].

Способность образовывать ионный гель в присутствии поливалентных катионов является одним из наиболее ценных свойств альгината. Двухвалентные катионы, такие как кальций, барий и стронций, связываются преимущественно с G-блоками в альгинате и тесно взаимодействуют друг с другом, тем самым образуя гель. Связывание двухвалентного катиона с альгинатом – это высокоселективный процесс, и сродство альгината к катиону убывает в ряду: Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn [75], при этом сродство альгината к катионам зависит от количества G-блоков, присутствующих в альгинатной структуре, поскольку структура гулуонатных участков полимера обеспечивает высокую степень координации двухвалентных ионов [76]. Двухвалентные катионы могут

также связываться с различными блоковыми последовательностями, отличными от G-блоков в альгинате, например, ионы кальция способны связываться и с G-, и с MG-блоками [75]. Практическое применение высокотоксичных катионов, таких как Pb, Cu и Cd, ограничено. Дивалентные катионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  описаны как сшивающие агенты для получения альгинатных гелей. Однако использование ионов бария и стронция приводит к повышению стабильности и прочности микрошариков при связывании альгината с высоким содержанием G по сравнению с кальцием, но при этом проницаемость микрокапсул значительно снижена [75]. Кроме того, ионы  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  являются умеренно токсичными, тогда как ионы  $\text{Ca}^{2+}$  нет. Таким образом, именно катионы кальция являются наиболее широко используемым агентом для ионной сшивки альгината и для образования ионных альгинатных гелей [68].

Гелеобразование альгината происходит путем замены ионов натрия  $\text{Na}^+$  из остатков гулурановой кислоты на двухвалентные катионы и последующей укладкой этих гулурановых блоков с формированием характерной структуры [77], в результате чего быстро образуется гидрогель в мягких условиях [78]. Осуществляется совместное связывание двухвалентных катионов и областей G-блоков полимера, задействованный механизм в данном процессе – димеризация остатков гулурановой кислоты. Добавление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  к альгинатному полимеру вызывает связывание двух G-цепочек на противоположных сторонах. Эта группировка образует ромбовидное отверстие, состоящее из гидрофильной полости, которая связывает ионы  $\text{Ca}^{2+}$  за счет мультикоординации с использованием атомов кислорода карбоксильных групп. Эта прочно связанная конфигурация приводит к образованию зоны соединения в форме так называемого «ячеистого контейнера» (англ. «egg-box») (рисунки 1.6 и 1.7). Каждый катион связывается с четырьмя остатками гулураната в структуре «ячеистого контейнера», чтобы сформировать трехмерную сеть этих взаимосвязанных участков. В случае  $\text{Ca}^{2+}$  образование стабильного соединения требует от восьми до двадцати смежных остатков гулурановой кислоты [53].

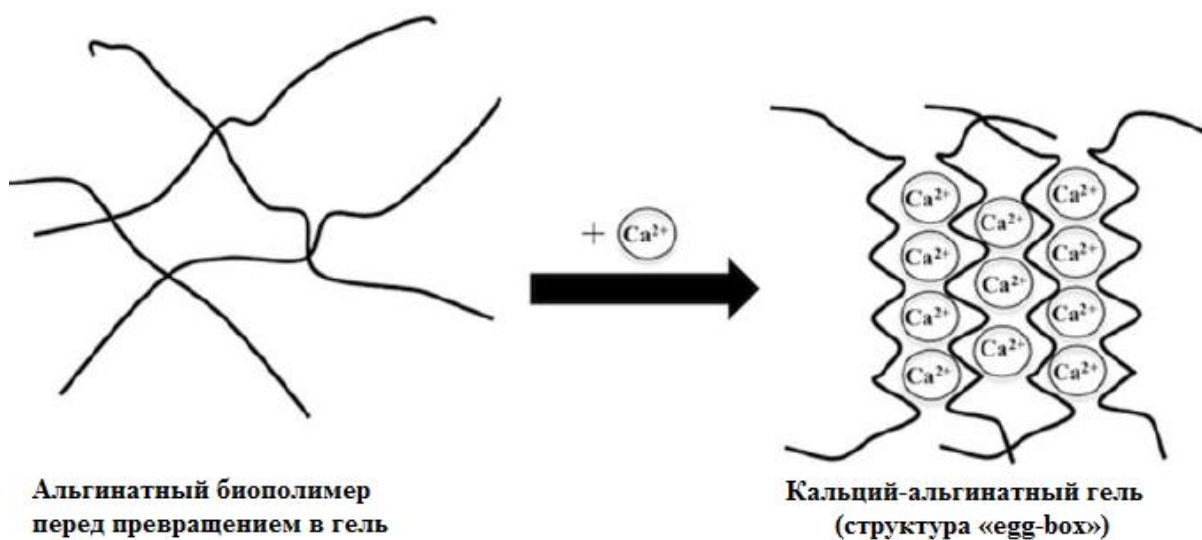
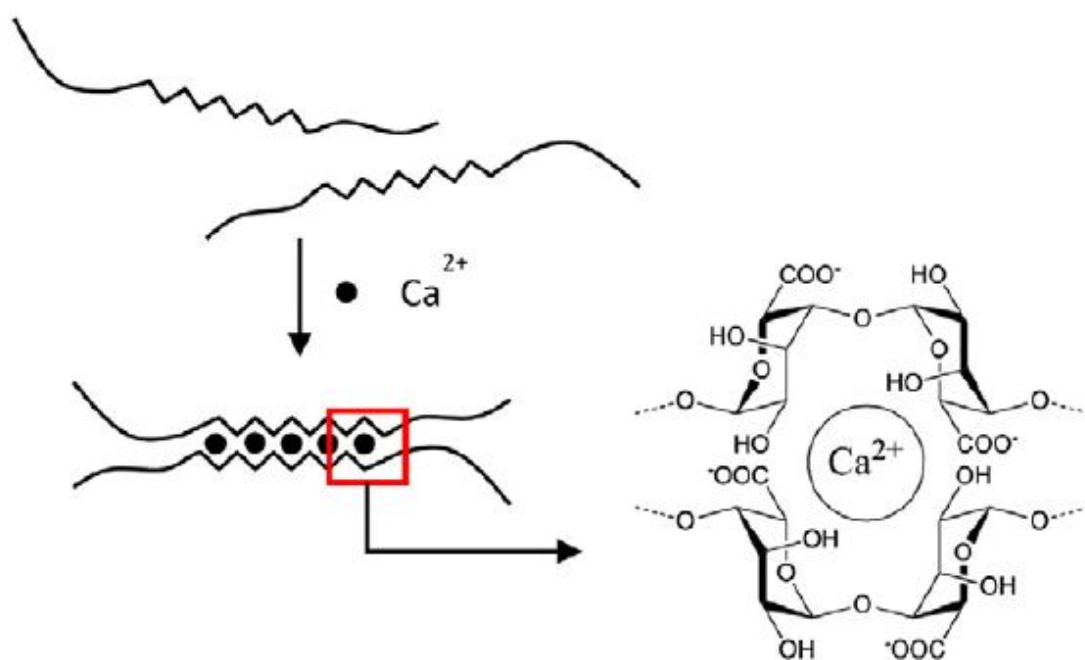


Рисунок 1.6 – Формирование структуры «ячеистый контейнер» во время образования ионного геля [53]



#### 1.4.1.2 Основные техники получения альгинатных микросфер

Количество исследований с описанием техник получения АМ значительно увеличилось в последнее десятилетие. Для получения микросфер с желаемыми

параметрами необходим выбор хорошо продуманного метода синтеза. Ряд параметров синтеза (концентрация альгината, масляная фаза, поверхностно-активное вещество, концентрации сшивающего агента и время сшивки, скорость перемешивания, морфология частиц, свойства и эффективность инкапсуляции) был исследован для улучшения физических, химических и биологических свойств микросфер [68]. Широкое применение частиц альгинатного геля в широком диапазоне областей, таких как продукты питания, микробиология, фармацевтика и медицина, привело к увеличению количества методов получения частиц альгинатного геля для каждого предполагаемого применения [53].

Альгинатные микросферы преимущественно получают с помощью 3 основных способов:

#### 1) Метод распылительной сушки

Распылительная сушка - это быстрый, непрерывный и одноэтапный процесс для получения микрочастиц в больших количествах. При распылительной сушке растворы альгината смешиваются с органическими реагентами и распыляются потоком горячего воздуха с получением сухих твердых микрочастиц. Получаемые частицы находятся в субмикронном-микронном диапазоне размеров (~10-50 мкм). Однако данный метод имеет низкий выход (20-70%) конечного продукта в лабораторных масштабах из-за потери продукта на стенках сушильной камеры и вследствие эмиссии отработанного воздуха, содержащего мелкие частицы (<2 мкм). Кроме того, метод имеет такие недостатки, как высокая стоимость, ограничение по вязкости для растворов альгината (максимально возможная вязкость полимера не превышает 300 сР), термическая нестабильность многих термолабильных веществ, что ограничивает применение данной технологии [79]. С помощью распылительной сушки были получены частицы с инкапсулированными в них различными биологически активными веществами, такими как гидрохлорид метформина [80], ретиноевая кислота [81], кофеин [82], инсулин [83], эластин [84], масло яванской бруцеи [85] и т.д.

#### 2) Экструзионные методы

Метод экструзии является самым простым и широко используемым методом изготовления альгинатных микросфер с использованием ионного гелеобразования альгината, которое включает в себя простую диффузию сшивающих ионов из

внешней среды в альгинатный раствор и последующую сшивку с формированием полимерных микросфер. В экструзионных методиках альгинатные растворы добавляются по каплям в сшивающий раствор (такой как хлорид кальция) [86-88]. Полученные экструзионным методом альгинатные микрочастицы использовались для инкапсуляции ряда биоактивных агентов, таких как, например, лекарственные препараты [88-90], пигменты и красители [91], белки и ферменты [92], клетки [93], вирусные частицы [94], антигены различных возбудителей болезней [95] и т.п.

При использовании инкапсуляции для иммобилизации того или иного биологически активного агента его диспергируют в растворе альгината, а затем эту смесь капают в гелеобразующую ванну, содержащую  $\text{CaCl}_2$ , через простой капельный инструмент (например, шприц или пипетку) или более сложные установки, например, системы игл из нержавеющей стали [86, 96, 97]. Размер получаемых частиц варьируется от сотен микрометров до миллиметров, и это – главный недостаток метода экструзии [98]. Например, размер частиц, получаемых простой экструзией, может достигать от 500-1000 мкм [71] и до 2-3 мм [99], что значительно затрудняет применение таких частиц в медицине и в пищевой промышленности, где требуется субмикронный и нано-диапазон размеров [98, 87, 53]. Размер частиц и их морфология в методе экструзии зависит от концентрации растворов альгината и сшивающего агента, вязкости полимера, диаметра иглы/насадки и высоты от катионной ванны до иглы [71]. Для преодоления основного недостатка экструзионного метода было разработано множество модификационных технологий для уменьшения размера бусинок, достижения их однородности и повышения выхода частиц, например, использование коаксиальных ламинарных потоков воздуха, электростатических потенциалов, вибрирующих и вращающихся насадок и механического разрезания жидких струй посредством вращения проволочек, установленных в режущий инструмент. Дополнительно варьируя диаметр насадок, частоты вращения режущих инструментов, скорость жидкостных и воздушных потоков или параметры электрического поля можно регулировать диаметр капель [71, 98]. Размер капель, достигаемый с помощью этих методов, может лежать в диапазоне от менее 50 мкм и до 3000 мкм [67, 98], например, в исследовании [91] были получены альгинатные микросферы со средним диаметром 212,9 мкм с помощью сочетания метода



коаксиальных газовых потоков и ионотропного гелеобразования; в исследовании [100] производили частицы диаметром менее 20 мкм вибрационным методом с использованием гармонических волн; в работах [101, 102] с помощью технологии резки струй добивались получения монодисперсных частиц в диапазоне от 200 мкм до 800 мкм, а с использованием механических вибраций – от 300 до 800 мкм. Однако все вышеописанные методы имеют проблемы в крупносерийном производстве и в масштабировании, потому что требуют большое количество игл/насадок, а также имеют определенные операционные проблемы, такие как засорение выходных отверстий и требование постоянной чистки [67]. Кроме того, микрочастицы альгината, получаемые путем прикапывания раствора альгината в гелеобразующую ванну, могут деформироваться и иметь каплевидную форму вследствие сил сопротивления, сопровождающих воздействие полимера с гелеобразующей ванной [103].

### 3) Метод эмульгирования/гелеобразования

Техника эмульгирования (эмульсификации)/гелеобразования включает в себя 2 этапа: образование стабильных полимерных капель в эмульсионной системе и последующее гелеобразование этих капель посредством сшивающего агента (ионотропная сшивка). Согласно этому методу, гелеобразование происходит, когда раствор альгината взаимодействует с ионами сшивающего агента [104]. Схематичное представление метода эмульгирования представлено на рисунке 1.8 [53]. С помощью эмульсификационных методов получали альгинатные микросферы, используемые в процессах иммобилизации большого количества биологически активных агентов и биообъектов: белков и ферментов [105, 106, 107], лекарственных препаратов [108, 109], эфирных масел [110], артокарпанона и аскорбиновой кислоты [111], клеточных культур [112, 113], тимола и низина [114], антигенов [115] и т.д.

При получении эмульсионных систем в методе эмульгирования используют преимущественно водные растворы полимеров и различные масла. Эмульсия – это двухфазная система, состоящая из капель одной жидкости, диспергированной в другой. Эмульсии в рамках эмульсификационного метода получения микрочастиц удобно классифицировать в соответствии с относительным пространственным распределением различных фаз. Эмульсия, состоящая из капель масла,

диспергированных в водной фазе, называется эмульсией масло-в-воде (англ. oil-in-water, O/W), в то время как система, представляющая капли воды, диспергированные в масляной фазе, рассматривается как эмульсия вода-в-масле (water-in-oil, W/O). Жидкость, образующая капли, обычно называется «дисперсной фазой», «дискретной фазой» или «внутренней фазой», тогда как окружающая капли жидкость известна как «диспергирующая фаза», «непрерывная фаза» или «внешняя фаза». Также возможно создание различных типов множественных эмульсий, например, масло-в-воде-в-масле (O/W/O), вода-в-масле-в-воде (W/O/W), масло-в-воде-в-воде (O/W/W) [116].

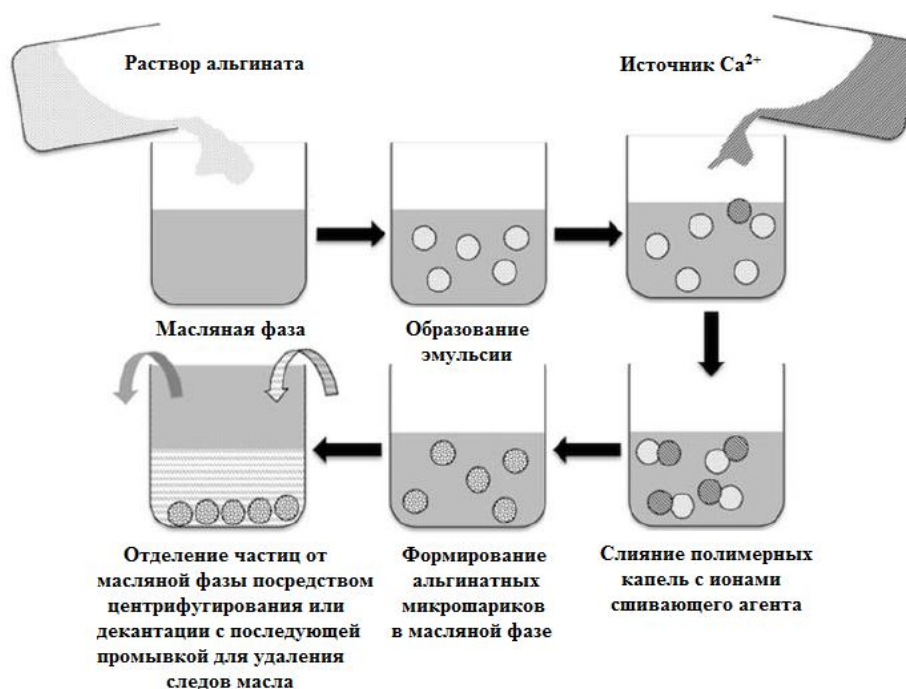


Рисунок 1.8 – Формирование микросфер альгината методом эмульгирования/гелеобразования

Таким образом, при выполнении техники эмульгирования первоначально водный раствор полимера диспергируется перемешиванием или встряхиванием в несмешивающейся жидкой органической фазе, такой как масло, с использованием эмульгирующих агентов (поверхностно активных веществ). При достижении равновесия в системе инициируется гелеобразование посредством добавления гелеобразователя в эмульсию – мультивалентных ионов сшивающего агента (таких как  $\text{Ca}^{2+}$ ). После затвердевания капель образованные микросферы отделяются от

системы и хорошо промываются [117, 118]. Эмульсификационный метод имеет неоспоримые преимущества: легко масштабируется, имеет низкую стоимость и простое оборудование, дает большой выход частиц с гомогенной морфологией; при этом, как правило, размер частиц, получаемых эмульгированием, намного меньше, чем при использовании экструзионных техник (может быть менее 100 мкм), и потому метод эмульгирования служит альтернативой экструзии [117, 119, 120]. Основным недостатком метода эмульгирования/гелеобразования состоит в том, что случайное слияние капель в методе может приводить к получению микрогелей, различающихся по размеру и формам частиц [121]. Такой большой разброс по диаметрам шариков может быть уменьшен посредством выбора источника кальция, самого альгината и условий эмульсификации [69]. Улучшенный физико-химический контроль может уменьшить полидисперсность получаемых микросфер альгината [122]. Таким образом, регулируя условия, при которых образуется водно-масляная эмульсия, возможно получение однородных микрошариков в разном размерном диапазоне [123, 124]. Поэтому, в зависимости от конкретных требований к частицам для использования их в определенном приложении, эмульсификационные методы изготовления позволяют контролировать размер частиц альгинатных микросфер [68]. Кроме того, необходима дополнительная процедура для отделения микрогелевых частиц из масляной фазы. Обычно для этого требуется фильтрование, легкое центрифугирование смеси или простая декантация с последующей стадией промывки специальными растворителями для удаления излишков масла [53].

#### **1.4.2 Внешнее и внутреннее гелеобразование**

Существует два основных типа гелеобразования: внутреннее и внешнее (рисунок 1.9)[125].

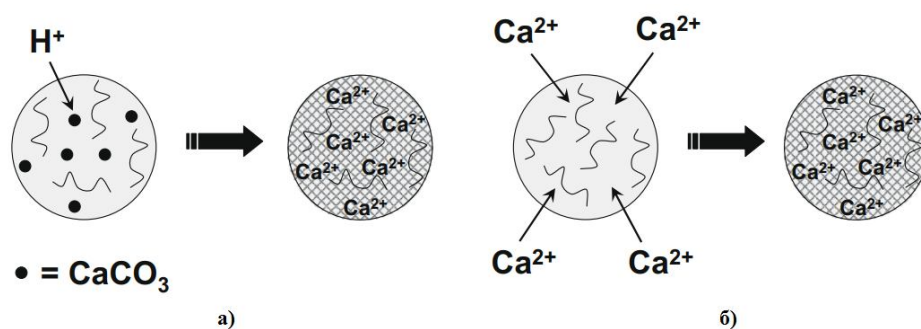


Рисунок 1.9 – Механизмы образования частиц гидрогеля ионотропным гелеобразованием: а) – внутреннее гелеобразование; б) – внешнее гелеобразование

Методы различаются способом ввода сшивающих ионов в альгинатный полимер [53]. Альгинатные гели, полученные путем внутреннего и внешнего гелеобразования, отличаются несколькими свойствами, такими как прочность матрицы, жесткостью, размером пор и проницаемостью. Следует отметить, что основные механизмы внутреннего и внешнего гелеобразования при получении как микро-, так и наночастиц, ничем не отличаются между собой [67].

Внешнее гелеобразование считается классическим типом и наиболее широко используемым методом получения альгинатных гидрогелей для иммобилизации как растворимых, так и нерастворимых препаратов. Типичным примером реализации данного процесса является экструдирование альгината в специальную гелеобразующую ванну, содержащую катионы, такие как раствор хлорида кальция. Образующиеся капли содержат только гелеобразующий биополимер, а ионы сшивающего агента диффундируют из внешней непрерывной фазы внутрь полимерных капель, и таким образом формируют гелевую альгинатную матрицу, мигрируя извне к центру капли, чтобы вызвать гелеобразование. При контакте ионы  $\text{Ca}^{2+}$  начинают сшиваться с цепями полимера на периферии альгинатной капли, что приводит к образованию полутвердой мембраны, покрывающей жидкое ядро [125, 126]. Когда процесс сшивки завершается, на периферии образуется больше Са-альгинатных сеток по сравнению с ядром частицы (т.е. зона быстрого гелеобразования движется от поверхности геля к центру, что приводит к высокой концентрации альгината на поверхности и низкой в центре). При использовании инкапсуляционного метода иммобилизации необходимый биологически активный агент диспергируется в растворе альгината с последующим капанием в ванну с

катионами сшивающего агента [126]. Этот метод также носит название диффузионного [67]. Обычно данный механизм гелеобразования используется в процессах экструзии и распыления [125]. Однако внешнее гелеобразование приводит к образованию гетерогенных альгинатных гелей из-за того, что гелеобразование на поверхности происходит раньше гелеобразования сердцевины капли, придавая частицам твердую (жесткую) внешнюю поверхность, что замедляет внутри диффузию ионов кальция через полимер, и, как следствие, мягкое ядро [127]. Кроме того, распределения частиц по размерам имеют тенденцию быть широкими, а также микросферы часто кластеризуются и группируются в скопления из-за трудностей контроля процесса в эмульсиях, т.е. нарушение равновесия эмульсионной системы может вызвать значительное слипание микрокапсул до их полного затвердевания [128]. Причинами случайного и неоднородного гелеобразования до надлежащего затвердевания считаются случайное разрушение эмульсии W/O, слияние капель разрушенной эмульсии, неравномерное распределение и диффузия добавленного  $Ca^{2+}$  [128]. Однако следует отметить, что неоднородность образовавшегося геля и более плотная периферийная матрица оболочки придает бусинке более высокий модуль упругости и препятствует обмену растворенными веществами между ядром частицы и внешней средой, тем самым повышая эффективность инкапсуляции, но при этом ограничивая возможности инкапсуляции живых клеток. Несмотря на проблему неоднородности, внешнее гелеобразование остается распространенным методом получения микрочастиц с разной морфологией из-за простоты одноэтапного процесса, не требующего инициатора гелеобразования [126]. Использование высокомолекулярного альгината и присутствие негелеобразующих ионов может приводить к образованию более однородного геля. Схематичный механизм формирования частиц внешним гелеобразованием представлен на рисунке 1.10 [67]

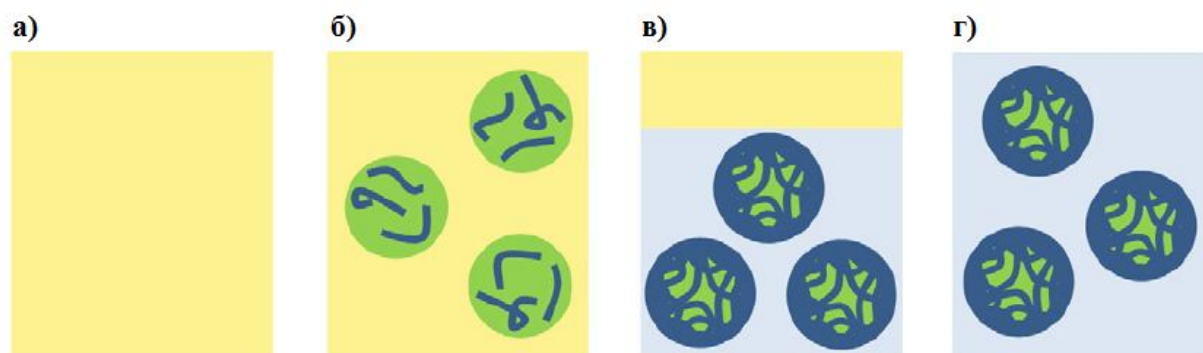
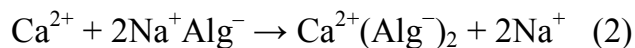
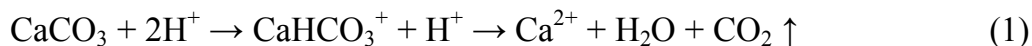


Рисунок 1.10 – Схематическое изображение образования альгинатных шариков эмульгированием/внешним гелеобразованием: а) – непрерывная масляная фаза; б) – эмульгирование раствора альгината в масляной фазе с образованием W/O-эмульсии; в) – добавление раствора  $\text{CaCl}_2$  к масляной фазе приводит к расслоению эмульсии и внешнему гелеобразованию альгинатных сфер с неоднородной сетчатой структурой; г) – промытые альгинатные частицы

Внутреннее гелеобразование, также называемое «внутренним застыванием» или «гелеобразованием *in situ*», предполагает использование нерастворимой в воде формы кальция, смешиваемой с раствором альгината и далее добавляемой в масляную фазу. Впоследствии катионы кальция высвобождаются внутри альгинатной фазы путем снижения значений рН среды и/или повышения растворимости источника кальция, в результате образуется альгинатный гель [67, 126]. Таким образом, при внутреннем гелеобразовании эмульгированные капли содержат гелеобразующий полимер и сшивающий агент в недиссоциированной (неактивной) форме (например,  $\text{Ca}^{2+}$  в форме  $\text{CaCO}_3$ ), тогда как непрерывная фаза содержит инициаторы гелеобразования (например, ионы  $\text{H}^+$ ), которые диффундируют в капли и вызывают высвобождение сшивающего агента и последующее гелеобразование [125, 129]. Таким агентом, диффундирующим из непрерывной масляной фазы к каплям альгината и инициирующим уменьшение рН и дальнейший процесс формирования частиц, может являться ледяная уксусная кислота [128, 126], или же медленно гидролизующийся D-глюконо- $\delta$ -лактон [130]. Снижение значений рН вызывает разложение карбоната кальция на углекислый газ, воду и катионы  $\text{Ca}^{2+}$ , которые сшиваются с альгинатным полимером изнутри. Т.к. сшивка и гелеобразование происходят внутри полимерных капель, данный

гелеобразующий механизм и получил название внутреннего [128, 126]. В формульном выражении реакция внутреннего гелеобразования выглядит следующим образом [131]:



Получаемые этим методом микросферы часто мягкие и имеют тенденцию к высокой агломерации вследствие слабого гелеобразования [125]. Однако, в противовес внешнему гелеобразованию, методом внутреннего гелеобразования возможно получать более однородную структуру гидрогелевой матрицы [67, 126], т.к. внутри альгинатной капли нерастворимая соль кальция диспергирована гомогенно, и ее разложение приводит к более равномерному распределению полимера в диспергированной капле при введении кислоты, и, как следствие – к равномерной сшивке цепей альгината и ионов кальция [126]. Связано это и с тем, что диффузия протонов от поверхности к сердцевине капле проходит через гель намного быстрее, чем ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что приводит к более однородной матрице [127]. Кроме того, выделение углекислого газа способствует образованию более пористой и рыхлой гелевой матрицы по сравнению с таковой у той, что получена путем внешнего гелеобразования. Данные особенности являются преимуществами микросфер, полученных методом внутреннего гелеобразования, для иммобилизации инкапсулянтов, требующих эффективного обмена растворенными веществами с внешней средой, таких как живые клетки и ферменты для биокаталитических процессов [126]. Это является важным отличием между структурами микросфер, полученными двумя методами. При внутреннем гелеобразовании молекулярная масса альгината имеет большее влияние на прочность геля, чем при внешнем. Альгинатные гели, полученные внутренним гелеобразованием, как правило, более подвержены синерезису, чем гели, полученные внешним гелеобразованием [67]. Разложение нерастворимых солей можно точно контролировать и изменять путем манипулирования pH [122]. Физико-химический контроль над процессом гелеобразования также позволяет проектировать морфологию частиц и изменять плотность гелевой матрицы.

Микрошарики в размерном диапазоне до 1000 мкм были успешно получены с использованием различных вариаций основного процесса [122, 132, 133]. Схематичный механизм формирования частиц внутренним гелеобразованием представлен на рисунке 1.11 [67].

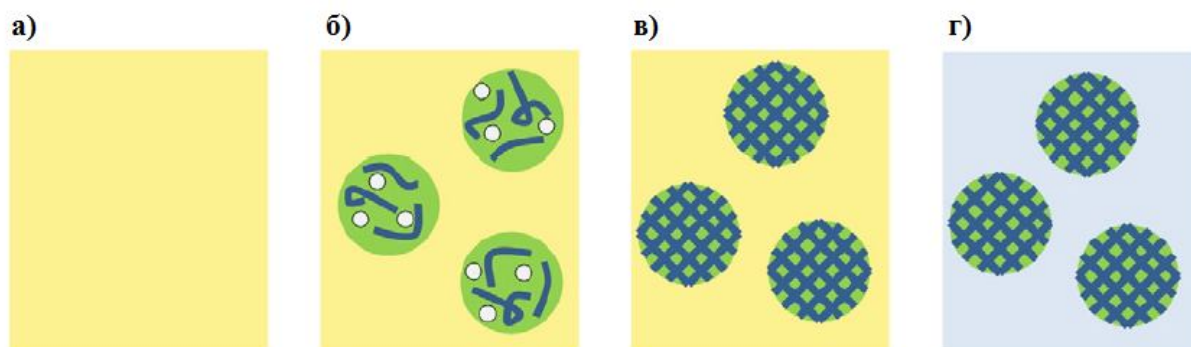


Рисунок 1.11 – Схематическое изображение образования альгинатных шариков эмульгированием/внутренним гелеобразованием: а) – непрерывная масляная фаза; б) – эмульгирование раствора альгината, содержащего нерастворимый источник кальция, в масляной фазе с образованием W/O-эмульсии; в) – солубилизация источника кальция за счет снижения pH внутри сфер приводит к внутреннему гелеобразованию альгинатных сфер однородной сетчатой структурой; г) – промытые альгинатные частицы

Таким образом, гелевые частицы, получаемые в рамках техники эмульсификации, но с помощью разных механизмов гелеобразования, имеют между собой конкретные отличия, т.е. тип гелеобразования определяет свойства альгинатных частиц и их применение. Частицы, полученные эмульгированием/внешним гелеобразованием, имеют более плотную неоднородную структуру с меньшими порами на поверхности частицы из-за градиента концентрации катионов (высокие концентрации на поверхности и низкие в сердцевине), что создает частицы с жесткой оболочкой и мягкой сердцевиной. Продолжительная диффузия  $Ca^{2+}$  в жидкое ядро приводит и к его затвердеванию, что делает частицы очень жесткими. Данные особенности делают микросферы менее проницаемыми. Кроме того, при использовании техники эмульгирования/внешнего гелеобразования больший средний диаметр шариков



обусловлен столкновением двух или более капель альгината и  $\text{CaCl}_2$  [128]. Частицы альгината, полученные через внутреннее гелеобразование, мягкие и имеют более равномерное распределение катионов по всему телу частицы, что приводит к более однородной структуре. При этом микросферы получаются более пористыми, чем при внешнем гелеобразовании [129, 133, 134]. Распределение по размерам микробусинок, полученных путем эмульгирования/внутреннего гелеобразования, зависит от размера капель эмульсии [128]. Сферическая форма микросфер, получаемых внутренним гелеобразованием, объясняется высокой степенью сшивки. Для микросфер, сделанных методом внешнего гелеобразования, морфология часто имеет отношение к дискообразной геометрии вследствие его гетерогенной сшитой структуры [133]. Регулируя дисперсность нерастворимой формы кальция и его разложение, можно контролировать внутреннюю морфологию и пористость микросфер, изменяя плотность гелевой частицы [122]. Проницаемость таких частиц позволяет использовать их в инкапсуляции биокаталитических систем и клеточных культур [67].

### **1.5 Метод внутреннего гелеобразования как техника получения микрочастиц альгината**

В конце 1980-х годов многие исследования были направлены на уменьшение размера полимерных частиц, стремясь при этом увеличить производительность процесса для возможности масштабирования для промышленных приложений. Был исследован метод эмульгирования, в соответствии с которым золь альгината диспергируется в масляной фазе микрокапельками, которые впоследствии превращались в гель за счет внешнего гелеобразования путем добавления раствора хлорида кальция в эмульсию. Метод давал большую продуктивность, однако бусинки имели тенденцию агрегироваться и сливаться в более крупные массы до момента их затвердевания из-за невозможности управлять размерами микросфер [126]. Немаловажным моментом, создающим некоторые трудности в использовании метода эмульгирования/внешнего гелеобразования, является и тот факт, что хлорид кальция (источник сшивающих ионов) нерастворим в масле [124].

В связи с этим механизм гелеобразования был модифицирован посредством введения контроля высвобождения ионов кальция.

Впервые техника эмульгирования/внутреннего гелеобразования с получением альгинатных микрочастиц была подробно описана в классической работе [69], где было показано, что она позволяет формировать сферы в субмиллиметровом диапазоне размеров (200-1000 мкм) с возможностью получения таких бусин в промышленном масштабе ( $\text{м}^3/\text{ч}$ ). Согласно методике, альгинат был диспергирован в масле канолы с добавлением сурфактанта Span 80 (2%), а внутреннее гелеобразование было достигнуто за счет быстрого высвобождения ионов кальция из нерастворимой его формы посредством мягкого подкисления маслорастворимой ледяной уксусной кислотой, добавленной с дополнительным небольшим объемом масла, и которая распределялась в водной фазе. Для разделения и извлечения микросфер из масляной фазы был добавлен эквивалентный объем 50мМ раствора хлорида кальция с последующим фильтрованием частиц через мембраны и отмывкой 1% раствором Tween 80. Микросферы продемонстрировали следующее распределение по размерам: 65-95% частиц диаметром 500 мкм, до 25% частиц диаметром 250 мкм, до 10% частиц диаметром до 150 мкм.

Первоначально Poncelet и др. использовали суспензию цитрата кальция. В попытках добиться большей гомогенности получаемых микросфер в работе [122] авторами в качестве источников кальция дополнительно были проверены карбонат, моногидрофосфат, оксалат и тартрат для получения частиц при pH 6,5-7,5 (для иммобилизации большинства живых объектов подходит именно данный диапазон). Исследование показало, что микрочастицы не были сформированы ни с оксалатом кальция, ни с тартратом; с фосфатом в качестве источника кальция соль формировала агломераты в центре микробусин, а также наблюдалось неполное и неравномерное гелеобразование, приводившее к слипанию частиц из-за крупных размеров зерен. Микросферы большего размера и с более сложным распределением размеров, характеризуемым двумя основными пиками распределения, были сформированы цитратом кальция в сравнении с карбонатом кальция, использование которого приводило к образованию одного пика в большинстве случаев, т.е. более однородными по диаметрам. Микросферы,

полученные с использованием карбоната кальция, были стабильными, а также более сферическими вследствие мгновенного гелеобразования при падении рН до 6-6,5, чем при применении цитрата; последние в значительной степени имели или эллипсоидную форму, или неровную волнистую поверхность. Таким образом, было показано, что использование карбоната кальция приводит к уменьшению доли частиц диаметром больше 500 мкм и увеличивает долю микросфер диаметром 150-500 мкм с небольшим увеличением доли сопутствующих микросфер (до 150 мкм) [122], что и обуславливает дальнейший выбор многими исследователями именно этой соли в качестве источника кальция в методе эмульгирования/внутреннего гелеобразования.

В работе [135] Cai и др. исследовали в качестве источника сшивающих катионов растворимый комплекс Са-ЭДТА (кальциевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), который находится в хелатной форме при нейтральном рН и высвобождает свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  при кислом рН. По сравнению с микросферами альгинат- $\text{CaCO}_3$  (средний диаметр  $323 \pm 21$  мкм), микросферы альгинат-Са-ЭДТА (средний диаметр  $343 \pm 26$  мкм) оказались чуть большего размера, но с более однородным распределением вследствие лучшего перемешивания с раствором альгината и, как следствие, образования более однородных капель во время эмульгирования. Также инкапсуляционная эффективность клеток *L. acidophilus* CGMCC1.2686 оказалась немного выше у микрокапсул альгинат-Са-ЭДТА, чем у альгинат- $\text{CaCO}_3$  ( $37,9 \pm 0,03\%$  против  $36,9 \pm 0,02\%$ ). Однако при этом микрокапсулы альгинат- $\text{CaCO}_3$  были сферической формы и с более высокой механической прочностью и плотной структурой, что обеспечило выживаемость клеток в микрокапсулах альгинат- $\text{CaCO}_3$  в три раза выше, в то время как частицы альгинат-Са-ЭДТА получились чешуйчатыми и слоистыми. Таким образом, было подтверждено, что при использовании карбоната кальция микрокапсулы обладают лучшими механическими свойствами и более плотной структурой, что обуславливает широкое применение именно данной нерастворимой формы кальция в методе эмульгирования/внутреннего гелеобразования. Однако попытки использовать иные источники кальция в улучшенных эмульсификационных методиках с внутренним гелеобразованием продолжают иметь место в различных работах.

Цуро и др. [136] инкапсулировали полифенолы какао в микрочастицы с эффективностью инкапсуляции 60% с использованием суспензий карбоната и цитрата кальция в качестве источников ионов кальция и различных сурфактантов (Span 80, 85, полиглицерин полирицинолеат (PGPR) и Span 80 + Tween 80) в качестве ПАВ. Микросферы были отделены и промыты от масла путем добавления 0,05 М раствора  $\text{CaCl}_2$  с 10% Tween 20. Исследование показало, что в диапазоне концентраций 0,05-0,15 М распределение размеров сфер не зависит от концентрации  $\text{CaCO}_3$  (35-90 мкм), в то время микросферы с 0,15 М цитрата кальция были аморфными (многие диаметром больше 1000 мкм), в то время как при концентрации цитрата 0,05 М образуются более мелкие сферы (15-45 мкм). Цитратные микросферы обладали однородной поверхностью, тогда как карбонатные кажутся шероховатыми вследствие пористой структуры. Также исследователи доказали, что увеличение доли в реакционной смеси эмульсификатора (Span 80, Span 85, Span80/Tween 80) не улучшает стабильность эмульсий, а PGPR же не только увеличивал стабильность, уменьшая коалесценцию капель и полидисперсность частиц.

Методика, разработанная Poncelet и коллегами, получила дальнейшее развитие в работах других исследователей, получая все новые и новые модификации, при этом основная суть техники и механизм гелеобразования оставались неизменными. Vandenberg и др. [134] предпринимали попытки объединить метод эмульсификации/внутреннего гелеобразования с экструзией, получая альгинатные микросферы путем капания раствора альгината, смешанного с  $\text{CaCO}_3$ , по каплям через иглу шприца, снабженную коаксиальным воздушным эжектором, в масло, содержащее растворимую в масле кислоту. Однако в этом случае присутствуют те же неудобства и недостатки, связанные с экструзионным методом.

Микрочастицы, получаемые методом эмульсификации/внутреннего гелеобразования, использовались для иммобилизации различных биологически активных веществ и агентов, в том числе чувствительных к условиям внешней среды. Например, в работе [137] методом внутреннего гелеобразования были получены альгинатные микросферы с модельным гормоном насекомых – экдизоном (фоточувствительным инсектицидом). Результаты показали, что

экдизон-альгинатные микросферы, полученные путем ассоциации, имели средний диаметр  $52,8 \pm 9,8$  мкм. Эффективность инкапсуляции и инкапсуляционный выход альгинатных микросфер, нагруженных экдизоном, составили около  $80,50 \pm 3,6\%$  и  $86,55 \pm 5,3\%$  соответственно. Гелевые микросферы дали более высокую фотостабильность экдизону: остаточный экдизон для альгинатных микросфер составил 84,8 и 52,4% после облучения УФ в течение 4 и 12 ч. Ahmed и др. [138] использовали модифицированную методику эмульсификации/внутреннего гелеобразования для получения лекарственных форм диклофенака натрия. Для извлечения гелеобразных микросфер из масляной фазы путем декантации к эмульсии добавляли 0,05 М раствор  $\text{CaCl}_2$ , содержащий 1% сурфактант Tween 80, и им же промывали от следов остаточного парафинового масла. Общий выход микрочастиц с инкапсулированным диклофенаком натрия составил 79,55% - 97,41%, а размер полученных микросфер – в пределах 100–890 мкм. Также авторами было показано влияние на размер частиц такого параметра, как скорость перемешивания: при скорости 200 об/мин были получены частицы большего диаметра (630-890 мкм), чем при скорости 600 об/мин (100-160 мкм).

Silva и др. [139] оптимизировали методику эмульгирования/внутреннего гелеобразования за счет использования молярного отношения уксусная кислота/ $\text{CaCO}_3$  2,5:1 (данное соотношение подбирали путем изменения объема кислоты), и извлечение микросфер ацетатным буфером привело к более высокой эффективности инкапсуляции модельного белка гемоглобина (выше 90%). Частицы, полученные этим методом, имели средний диаметр менее 30 мкм. Также исследователи использовали электростатическое покрытие частиц хитозаном для уменьшения пористости и повышения стабильности частиц и инкапсулянта. Микросферы, покрытые хитозаном, имели более высокий средний диаметр, чем непокрытые микросферы из-за агрегации в процессе нанесения покрытия ( $150,8 \pm 85,0$  мкм). В другом исследовании [140] Silva и др. получали микросферы с инкапсулированным инсулином диаметром  $53,0 \pm 12,9$  мкм и с использованием молярного отношения уксусная кислота/ $\text{CaCO}_3$  (3,5:1) и диспергированием в парафиновом масле с последующей промывкой ацетатным буфером (pH 4,5).

Как уже отмечалось выше, кальций-альгинатные микросферы, полученные методом внутреннего гелеобразования, имеют большую пористость по сравнению

с таковыми, получаемыми внешним гелеобразованием. При использовании лиофильной сушки происходит определенная степень разрушения микрочастиц вследствие высокой пористости, что приводит к потерям иммобилизованного агента в случае инкапсуляции. Поэтому в целях стабилизации и уменьшения пористости альгинатных микросфер, а также сокращения потерь биоактивных компонентов при включении их в микрочастицы, были предложены способы покрытия шариков катионным полимером, таким как хитозан, за счет полиэлектролитного комплексообразования, заключающемся во взаимодействии карбоксильных групп альгината и аминогрупп положительного поликатиона. Например, одной из таких первых работ является работа Ribeiro и др. [141], в рамках которой было проведено микроинкапсулирование модельного липофильного красителя Оранжевый Судан G посредством сложной эмульсии O/W/O (масло-в-воде-в-масле) в качестве системы контролируемого высвобождения жирорастворимых короткоживущих лекарственных препаратов. Для стабилизации и уменьшения проницаемости бусин был использован хитозан в качестве поликатионного аминного покрытия. Покрытие хитозаном обеспечило умеренное улучшение выхода инкапсуляции (до 80%), но при этом, чем выше высокая молекулярность хитозана, тем толще формирующиеся непроницаемые мембраны (до 142,5 мкм). Покрытие хитозаном обеспечило гладкую поверхность альгинатных микросфер, диаметр которых составил  $501 \pm 8$  и  $778 \pm 5$  мкм, что было выше такового у непокрытых частиц ( $489 \pm 32$  мкм). В другом исследовании [133] покрытые хитозаном микросферы получали непрерывным одноэтапным способом (без стадии отделения кальций-альгинатных частиц от водно-масляной эмульсии), для того чтобы упростить процесс нанесения покрытия, минимизировать потери белка во время процесса и во избежание выхода модельного белка гемоглобина в кислых условиях. Были получены сферические микросферы без покрытия со средним диаметром 20 мкм и эффективностью инкапсулирования более 89%. Покрытие обеспечивало аналогичную эффективность инкапсуляции, но был получен более высокий средний диаметр из-за слипания микрочастиц (до 250 мкм) вследствие сильного электростатического взаимодействия между двумя полимерами.

Микросферы, полученные методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, представляют собой эффективную матрицу для иммобилизации ферментных препаратов. Например, Liu и др. [142] провели иммобилизацию глюкозооксидазы ее адсорбцией на гидрофильной твердой поверхности кальций-альгинатных микрочастиц и с последующим покрытием 1% (масс./об.) хитозаном, что позволило избежать воздействия на фермент среды эмульсии. Во влажном состоянии средний диаметр микросфер составил 138 мкм, эффективность инкапсуляции  $83.1 \pm 0.6\%$  (об./об.), а относительная активность при этом  $174 \pm 18.3$  ед. Относительная активность иммобилизованной глюкозооксидазы демонстрирует сильную зависимость от концентрации хитозана. Активность иммобилизованного фермента с 0.5%-хитозаном в 6 раз выше, чем с концентрацией хитозана 0%, однако при дальнейшем увеличении концентрации хитозана до 1% и выше эффективность инкапсуляции и загрузка фермента постепенно уменьшаются. Авторы объяснили это тем, что при высоких концентрациях хитозана микросферы значительно сжимались, что привело к уменьшению площади поверхности для контакта с субстратом глюкозы и, возможно, происходила блокировка активного центра фермента с уменьшением видимой активности глюкозооксидазы. Покрытие хитозаном создавало более жесткую, компактную и менее пористую структуру частиц, позволяя повысить стабильность микрошариков при высушивании.

Wang и др. [143] использовали модифицированную методику эмульсификации/внутреннего гелеобразования для получения иммобилизованной формы глюкозооксидазы, используемой в хлебопечении. Микрочастицы получали многоступенчатой технологией с использованием ультразвука для наилучшего диспергирования микрокристаллического порошка карбоната кальция в золе альгината с последующей эмульсификацией в соевом масле с ледяной уксусной кислотой и с использованием Span 80 в качестве суфракта. Полученные микрошарики отмывались 2% (об./об.) раствором Tween 80 и дистиллированной водой, а далее фермент был иммобилизован на поверхности полученных микросфер с последующей инкубацией в 1% (мас./об.) растворе хитозана. Полученные микрочастицы с инкапсулированной в них глюкозооксидазой во влажном состоянии имели сферическую форму со средним диаметром около 26 мкм. Иммобилизованный фермент имеет большую термическую стабильность:

после 30 часов инкубации при 25°C остаточная активность составила 83% против 15,5% у свободного фермента. Активность иммобилизованного фермента по прошествии двух месяцев при хранении при 4 °C составила 70,4%, что заметно выше, чем остаточная активность 7,5% у свободного фермента. Эффективность инкапсуляции и загрузка фермента составили 91,1% и 41,5 (мг/г) соответственно, а активность составила  $6.56 \pm 0.24$  Ед.

Помимо биологически активных веществ и ферментов микрочастицы, получаемые методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, широко применяются для иммобилизации и более сложных биологических систем, например, клеточных культур. Особенно данный метод получения микросфер ценится в пищевой сфере для получения пробиотических препаратов для их защиты, направленного применения в пищевых продуктах и контролируемого высвобождения. Song и др. [128] производили микрочастицы (узкое распределение по размерам от 35 до 373 мкм при среднем диаметре  $151,1 \pm 77,2$  мкм) с инкапсулированными в них клетками пробиотических дрожжей Y235. Было показано, что равномерное включение дрожжей с высокой плотностью внутри альгинатных шариков не влияет на их целостность и сферическую форму, а жизнеспособность клеток достигла 77%. Holkem и др. [120] получали микрочастицы без покрытия размером  $77.84 \pm 0.54$  мкм с иммобилизованной культурой *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12, высушенные лиофильно. Частицы сохраняли стабильность при хранении при 7 и 18°C в течение 120 дней и при комнатной температуре (25°C) до 60 дней. В исследовании [144] были приготовлены микрокапсулы с использованием метода эмульгирования/внутреннего гелеобразования с хитозановым покрытием и без него и инкапсулированными клетками *Bifidobacterium longum*. Инкапсуляционный выход и средний диаметр составили  $95 \pm 2,5\%$  и  $154,3 \pm 3,5$  мкм для альгинатных микрокапсул, и  $90 \pm 3,4\%$  и  $190,1 \pm 2,4$  мкм для хитозан-покрытых микрокапсул. Размер покрытых частиц был больше из-за полиэлектролитной мембраны на поверхности альгинатных капсул, образованной хитозаном. Кроме того, покрытие обеспечивало лучшую сферичность микрошариков после процесса лиофилизации.

В работе [145] метод эмульгирования/внутреннего гелеобразования использовался для инкапсуляции экстракта семян тропического дерева *Vixa*



*orellana* (аннато) с использованием эмульсификации в подсолнечном масле и с последующим отделением микросфер центрифугированием с обезжириванием петролейным эфиром. При использовании 0,3% уксусной кислоты и соотношении альгината-масло как 1:5 инкапсуляционный выход частиц составил  $56,51 \pm 3,18\%$  (что ниже значений при использовании экструзионного внешнего гелеобразования, составляющих  $88,06 \pm 0,55\%$ ). При низких концентрациях уксусной кислоты и соотношении альгината к гелеобразующему раствору выход частиц снижался. При этом размер частиц, полученных внутренним гелеобразованием, составил  $697,147 \pm 20,395$  мкм с более компактной внутренней структурой против  $2291,040 \pm 19,213$  мкм у частиц, полученных внешним гелеобразованием. Таким образом, авторы подтвердили основные закономерности в формировании частиц обоими методами гелеобразования в рамках эмульсификационного способа получения микросфер.

Таким образом, метод эмульгирования/внутреннего гелеобразования со всеми возможными модификациями находит широкое применение для иммобилизации различных биологически активных веществ и биообъектов.

## **1.6 Глюкозооксидаза**

### **1.6.1 Структура, свойства и продуценты фермента**

Глюкозооксидаза (код Комиссии по ферментам ЕС 1.1.3.4;  $\beta$ -D-глюкоза: кислород 1-оксидоредуктаза; GOx) – флавопротеин, относящийся к группе оксидоредуктаз. GOx относится к семейству глюкоза-метанол-холин (GMC) оксидоредуктаз, которое включает в себя множество других незаменимых в промышленности катализаторов, особенно в области диагностики, например, холестериноксидазу, холиноксидазу, метанолоксидазу, алкогольоксидазу, аминокислотную оксидазу и пиранозоксидазу [146]. GOx можно получить из большого количества различных источников, включая красные водоросли, цитрусовых, насекомых, бактерий, растений, животных и грибов. Роль данного фермента в клетках заключается в том, чтобы действовать в первую очередь как антибактериальный и противогрибковый агент за счет генерации  $H_2O_2$  [147].

Промышленное значение имеет глюкозооксидаза, выделенная из различных грибных источников. Грибы как клеточные фабрики продукции ГОх обладают великолепными способностями к использованию различных источников углерода и накоплению большей части фермента в стрессовых условиях [148]. Поскольку ГОх из грибов имеет широкий спектр применения, фермент должен быть стабильным при более высоких температурах и в течение более длительного времени, чтобы его можно было экономно использовать [147]. Промышленными продуцентами глюкозооксидазы являются мицелиальные грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*, среди которых именно *Aspergillus niger* чаще всего используется для получения наибольших объемов фермента. Другими грибными источниками глюкозооксидазы из рода *Aspergillus* являются *A. tubingensis*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. carbonarius*, and *A. nidulans*, из рода *Penicillium* – *P. amagasakiense*, *P. variable*, *P. chrysogenum*, *P. notatum*, *P. funiculosum*, и *P. adametzii*. [147]

Типичные проблемы, с которыми обычно встречаются во время производства глюкозооксидазы, это либо низкая производительность, либо наличие контаминантных (сопутствующих) ферментов (каталаза, целлюлаза и амилаза). Для преодоления данных трудностей и увеличения продуктивности используются инструменты генетической и негенной инженерии [149].

Глюкозооксидаза, выделенная из аскомицетов – димерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных субъединиц (80 кДа, теоретический размер 63,5 кДа), действующих как окислительно-восстановительный носитель в катализе и представляющих собой идентичные полипептидные цепи, которые ковалентно связаны вместе с помощью дисульфидных связей (581 аминокислотный остаток на мономер). Холофермент содержит две молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД) в качестве кофактора, по одной на каждую субъединицу белковой молекулы, нековалентно связанных с активным центром, и восемь потенциальных сайтов N-гликозилирования [149-151]. Остатки Asn89, Asn161, Asn355 и Asn388 представляют собой сайты присоединения фрагментов N-ацетилглюкозамина. Сайт Asn89 содержит расширенную углеводную структуру, состоящую из второго N-ацетилглюкозамина и трех молекул маннозы. Этот углеводный фрагмент образует мостик между двумя молекулами димера белка [149]. Молекулы ФАД тесно, но нековалентно связаны с апоферментом (зафиксированы водородными связями).

Солевые мостики и водородные связи дополнительно стабилизируют белковые димеры [149]. На простетическую группу приходится от 0,2 до 2% общего молекулярного веса [150]. Активный центр фермента содержит, помимо ФАД, три боковые цепи аминокислот, которые непосредственно участвуют в катализе: His516, Glu412 и His559, которые действуют как общие основания и кислоты в восстановительных и окислительных полуреакциях окисления  $\beta$ -D-глюкозы. His559 прочно связан с Glu412 водородной связью и с одной молекулой воды перед флавиновым кольцом [152]. Строение глюкозооксидазы приведено на рисунке 1.12 [153]. Из кристаллической структуры можно наблюдать расстояние около 17–22 Å между активными центрами и поверхностью фермента.

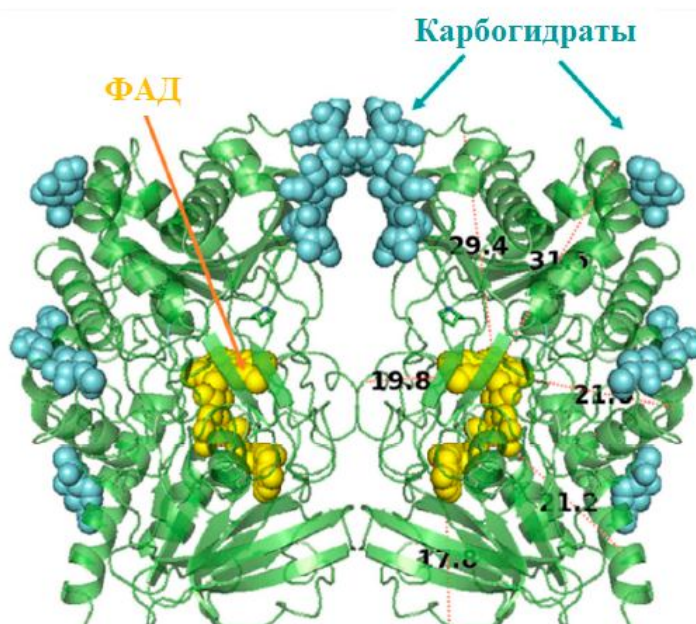


Рисунок 1.12 – Кристаллическая структура глюкозооксидазы из *Asp. niger*

Гликозилированная глюкозооксидаза из *A. niger* представляет собой несколько вытянутый глобулярный белок с осевым соотношением 2,5:1, со стандартной величиной 8 нм и неполным частичным объемом 0,75 мл/г. Молекулярная масса 150-160 кДа (молекулярная масса зависит от степени гликозилирования [153]). Общее содержание углеводов составляет 16-17%, состоит из D-маннозы (около 14% от общей массы фермента), D-глюкозы и D-глюкозамина. Температурный диапазон 30-40 °С (оптимум), рН 4,0-6,5 с изоэлектрической точкой в диапазоне рН 4-5 (pI 4,2). Ингибиторами фермента

являются ртуть, медь, свинец и серебро в микромолярных количествах; угнетающим является воздействие миллимолярных количеств арсенитов, п-хлормеркурибензоата, ацетата фенилмеркуриновой кислоты, гидразина, гидроксилamina и фенилгидразина; галогенидные частицы подавляют фермент при низком pH; полиамины также угнетают работу фермента [149-151, 154].

### 1.6.2 Катализируемая реакция

Глюкозооксидаза катализирует окисление  $\beta$ -D-глюкозы по C-1 позиции до D-глюконо- $\delta$ -лактона ( $\delta$ -глюконо-1,5-лактона) и  $H_2O_2$  с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов. Эта реакция может быть разделена на две стадии: восстановительную и окислительную [150].

Каталитическое действие глюкозооксидазы зависит от кофактора ФАД, который действует как начальный акцептор электронов (в виде гидрида). На восстановительной стадии фермент, отщепляя два атома водорода от молекулы субстрата, катализирует окисление  $\beta$ -D-глюкозы до D-глюконо- $\delta$ -лактона, который, являясь слабым конкурентным ингибитором GOx, затем гидролизуется до глюконовой кислоты. Скорость, с которой происходит гидролиз, зависит от pH: при pH 3.0 она очень мала, но при pH 8.0 период полураспада составляет около 10 минут. Кольцо ФАД восстанавливается до ФАДН<sub>2</sub>. В процессе окислительной стадии реакции ФАДН<sub>2</sub> окисляется, передавая электроны (в виде гидрида) на молекулярный кислород, который восстанавливается до перекиси водорода [149, 150]. Установившаяся кинетика окисления  $\beta$ -D-глюкопиранозы молекулярным кислородом подчиняется кинетическому механизму пинг-понг [147]. Во время восстановительной реакции  $\beta$ -D-глюкопираноза окисляется до D-глюконо- $\delta$ -лактона посредством переноса протона от его C1-гидроксила к основной группе на поверхности фермента (His516), и происходит прямой перенос гидрида из положения C1 в положение N5 изоаллоксазинового кольца ФАД. Окислительная реакция происходит через одно- или двухэлектронные механизмы переноса, в зависимости от типа окисляющего субстрата (кислород, бензохиноны, нафтохиноны, соли ферроцена, органические металлокомплексы и др.). В случае с кислородом он очень быстро диффундирует в активный центр (диффузия O<sub>2</sub> к

активному центру термодинамически облегчено), а восстановленный кофермент повторно окисляется до ФАД кислородом, который восстанавливается до перекиси водорода. Эта реакция проходит через две стадии одноэлектронного переноса, а супероксид-анион и семихиноновый радикал флавина являются промежуточными продуктами реакции [152]. Подробный механизм каталитической реакции представлен на рисунке 1.13 [149].

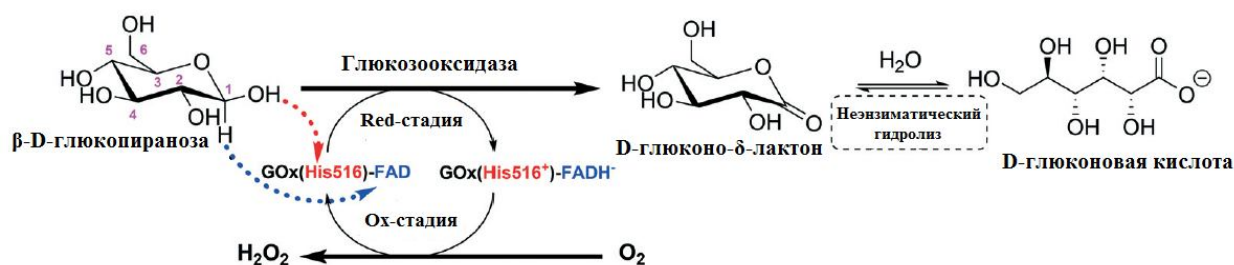


Рисунок 1.13 – Механизм окисления  $\beta$ -D-глюкозы в присутствии GOx до D-глюконо- $\delta$ -лактона с его последующим неэнзиматическим гидролизом до D-глюконовой кислоты [149]

Конечные продукты реакции в клетке распадаются самопроизвольно и каталитически. В частности, D-глюконо- $\delta$ -лактон впоследствии может медленно гидролизироваться неэнзиматически или ферментом лактоназой до D-глюконовой кислоты, а образующаяся перекись водорода  $H_2O_2$  расщепляется до кислорода ( $O_2$ ) и воды ( $H_2O$ ) каталазой [147].

Глюкозооксидаза обладает высокой субстратной специфичностью по отношению к  $\beta$ -D-глюкозе, в то время как  $\alpha$ -аномер не является подходящим субстратом (0,64% активности относительно  $\beta$ -аномера). Фермент проявляет низкую активность при использовании 2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы и D-ксилозы в качестве субстратов [150]. Из всех ферментов, окисляющих глюкозу, которые известны в настоящее время, глюкозооксидаза является самым изученным из-за высокой степени специфичности [147].

### 1.6.3 Перспективы применения глюкозооксидазы

Глюкозооксидаза является важным ферментом в различных биотехнологических приложениях. Фермент широко используется в различных секторах пищевой промышленности для использования в хлебобулочных изделиях, сухом яичном порошке, напитках и в производстве глюконовой кислоты. Также GOx широко используется в медицинской диагностике и фармацевтической, химической, текстильной и других биотехнологических отраслях, а также в охране окружающей среды и в биоэнергетике [147, 150].

В настоящее время GOx обычно применяется в составе биосенсорных систем, например, в биомедицине в составе диагностических наборов для определения уровня глюкозы в крови, сыворотке и плазме либо колориметрическим, либо амперометрическим анализом, что более эффективно, чем ферментативные методы вследствие высокой субстратной специфичности фермента по отношению к  $\beta$ -D-глюкозе. Например, глюкозооксидаза может быть иммобилизована в полианилин-нановолокно на поверхности графитового электрода для получения эффективного электрода с чувствительностью 1,09 мА/мМ и временем отклика для получения максимального пикового тока 25 секунд. Таким образом, можно использовать биосенсоры на основе GOx при анализе содержания глюкозы в крови [155].

Вдобавок, глюкозооксидаза используется, в сочетании с другими ферментами, такими как пероксидаза хрена (HRP), для создания мультиферментных систем для катализа каскадных химических реакций в различных секторах пищевой и медицинской промышленности [156, 157, 158, 159]. Каскадную реакцию можно описать как реакцию, в которой продукт одного фермента является субстратом другого, и конечный продукт является целевым [149]. Мультиферментная система глюкозооксидаза-каталаза используется в промышленности как для удаления глюкозы, так и для удаления кислорода [151], а также в производстве D-глюконовой кислоты. Каталазы катализируют разложение вырабатываемой глюкозооксидазой перекиси водорода (которая является побочным продуктом при получении глюконовой кислоты) на воду и кислород без риска развития некоторых нежелательных побочных реакций. Фактически,

каталазы производят кислород, который снова может использоваться глюкозооксидазой, даже улучшая ее активность. Поэтому в большинстве случаев исследователи используют ко-иммобилизацию данных ферментов [149]. Таким образом, основным и важным применением ГОх является получение D-глюконовой кислоты или производство перекиси водорода, в т.ч. и с использованием каскадных реакций.

В индустрии консервирования пищевых продуктов биоконсерванты, такие как хитозан, антибактериальные пептиды (например, низин), лизоцим и глюкозооксидаза, имеют более безопасный и лучший эффект для отсрочки порчи пищевых продуктов по сравнению с традиционными химическими консервантами. ГОх используется в качестве консерванта со значительным антибактериальным действием против *Pseudomonas fragi*, энтеротоксигенной *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* и *Vibrio parahaemolyticus* в обводненных продуктах; следует отметить, что эти бактерии связаны с контаминацией пищевых продуктов и вызыванием опасных заболеваний у человека [160]. Также ГОх (обычно в сочетании с каталазой) эффективно используется в качестве сильного антиоксиданта и стабилизатора из-за способности фермента удалять кислород и предупреждает потерю цвета и вкуса различных напитков, включая рыбу, консервы, пиво, безалкогольные и энергетические напитки. Глюкозооксидаза также используется для удаления глюкозы во время производства яичного порошка, предотвращая его потемнение [161].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ

Анализ литературных данных показал перспективность применения микрочастиц на основе биополимера, выделяемого из бурых водорослей – альгината. Приведена сравнительная характеристика основных способов получения альгинатных микрофер, описаны преимущества метода эмульгирования и основные этапы процесса. Рассмотрены механизмы внешнего и внутреннего гелеобразования и основные различия микрочастиц, получаемых с помощью каждого метода. Анализ доступной литературы свидетельствует о том, подавляющее число работ по иммобилизации биологических объектов

использованием в качестве носителей альгинатных микрочастиц, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, сосредоточено вокруг использования физических методов (инкапсуляция, адсорбция). Такие методы иммобилизации способны сохранить значительную долю активности инкапсулятов, однако не обеспечивают прочность связи с матрицей, что может быть приемлемо только в определенных прикладных сферах. В связи с этим представляет интерес изучение химических методов иммобилизации энзимов на альгинатных микросферах и оценка ее эффективности в биотехнологических процессах, а также определение активности полученных таким образом биокатализаторов.



## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: глюкозооксидазу из *Aspergillus niger* (GOx, «Faizyme»), альгинат натрия (ООО НПФ «Химмедсервис», РФ), карбонат кальция («Реахим», РФ), подсолнечное масло (ООО «Аквилон», РФ), ледяную уксусную кислоту (ООО НПФ «Химмедсервис», РФ), Span 80 («Sigma-Aldrich»), Tween 80 («PanReac»), дистиллированную воду, N-гидроксисукцинимид (NHS, «Acros Organics»), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этил-карбодиимид гидрохлорид (EDC, карбодиимид, «Fluka»), растворимый крахмал Линтнера (ООО НПФ «Химмедсервис», РФ), молибдат аммония («Реахим», РФ), йодид калия («Реахим», РФ), D-глюкоза (ООО НПФ «Химмедсервис», РФ), пероксид водорода (ООО «Росбио», РФ), фосфатный буферный раствор (ООО «Уралхиминвест», РФ) с различными значениями pH (3,71; 4,215; 5,15; 6,0; 7,0; 8,715; 12,081); азокраситель кумасси бриллиантовый синий G-250 («Sigma-Aldrich»); концентрированная фосфорная кислота («Реахим», РФ); спирт этиловый ректификованный 96%-ный (ООО НПФ «Химмедсервис», РФ).

### 2.2 Получение альгинатных микросфер методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования

0,08 г микрокристаллического порошка карбоната кальция  $\text{CaCO}_3$  добавляли в 20 мл 1,5 % масс. раствора альгината натрия при постоянном перемешивании (отношение  $\text{Ca}^{2+}$ /альгинат 1:3,75 мас.). Полученная суспензия диспергировалась в 40 мл подсолнечного масла с добавлением Span 80 (2% об.) и интенсивно перемешивалась в течение 2 минут. После эмульгирования в смесь добавляли 30 мл подсолнечного масла, содержащего 2% (об.) Span 80 и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты (отношение гидрофильной и гидрофобной фаз 1:3,5 об.). Интенсивное перемешивание продолжалось в течение 10 минут. Далее в смесь добавляли 150 мл дистиллированной воды (отношение гидрофильной и гидрофобной фаз 2,4:1 об.), перемешивание продолжалось при умеренной интенсивности в течение 30 минут.

Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных микросферот масляной фазы добавляли 250 мл осаждающего раствора 0,05М хлорида кальция, содержащего 1% (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждали из масляной фазы, которая удалялась из системы декантацией. Далее осадок альгинатных микросфер промывали 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Далее микросферы отмывали несколько раз дистиллированной водой до полного удаления следов масла, наблюдаемых в поле оптического микроскопа.

### 2.3 Иммуобилизация глюкозооксидазы

Полученные альгинатные микросферы выдерживались в течение 12 часов в 50 мл раствора, содержащего карбодиимид и N-гидроксисукцинимид(молярное соотношение 2:1) для активации карбоксильных групп альгинатных микросфер. Глюкозооксидаза ковалентно связывалась с поверхностью носителя за счет образования пептидной связи [162]. Схема активации карбоксильных групп альгината натрия карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом представлена на рисунке 2.1.

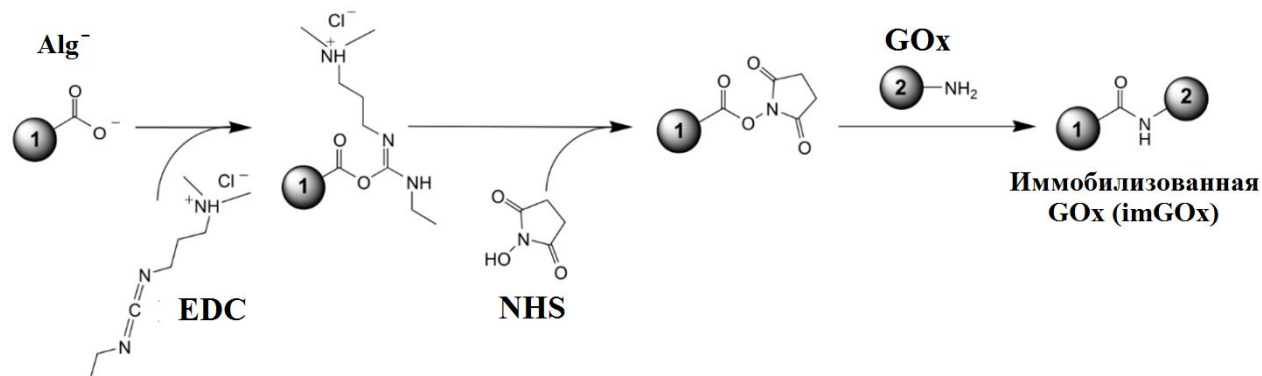


Рисунок 2.1 – Схема активации карбоксильных групп альгината натрия карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом  
(1 – альгинатные микросферы, 2 – глюкозооксидаза)

Далее микрочастицы промывались дистиллированной водой, выдерживались в течение 6 часов в растворе GOx в буферном растворе (pH = 6,0), снова

промывались дистиллированной водой и хранились до проведения экспериментов в холодильнике при температуре  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 2.4 Определение активности глюкозооксидазы

Для оценки активности иммобилизованной глюкозооксидазы, полученные биокатализаторы на основе альгинатных микросфер смешивались с 40 мл раствора D-глюкозы (2,2 ммоль/л) в фосфатном буферном растворе с  $\text{pH}=6,0$ , и проводилась реакция окисления кислородом воздуха в термостатируемом стеклянном реакторе при постоянном перемешивании при температуре  $25^\circ\text{C}$  в течение 60 минут с периодическим отбором пробы из реакционной смеси. Для исключения внешнедиффузионного торможения реакция проводилась при интенсивности перемешивания  $300 \text{ мин}^{-1}$ . Показателем активности глюкозооксидазы является количество образующегося пероксида водорода (эквивалентно прореагировавшей D-глюкозы) в реакционной смеси. Содержание пероксида водорода определялось иодометрически по фотометрированию образующегося синего комплекса йод-крахмал [163]. В кювету спектрофотометра СФ-2000 вносили микропипеткой 10 мкл реакционной смеси, после чего строго последовательно добавляли 2,0 мл раствора  $\text{HCl}$  (0,05 н.), 0,2 мл раствора  $\text{KI}$  (16,6 % масс.), 0,2 мл раствора молибдата аммония (0,12 % масс.), 0,2 мл раствора крахмала Линтнера (5 %) и через 180 секунд измеряли оптическую плотность смеси относительно дистиллированной воды при длине волны 570 нм.

Для построения калибровочного графика йодометрический метод проводили со стандартными растворами пероксида водорода различных концентраций: 0,005 моль/л; 0,0025 моль/л; 0,001 моль/л; 0,0005 моль/л. Изменение оптической плотности реакционной смеси во времени при различных концентрациях пероксида водорода представлено на рисунке 2.2.

На основании этих данных был построен калибровочный график – зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при длине волны 570 нм для времени выдерживания в кювете 180 секунд (к этому моменту реакция в кювете практически заканчивается), представленный на рисунке 2.3.

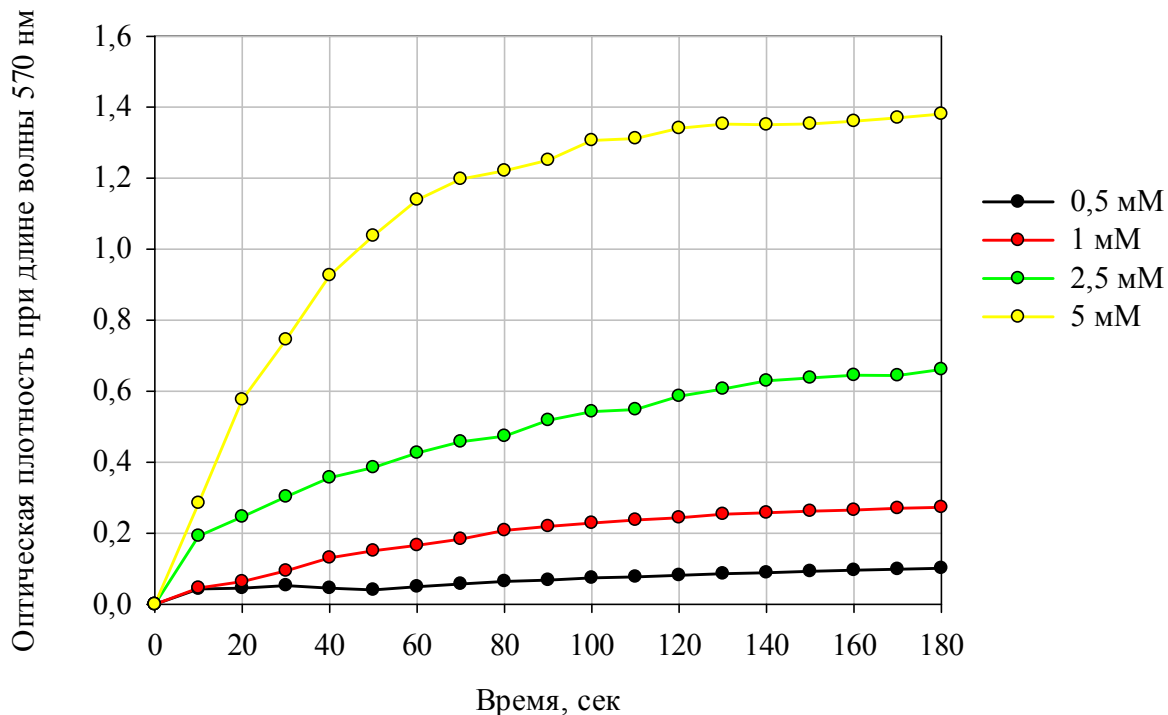


Рисунок 2.2 – Изменение оптической плотности реакционной смеси во времени при различных концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$

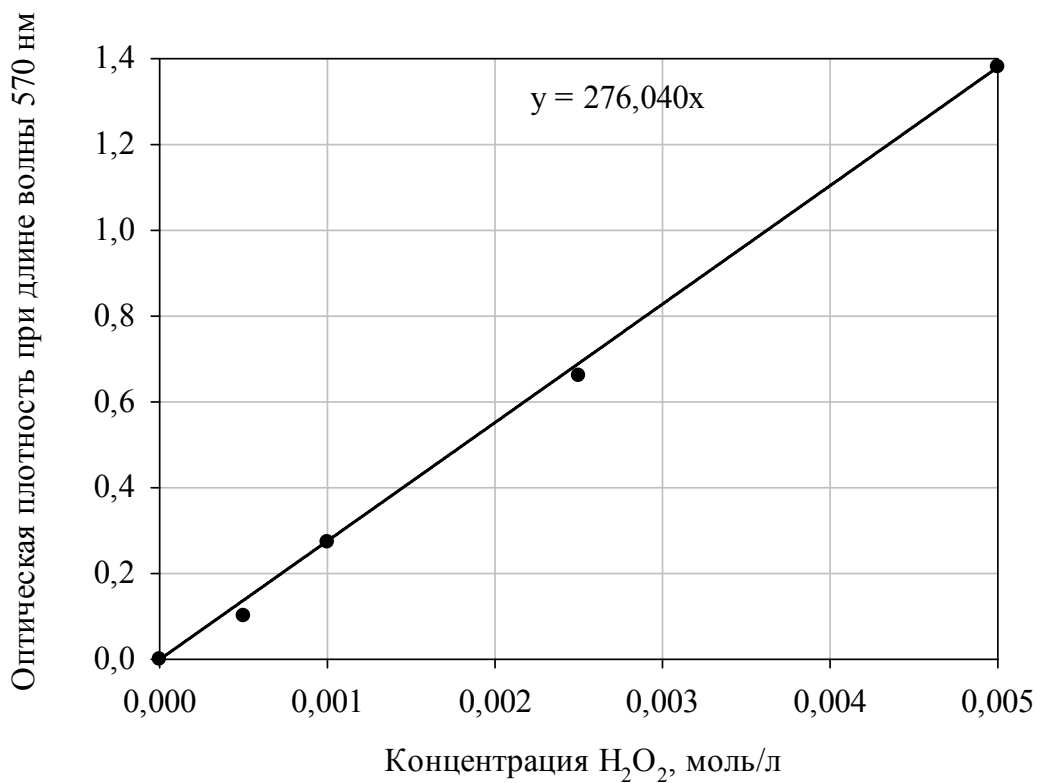


Рисунок 2.3 – Калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода

Таким образом, значения оптической плотности для каждой отобранной пробы при окислении D-глюкозы в присутствии GOx, пересчитывались в концентрацию пероксида водорода с помощью калибровочного графика.

Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов (константа Михаэлиса  $K_m$ , предельная скорость реакции  $V_m$ ) рассчитывались по результатам экспериментов, проведенных при различных начальных концентрациях D-глюкозы, с помощью линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка.  $V_m$  – максимальная (предельная) скорость превращения субстрата в продукт в присутствии фермента при насыщающих концентрациях субстрата. Значение  $V_m$  является подходящей мерой каталитической активности [6].  $K_m$  – постоянная Михаэлиса, отражающая сродство фермента к субстрату (чем ниже значение  $K_m$ , тем выше сродство), соответствует концентрации субстрата, при которой начальная скорость фермента составляет половину  $V_m$  [164].

Активность (A) биокатализаторов рассчитывалась в единицах активности (1 единица активности соответствует конверсии 1 ммоль субстрата в минуту на 1 мг фермента).

## 2.5 Метод Брэдфорда

Данный метод определения концентрации белка основан на смещении максимума поглощения оптической плотности красителя кислотного синего 90 (кумасси бриллиантовый синий R-250) от 470 нм до 595 нм, наблюдаемой вследствие связывания белка с красителем. Краситель наиболее активно связывается с остатками аргинина и лизина в белке, что позволяет обнаруживать белки с высокой точностью вплоть до 1 мкг. Белок, используемый в качестве стандартного образца, должен быть таким же, как и испытуемый белок [165, 166].

Для приготовления реактива Брэдфорда в мерную колбу вместимостью 1000 мл поместили 0,1 г кислотного синего 90 (кумасси бриллиантовый синий R-250), растворили в 50 мл спирта 96%, прибавляют 100 мл концентрированной фосфорной кислоты, довели объем раствора водой до метки и тщательно перемешивали. Фильтровали раствор и хранили в банках темного стекла при комнатной температуре.

Для приготовления стандартных растворов белка растворяли стандартный образец белка в буферном растворе, после чего части полученного раствора разводили в том же буферном растворе для получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 0,1 мг/мл и 1 мг/мл (50 мг фермента на 50 мл раствора, последовательное разбавление в 2 раза).

Для определения содержания белка 5 мл реактива Брэдфорда прибавляли к 0,1 мл каждого стандартного раствора, испытуемого раствора и контрольного раствора, тщательно перемешивали, переворачивая, избегая образования пены, приводящей к плохой воспроизводимости. Растворы выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли оптические плотности стандартных растворов и испытуемого раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 595 нм, используя в качестве раствора сравнения смесь растворителя и реактива Брэдфорда. На основании значений оптических плотностей стандартных растворов ГОх был построен калибровочный график зависимости оптической плотности смеси при длине волны 595 нм от концентрации белка в ферментном препарате, представленный на рисунке 2.4.

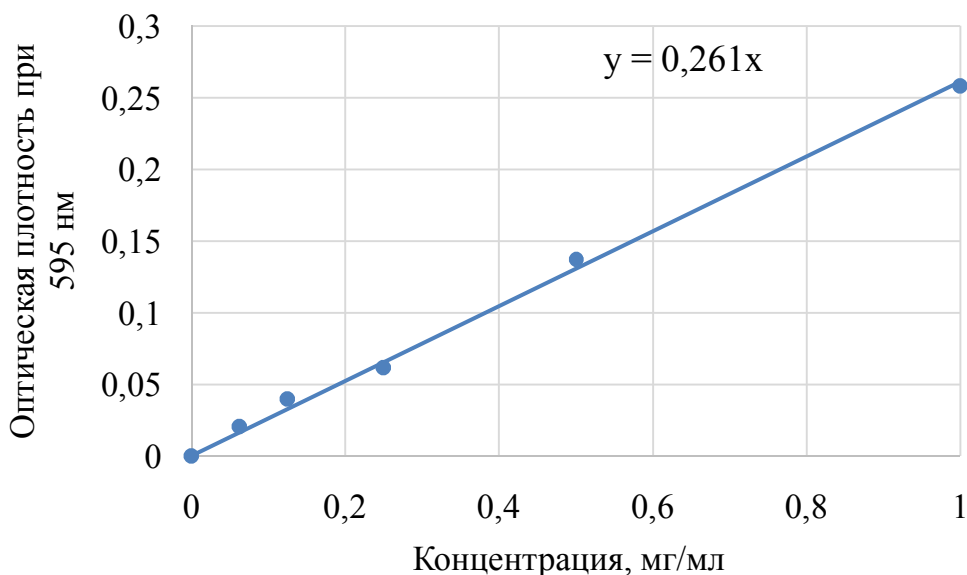


Рисунок 2.4 –Калибровочный график для определения концентрации белка в ферментном препарате по методу Брэдфорда

На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяли концентрацию белка в смыве для оценки эффективности иммобилизации ГОх на альгинатных микросферах.

Эффективность иммобилизации по активности биокатализатора и смыва рассчитывалась как отношение активности биокатализатора к сумме активностей биокатализатора и смыва, выраженное в процентах, рассчитанное по формуле 2.1:

$$\text{Эффективность иммобилизации (\%)} = \frac{A_{\text{иммоб.ГОх}}}{A_{\text{иммоб.ГОх}} + A_{\text{смыв.ГОх}}} \times 100\% \quad (2.1)$$

Эффективность иммобилизации по методу Брэдфорда рассчитывалась как отношение разницы между концентрацией белка ферментного препарата в исходном растворе и определенной в смыве концентрации белка к концентрации белка ферментного препарата в исходном растворе (0,5 мг/мл), выраженное в процентах, рассчитанное по формуле 2.2:

$$\text{Эффективность иммобилизации (\%)} = \frac{C_{\text{исх.ГОх}} - C_{\text{смыв.ГОх}}}{C_{\text{исх.ГОх}}} \times 100\% \quad (2.2)$$

## **2.6 Изучение морфологии биополимерных микрочастиц с помощью методов оптической микроскопии**

Морфологию синтезированных микросфер изучали визуально в световом поле оптического микроскопа Inskam-315 с цифровой камерой (12 мегапикселей, внешний экран 7 дюймов, «Inskam», Китай), Биомед-2 («Биомед», Россия) и XSZ-107 («Армед», Россия). Размер микрочастиц оценивался с помощью размерной сетки камеры Горяева (сторона малого квадрата  $0,05 \pm 0,001$  мм, сторона большого квадрата  $0,2 \pm 0,001$  мм).

## **2.7 Физико-химическая характеристика альгинатных микросфер и биокатализатора на их основе**

Морфология лиофилизированных микросфер с иммобилизованной глюкозооксидазой была исследована методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Образцы для исследований были подготовлены методом негативного контрастирования. Для этого раствор с лиофильно высушенными микросферами был нанесен на медную электронно-микроскопическую сетку с углеродной пленкой. Затем на эту же сетку наносился раствор уранилацетата. После сушки на воздухе образец был исследован в ПЭМ Tecnai G2 12 Spirit (FEI, США), оборудованным CCD камерой Eagle (FEI, США) при ускоряющем напряжении 120 кВ. Изображения были обработаны с помощью программного обеспечения TIA (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ инфракрасных спектров образцов проводился с помощью инфракрасного спектрофотометра с преобразованием Фурье и приставкой диффузионного отражения IRPrestige-21 («Shimadzu», Япония).

## **2.8 Физико-химическая характеристика используемого альгината**

Определение мономерного состава альгинатного полимера проводилось с использованием инфракрасного спектрофотометра с преобразованием Фурье и приставкой диффузионного отражения IRPrestige-21 («Shimadzu», Япония).

Также для характеристики альгината использовался вискозиметрический метод определения молекулярной массы полимеров с помощью стеклянного вискозиметра типа ВПЖ-2 («Союзнаучприбор», СССР). Измерения вязкостей растворов альгината в 0,9% растворе NaCl проводили при температуре 25°C. С помощью полученных данных (времени истечения растворителя и полимерных растворов определенных концентраций: 0,0100 г/100 мл; 0,0250 г/100 мл; 0,0375 г/100 мл; 0,0500 г/100 мл), удельную вязкость полимера рассчитывали по формуле 2.3:

$$\eta_{\text{уд}} = \frac{t-t_0}{t_0}, \quad (2.3)$$



где:

$t_0$  - время истечения растворителя, сек;

$t$  - время истечения раствора альгината, сек.

Молекулярную массу  $M$  рассчитывали, используя значение характеристической вязкости  $[\eta]$  (определенной путем графической экстраполяции значений  $\eta_{уд}/C$ ) и уравнение (2.4) Марка-Хаувинка-Сакурада [167]:

$$[\eta] = K \times M^a, \quad (2.4)$$

где используются следующие коэффициенты [167]:

$$K = 7,3 \times 10^{-5};$$

$$a = 0,92.$$

## 2.9 Термогравиметрические исследования биокатализатора

Для оценки изменений в свойствах биокатализатора при выпечке хлебобулочных изделий проведен термогравиметрический анализ синтезированного биокатализатора. Он выполнен с использованием термогравиметрического анализатора TG IRIS 209 F1 («NETZSCH», Германия). Образцы, помещались в алюминиевые тигли, взвешивались и нагревались с постоянной скоростью (20 °С/мин). Первый образец анализировался в инертной среде аргона и нагревался до 100 °С, далее выдерживался при этой температуре в течение часа. Второй образец нагревался в окислительной среде аргон-кислород (по содержанию кислорода близкой к воздуху), до температуры 200 °С и также выдерживался при этой температуре в течение часа.

## 2.10 Испытания гетерогенного биокатализатора в качестве хлебопекарного улучшителя

Для оценки возможности использования иммобилизованного биокатализатора в хлебопечении была проведена пробная выпечка с помощью лабораторной хлебопечки DI-9154 («Daewoo», Южная Корея) по стандартной

программе «Традиционный белый хлеб».Используемая рецептура хлебопечения включала (размер буханки 700 г): мука, 450 г; вода, 250 мл; соль, 1 ч.л.; сахар, 1,5 ст. л.; маргарин, 1 ст. л.; сухое молоко, 1,5 ст. л.; сухие дрожжи, 1,25 ч. л. Микросферы с иммобилизованной глюкозооксидазой во влажном виде в разном количестве добавлялись при замешивании теста. После выпечки с помощью органолептических методов оценивались основные показатели (внешний вид, состояние мякиша, вкус) и изменения в свойствах изделия. Качество сырой клейковины замешиваемого теста оценивалось с помощью измерителя деформации клейковины ИДК-3М («Плаун», Россия) согласно методике, описанной в ГОСТ 27839-2013 «Мука пшеничная. Методы определения количества и качества клейковины». Прибор определяет качество клейковины в условных единицах ИДК, с помощью полученного значения устанавливали группу качества клейковины.

### **2.11 Режим лиофильной сушки**

Альгинатные микрочастицы с иммобилизованной глюкозооксидазой предварительно замораживались (-18°C в течение 12 ч), после чего подвергались лиофильному высушиванию в сушилке Labconco FreeZone, 2,5 л («Labconco», США) при температуре -51 °С до постоянной массы. После лиофилизации частицы в виде порошка хранились в морозильной камере холодильника при -18°C.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В различных биотехнологических процессах широко используются ферменты, иммобилизованные на альгинатных носителях, в том числе микрочастицах. В данной работе изучалась иммобилизация глюкозооксидазы на альгинатных микросферах, в связи с этим, первым этапом исследования стало определение основных физико-химических свойств полисахаридного биоматериала для определения эффективности образования биополимерных частиц в процессе ионотропного гелеобразования.

#### 3.1 Определение молекулярной массы и состава используемого альгината натрия

С помощью полученного ИК-спектра альгината натрия (рисунок 3.1) по соотношению интенсивностей при  $808\text{ см}^{-1}$  и  $1320\text{ см}^{-1}$  (маннуриновая кислота, М) и  $787\text{ см}^{-1}$  и  $1290\text{ см}^{-1}$  (гулуриновая кислота, G) [168], был рассчитан мономерный состав биополимера.

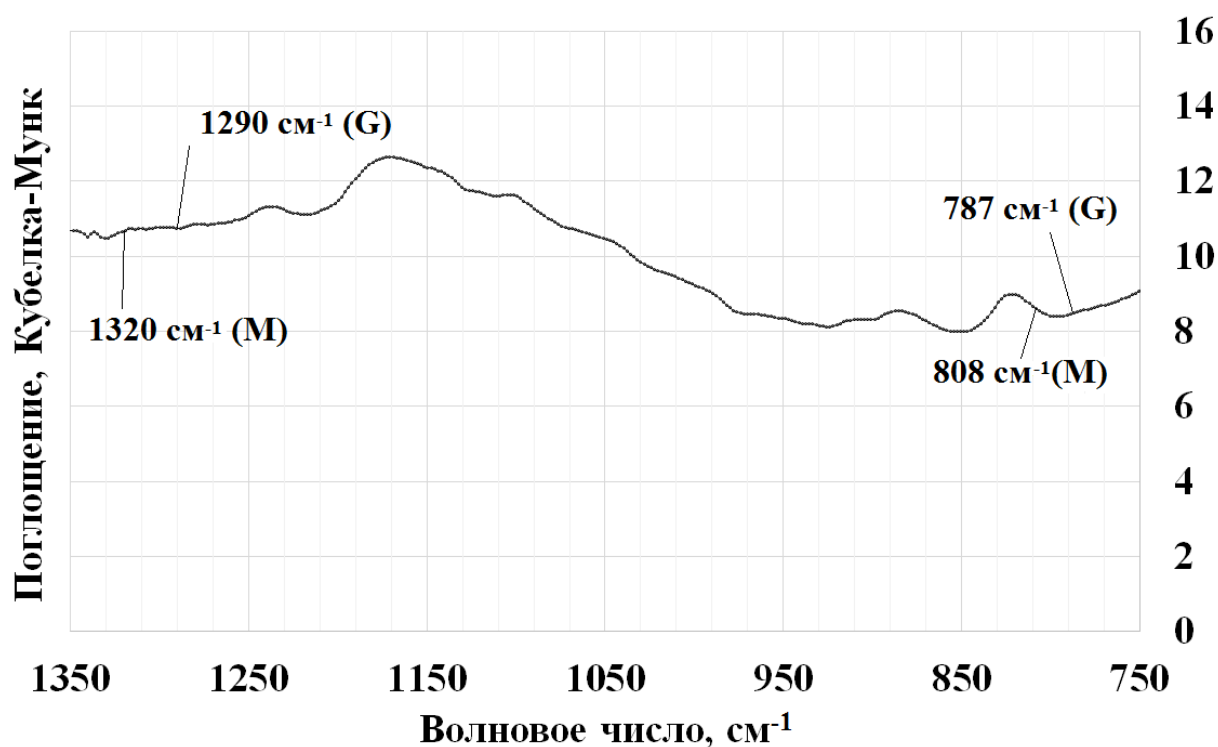


Рисунок 3.1 – ИК-спектр альгината натрия в диапазоне  $750\text{-}1350\text{ см}^{-1}$

Молекулярную массу альгината определяли вискозиметрическим методом с помощью уравнения Марка-Хаувинка-Сакурада. Полученные данные приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Характеристики альгината, используемого в работе

[η], дл/г	Молекулярная масса, кДа	D808 (M)/D787 (G)	D1320 (M)/D1290 (G)	M/G
5,78 ± 0,08	211,31 ± 2,76	1,01	0,99	50/50

Таким образом, используемый в работе альгинат натрия содержит примерно равные доли гулурановых и маннуроновых остатков. Молекулярная масса биополимера составляет 211,31 кДа. Как уже было указано ранее в литературном обзоре, молекулярная масса и распределение мономерных остатков в полимерной цепи альгината оказывают влияние на его физико-химические свойства [169]. G-блоки более жесткие и имеют вытянутую конфигурацию цепи, чем M-блоки, из-за более высокой степени затруднённого вращения вокруг гликозидных связей. Следовательно, гелеобразующая способность связана с гулурановыми кислотами. Таким образом, альгинат с высоким содержанием гулураната (т.е. с низким соотношением M/G) дает жесткие и прочные гели, а альгинат, обогащенный маннуронатом, дает эластичные гидрогели со слабой прочностью и жесткостью [169, 170].

Гелеобразование происходит за счет взаимодействия достаточного количества гулурановых блоков в структуре биополимера с двухвалентными катионами, поэтому процент гулурановых мономеров определяет способность альгината к связыванию ионов двухвалентных металлов. Более высокая специфичность для двухвалентных металлов объясняется «зигзагообразной» формой полигулурановой кислоты, которая способна включать  $Ca^{2+}$  (и другие двухвалентные катионы) в свою структуру. Из этого следует, что аффинность полисахарида к ионам кальция возрастает с содержанием гулурановых кислот в его структуре [171]. Молекулярная масса также влияет на характеристики гидрогеля. По некоторым данным, молекулярная масса коммерческих альгинатов составляет от 60 кДа до 700 кДа [172]. Молекулы полимера с низкой молекулярной

массой позволяют получать микрошарики меньшего размера [169]. Напротив, скорость гелеобразования может быть снижена за счет использования альгинатных биополимеров с высокой молекулярной массой, что приводит к образованию излишне эластичных гелей [172], поэтому использование высокомолекулярных соединений для получения микрочастиц не является предпочтительным. Также раствор высокомолекулярного альгината обладает высокой вязкостью [173], что затрудняет процесс получения однородных по размерам частиц. Таким образом, физические свойства, способность образовывать гели и прочность альгинатных гелей зависят не только от молекулярно-массового распределения, а также от состава уруновых кислот и соотношения всех типов мономерных блоков, а также от источника кальция и метода получения гидрогеля [170].

Достаточно высокое содержание гулуриновых остатков (50%), ответственных за образование структуры «ячеистого контейнера», в полимерной цепи применяемого в данной диссертационной работе альгината способствует хорошему гелеобразованию с получением стабильных прочных гелей.

Известно, что альгинат с относительно небольшим соотношением гулуроната к маннуронату может образовывать эмульсии с устойчивыми каплями [170], что делает используемый в данном диссертационном исследовании биополимер подходящим для проведения ионотропного гелеобразования с целью получения микрочастиц методом внутреннего гелеобразования. Однако следует отметить, что альгинат с высоким содержанием G-блоков, даже с низкой молекулярной массой, способен образовывать частицы большего размера по сравнению с альгинатами с низким содержанием гулуроната. В среде с избытком ионов кальция высокогулуриновые полисахариды способны к образованию большего количества взаимодействий между молекулами и из-за этого создавать более крупные и прочные сетчатые гели [169]. Гели, приготовленные из не высокомолекулярного альгината и полимерных звеньев с высоким содержанием остатков гулуриновых кислот, являются самыми сильными и лучшими гелями для получения микрокапсул [172].

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что используемый в данном исследовании среднемолекулярный альгинат содержит в своей структуре достаточное количество гулуриновых блоков,

необходимых для формирования устойчивых гидрогелевых микрочастиц, и маннуроновых блоков, предоставляющих активные реакционноспособные группировки для осуществления ковалентной иммобилизации фермента на поверхности полученной биополимерной матрицы в процессе получения биокатализатора.

### **3.2 Обоснование условий синтеза альгинатных микросфер**

Для синтеза микрочастиц за основу была взята методика, описанная в работе Wang и др. [143], в которой показано, что данная методика получения альгинатных микросфер эмульгированием/внутренним гелеобразованием подходит для иммобилизации ферментов, в частности, глюкозооксидазы. В данной диссертационной работе в исходную методику были внесены изменения, в частности, применялось диспергирование карбоната кальция в полимерной фазе без использования ультразвуковой ванны, отделение частиц из реакционной смеси осуществлялось с помощью пост-сшивки альгинатных частиц раствором хлорида кальция, для синтеза микросфер была заменена масляная фаза (подсолнечное масло вместо рапсового).

В случае внутреннего гелеобразования процесс сшивки определяется степенью разложения нерастворимой формы кальция. Poncelet и др. [122] продемонстрировали, что слишком высокая концентрация карбоната кальция (100 мМ) приводит к появлению нерастворимых зерен соли кальция в полученных микросферах, а уменьшение концентрации кальция до 25 мМ не вызывает изменения в размере, форме или механической прочности образуемых микрочастиц. Соотношение кальций/альгинат, равное 1:4, обеспечивает устойчивое формирование микрошариков [103]. Также размер микросфер определяется размером зерен соли кальция: чем меньше зерна, тем более однородная дисперсия альгината и мельче частицы. Коммерческие порошки карбоната кальция состоят из зерен диаметром 30 мкм. Микроскопические исследования показали [122], что комплекс кальция состоит из скоплений с зернами соли в диапазоне 2-2,5 мкм. Для получения более однородной дисперсии в альгинате и, следовательно, маленьких микросфер (50-300 мкм), перед использованием суспензию карбоната кальция

можно обрабатывать ультразвуком или же растирать сухой порошок пестиком в ступке, однако такая обработка не уменьшает собственный размер зерна [122], хотя и способствует отсутствию остаточных зерен кальция в микрошариках. Поэтому использование ультразвуковой обработки не является обязательным, достаточно соблюдать условия тщательного диспергирования для равномерного распределения нерастворимой соли кальция в объеме раствора биополимера для дробления крупных зерен карбоната. Суспензии и порошки карбоната кальция без предварительной обработки использовались в работах [120, 140, 174].

В данной диссертационной работе используется 0,05М раствор  $\text{CaCl}_2$ , содержащий 1% (об.) Tween 80, для осаждения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных микросфер, облегчения их отделения от масляной фазы и последующей промывки от следов гидрофобной фазы. Данная процедура была использована в работах [136, 138, 139, 141]. Добавочная пост-сшивка хлоридом кальция может применяться для наилучшего отделения образовавшихся частиц из масляной фазы в водную [69, 124]. Процедура не влияет на форму и морфологию частиц (при времени процесса, равном двум часам), однако увеличивает их размер (вследствие набухания при процессе сшивки), а также при определенных концентрациях сшивающего агента (0,5-1,25%) вызывая их агрегацию. Это может быть связано с тем, что содержание  $\text{Ca}^{2+}$  недостаточно велико для того, чтобы произошло окончательное отвердевание альгинатных микросфер до их набухания и агрегации [175]. Микросферы, сбиваясь в слабые агрегаты, могут отделяться от масляной фазы простым осаждением, после чего гидрофобная фаза удаляется из системы декантацией, фильтрованием или центрифугированием с последующей отмывкой полученных микрочастиц от следов масла 0,05М раствором  $\text{CaCl}_2$ , содержащим 1% (об.) Tween 80 [141], ацетатным буферным раствором [138], дистиллированной водой [120], 1%-водным раствором Tween 80 [139] или 0,9% раствором  $\text{NaCl}$  [174].

В рамках получения биополимерных микросфер методом эмульгирования/гелеобразования используются самые различные масла, например, жидкий парафин [176, 177], подсолнечное масло [127, 178], рапсовое масло [112], соевое масло [135, 143, 179], оливковое масло [180]. Следует отметить, что использование минеральных масел может приводить к увеличению диаметра

микросфер и затруднять дальнейший переход частиц из масляной фазы в водную, кроме того, они могут представлять большую опасность для окружающей среды. Использование же растительных масел предпочтительнее с точки зрения пищевой сферы [69, 103]. В данной исследовательской работе для создания гидрофобной фазы при синтезе альгинатных микрочастиц было использовано подсолнечное масло. Подсолнечное масло является крайне востребованным в пищевой промышленности на российском рынке. По данным информационно-аналитического агентства OleoScore [181], по итогам I квартала 2022 г. в России было произведено 1 560 тыс. тонн нерафинированного и 601 тыс. тонн рафинированного подсолнечного масла, что составляет 78% и 91% соответственно от общей структуры производства нерафинированных и рафинированных масел на территории Российской Федерации, что обуславливает широкую доступность и использование масла подсолнечника в различных сферах.

Соотношение между гидрофильной и гидрофобной фазами в процессе непосредственного гелеобразования является одним из ключевых параметров, влияющих на эмульсификационный процесс. Как правило, соотношение между водной фазой и масляной жидкостью обычно находится в пределах 1:2 и 1:5 [103], однако оно может варьироваться от 1:2 до 1:10 в лабораторных масштабах [118]. Соотношение водная фаза/масляная фаза может быть выбрано в соответствии с особенностями используемой методики. Соотношение внутренней фазы (водный раствор биополимера) и внешней непрерывной фазы (масло), используемое в данной исследовательской работе, основано на исследовании [143] на этапе гелеобразования составляет 1:3,5. Следует помнить, что увеличение отношения раствора альгината к маслу приводит к уменьшению диаметра частиц альгинатного микрогеля [140], что объясняет последующее увеличение после гелеобразования соотношения вода/масло в работе [143]. Подбор необходимого соотношения вода/масло в рамках данного диссертационного исследования производился посредством добавления разного количества дистиллированной воды к эмульсии с последующим наблюдением за поведением частиц. Опыты показали, что при увеличении отношения вода/масло дальнейшее осаждение микросфер хлоридом кальция из гидрофобной фазы становится затруднительным, что повлияло на выбор конечного соотношения гидрофильной и гидрофобной фаз (таблица 3.2).



Таблица 3.2 – Влияние конечного соотношения вода/масло на процесс осаждения биополимерных частиц из масляной фазы

Объем добавляемой дистиллированной воды, мл	Наличие осаждения микросфер 0,05М хлоридом кальция	Соотношение вода/масло, об.
250	–	3,9:1
200	–	3,1:1
150	+	2,4:1

Как видно из таблицы 3.2, осаждение микросфер из масляной фазы наблюдается только при добавлении дистиллированной воды к эмульсии в объеме 150 мл, что и обусловило выбор конечного соотношения вода/масло 2,4:1 для синтеза микросфер. Увеличение доли водной фазы после гелеобразования способствует разрушению агрегатов и формированию более мелких частиц.

Распределение по размерам микросфер, полученных внутренним гелеобразованием, зависит от размера эмульсионных капель, что определяется балансом между дисперсионными силами и поверхностным натяжением. Первые имеют тенденцию к диспергированию эмульсии, а последний параметр вызывает коалесценцию. Соответственно, увеличение межфазного натяжения приводит к увеличению размеров частиц и к их более широкому распределению по размерам, а увеличение дисперсионных сил уменьшает средний диаметр микросфер [139, 182]. Регулируя данный баланс, можно изменять размер микросфер и их распределение по размерам, и для этой цели используются различные поверхностно-активные вещества.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) играют важную роль в стабилизации эмульсии, формировании микросфер и улучшении их поверхностных характеристик поверхности микросфер. Сурфактанты снижают межфазное натяжение между гидрофильными и гидрофобными молекулами, что приводит к образованию стабильных эмульсий и предотвращает капли эмульсии от коалесценции для получения дискретных микросфер. Повышение концентрации поверхностно-активного вещества уменьшает размер капель, и, следовательно, формируются микросферы меньших размеров. Эмульсификаторы притягиваются как к полярным, так и к неполярным компонентам (вследствие своего

молекулярного строения: гидрофобного «хвоста» и гидрофильной «головки»). При добавлении липофильного сурфактанта к эмульсии воды в масле неполярные хвосты его молекул обращены к масляной фазе, в то время как полярные группы головок молекул находятся в контакте с водной фазой. Следовательно, капли являются более устойчивыми в эмульсии, что предотвращает их агломерацию. Гидрофильные же ПАВ подходят для эмульсии масла в воде [68, 183, 184].

При получении альгинатных микросфер используются различные ПАВ, такие как Span 60, Span 80, Span 85, полиглицерин полирицинолеат (PGPR), Tween 80, Tween 85, Tween 20 [68, 123, 136, 185, 186]. Неионные поверхностно-активные вещества имеют определенные преимущества: они проявляют менее выраженное взаимодействие с двувалентными ионами по типу кальция (в отличие от анионных ПАВ, чье поведение сильно зависит от присутствия двухвалентных ионов), а также имеют высокую растворимость в масляных средах, что можно использовать для очистки и извлечения альгинатных частиц [187]. Увеличение концентрации сурфактанта приводит к уменьшению межфазного натяжения между альгинатной и масляной фазами эмульсии и, таким образом, к уменьшению среднего размера микросфер, что было продемонстрировано в работах [139, 185, 188]. Использование эмульсификаторов на стадии диспергирования также необходимо для облегчения перехода частиц в водную фазу во время разделения [69].

Массовое соотношение  $\text{Ca}^{2+}$ /альгинат и молярное соотношение кислота/ $\text{Ca}^{2+}$  не оказывают существенного влияния на средний размер микросфер [140], поэтому соотношение указанных параметров в методике было оставлено без изменений, а их влияние на образование микрочастиц в данной диссертационной работе не рассматривалось.

Таким образом, на основании литературных данных, были выбраны следующие условия проведения синтеза биополимерных микросфер: диспергирование порошка карбоната кальция без использования ультразвукового воздействия; использование подсолнечного масла для создания эмульсии; использование соотношения вода/масло 1:3,5 на этапе гелеобразования и соотношения вода/масло 2,4:1 в конце синтеза; отделение образовавшихся микрочастиц из реакционной смеси с помощью 0,05 М раствора хлорида кальция. В качестве сурфактантов использовались Span 80 на стадии гелеобразования (для

снижения межфазного натяжения между альгинатными каплями и масляной непрерывной фазой для повышения устойчивости полимерных капель эмульсии и уменьшения их диаметра) и Tween 80 на стадии пост-сшивки и промывки для наиболее полного отделения микрочастиц от гидрофобной фазы.

На основании подобранных условий синтеза были проведены эксперименты по получению биополимерных микрочастиц.

### **3.3 Влияние концентрации альгината на размер и морфологию частиц**

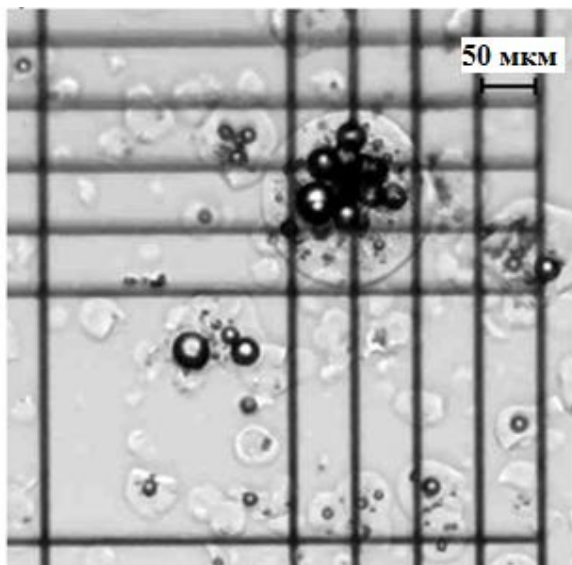
Концентрация альгината считается наиболее важным фактором, влияющим на характеристики альгинатных микросфер, такие как морфология и размер частиц. Влияние данного параметра было показано в работах [177, 189]. Увеличение концентрации биополимера приводит к увеличению вязкости альгинатного раствора, который увеличивает межфазное натяжение между каплями альгината и масляной фазой, и это приводит к образованию более крупных полимерных капель, и, как следствие, более крупных микросфер. Также такие частицы становятся более подверженными агломерации, а их поверхность – более морщинистой, и, вероятно, это связано с неэффективным диспергированием раствора биополимера в масле.

Оценивались морфология и размер микрочастиц, получаемых при использовании альгината следующих концентраций: 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3% при постоянстве остальных условий синтеза (в соответствии с основной методикой, приведенной в п. 2.2).

Изображения альгинатных микрочастиц в сравнении с размерной сеткой камеры Горяева, иллюстрирующих разницу в размере микросфер при использовании гелеобразующего биополимера различных концентраций, представлены на рисунке 3.2 (оптический микроскоп Inskam-315).

Микроскопические препараты альгинатных микросфер при общем увеличении 150х, полученные при использовании различных концентраций гелеобразующего биополимера, иллюстрирующие разницу в размере, морфологии и компоновке микросфер, представлены на рисунке 3.3 (оптический микроскоп Биомед-2).

а)



б)

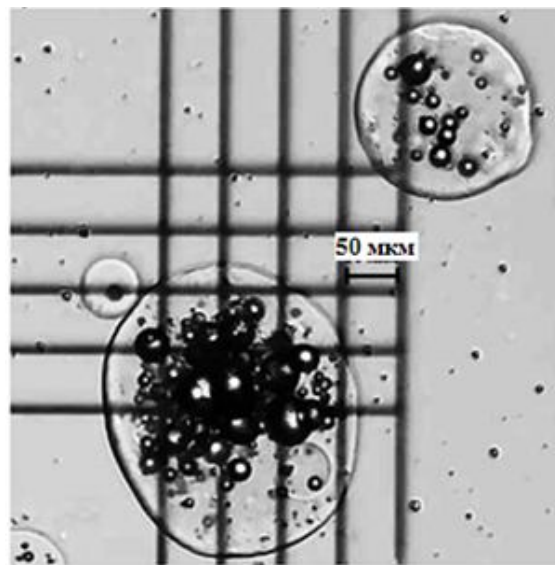
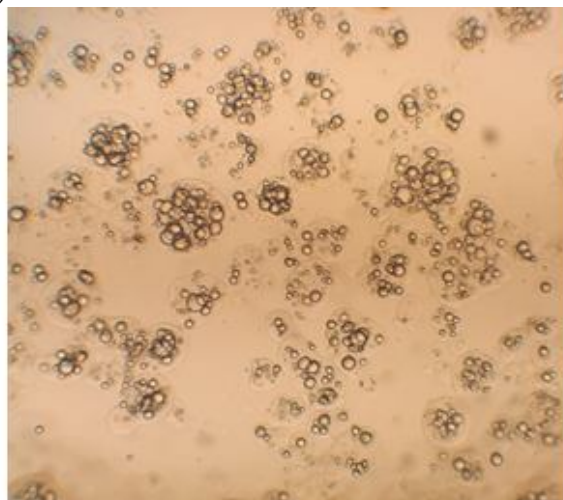


Рисунок 3.2– Внешний вид и размер микрочастиц альгината, полученных методом эмульсификации/внутреннего гелеобразования, при концентрации биополимера, равной 1%(а) и 2% (б)

а)



б)

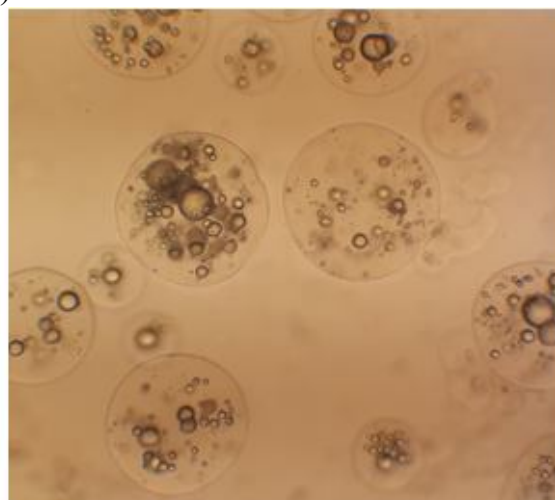


Рисунок 3.3– Морфология и компоновка альгинатных микрочастиц, полученных методом эмульсификации/внутреннего гелеобразования, при концентрации биополимера, равной 1,5% (а) и 2% (б)

Как видно из представленных изображений, полученные влажные кальций-альгинатные шарики являются микрочастицами преимущественно сферической формы, с просматривающимися воздушными полостями внутри биополимерного тела матрицы. Такая структура может быть объяснена типом гелеобразования,

используемого в работе: разложение нерастворимой формы кальция в виде карбоната, заключенного внутри альгинатных капель, происходит при снижении значений pH с образованием углекислого газа, воды и катионов  $\text{Ca}^{2+}$ , сшивающихся с биополимером изнутри [126, 128]. Микросферы имеют мягкую структуру и тенденцию к высокой агломерации вследствие слабого гелеобразования [125], а выделение углекислого газа способствует образованию внутренних полостей в структуре гелевой матрицы [126], что подтверждают результаты исследования полученных в данной работе микрочастиц. При этом на иллюстрациях отчетливо видно, что с увеличением концентрации альгинатного биополимера размер микрошариков также увеличивается, количество и размер воздушных полостей растет, их распределение внутри биополимерного тела становится все более неравномерным вместе с возрастанием диаметра микросфер, внешняя оболочка микрочастиц утолщается. С дальнейшим увеличением концентрации гелеобразующего биополимера наблюдается тенденция к деформированию частиц, внешняя поверхность сфер становится морщинистой.

Полученные данные по распределению микрочастиц по размерам в видимой области микроскопа при варьировании концентрации гелеобразующего биополимера сведены в таблицу 3.3.

Таблица 3.3 – Распределение микрочастиц по размерам в поле зрения микроскопа (в процентах от общего количества частиц)

Размер, мкм Концентрация, %	0-50	50-100	100-200	>200
1,0	75,7 ± 6,5	22,9 ± 4,1	1,3 ± 0,5	-
1,5	59,5 ± 5,9	34,0 ± 4,8	6,1 ± 0,9	0,40 ± 0,2
2,0	43,1 ± 4,3	36,8 ± 2,6	11,3 ± 2,9	8,8 ± 1,3
2,5	44,1 ± 2,3	29,3 ± 1,4	17,6 ± 2,4	9,0 ± 2,3
3,0	44,3 ± 2,4	25,8 ± 3,5	20,6 ± 2,5	9,3 ± 4,4

Из результатов, представленных в таблице, видно, что для концентрации биополимера 1% характерна преобладающая доля микрошариков в размерном диапазоне до 50 мкм (75,71%) по сравнению с большими концентрациями

альгината. Частицы размером от 100 до 200 мкм встречаются в незначительном количестве (1,31%), частицы диаметром больше 200 мкм не наблюдаются. Особенности размерного распределения при применении более низкой концентрации биополимера объясняются его малой вязкостью, что дает в результате частицы меньшего размера. При использовании концентрации альгината 1,5% микросферы диаметром до 50 мкм также составляют большую долю (59,5%) от общего числа частиц, при этом около трети (34,0%) микрошариков представлены в размерном диапазоне от 50 до 100 мкм, а частицы диаметром больше 100 мкм представлены в наименьшем количестве (в диапазоне 100-200 мкм их доля составляет 6,10%, в диапазоне более 200 мкм 0,40%). Дальнейшее увеличение концентрации гелеобразующего биополимера приводит к уменьшению общей доли микросфер в диапазоне размеров до 100 мкм, при этом наблюдается заметное увеличение доли частиц в размерном диапазоне 100-200 мкм и более 200 мкм достигает наибольших значений для концентрации альгината 3%, составляя 20,62% и 9,28% соответственно.

Зависимость среднего и максимального диаметров полученных альгинатных микрочастиц от концентрации гелеобразующего биополимера представлена в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Изменение размера микросфер в зависимости от используемой в синтезе концентрации гелеобразующего полимера (в поле зрения микроскопа)

Концентрация альгината, %	Средний диаметр, мкм	Максимальный диаметр, мкм
1,0	41,9 ± 1,0	177,4 ± 1,0
1,5	53,6 ± 1,0	207,7 ± 1,0
2,0	83,0 ± 1,0	457,7 ± 1,0
2,5	84,7 ± 1,0	464,8 ± 1,0
3,0	86,4 ± 1,0	471,9 ± 1,0

Полученные данные согласуются с литературными. Увеличение концентрации альгината приводит к увеличению вязкости альгинатного раствора, который увеличивает межфазное натяжение между каплями альгината и масляной

фазой. Следовательно, образуются более крупные микросферы. Чем выше концентрация альгината, тем более вязкой становится эмульсия вода-в-масле, которая образует более крупные альгинатные капли и, следовательно, формируются более крупные микрошарики [68]. Также увеличение концентрации полимера делает поверхность микросфер неровной, морщинистой и вызывает их деформацию, что, вероятно, связано с возрастанием поверхностного натяжения на границе полимерной водной фазы и масляной фазы, и с неэффективным диспергированием раствора альгината в масле и плохому распределению зерен карбоната кальция внутри полимерных капель в масляной эмульсии повышенной вязкости.

Наблюдаемая размерная неоднородность микросфер объясняется особенностью метода эмульгирования/внутреннего гелеобразования: случайная коалесценция капель биополимера в эмульсии «вода-в-масле» может приводить к получению частиц, различающихся размерами и формой [121]. Кроме того, отделение микросфер с помощью  $\text{CaCl}_2$  увеличивает степень сшивки альгината, которая вызывает сжимание геля с потерями воды, вызывая адгезию между микросферами, что приводит к образованию агрегатов, вероятно, за счет образования новых водородных связей, созданных между гидроксильными группами биополимера. Потери воды гелевой матрицей вызывают уменьшение размера частиц, однако маленькие микросферы имеют тенденцию к агрегированию [139]. Улучшенный физико-химический контроль позволяет уменьшить полидисперсность получаемых микросфер [122,190].

Как уже отмечалось выше, получение частиц малого размера является наиболее предпочтительным, т.к. малый диаметр шариков (<1 мм) облегчает процессы массопереноса, улучшает параметры биокаталитических реакций и минимизирует повреждение микросфер в процессе их синтеза [69]. В зависимости от биотехнологических приложений исследователи выбирают определенный диаметр микросфер, и эмульсификационный метод позволяет получать конкретный размер альгинатных частиц [68]. Например, в пищевой промышленности желательны размеры полимерных микросфер менее 100 мкм, чтобы избежать отрицательного влияния на текстурные характеристики продуктов и свести к минимуму сенсорное восприятие микрочастиц в пище, например, в йогурте или

мороженом [98, 120]. В идеале размер частиц должен быть менее 200 мкм [68]. Для иммобилизации ферментов размер микросфер также может быть важным фактором, поскольку диаметр частиц носителя влияет на скорость диффузии реагентов и продуктов реакции [98]. Чем меньше размер альгинатных шариков, тем выше каталитическая активность фермента вследствие снижения противодействия массопереносу субстрата [191]. Таким образом, уменьшение размеров частиц носителя приводит к увеличению ферментативной активности.

Для дальнейшего синтеза гетерогенного биокатализатора была выбрана концентрация альгината в 1,5%. Распределение по размерам частиц, полученных при концентрации гелеобразующего полимера 1,5%, является подходящим вышеуказанным требованиям (диаметр 99,6% частиц менее 200 мкм, средний диаметр 53,6 мкм), поэтому именно данная концентрация была для дальнейшего получения иммобилизованного биокатализатора. Частицы, полученные при концентрации альгината 1%, демонстрируют плохое отделение от масляной фазы, большую агрегацию и большие потери в процессе синтеза, поэтому не использовались для проведения иммобилизации. Использование концентрации альгината выше 1,5% нецелесообразно из-за увеличения размера микросфер, использование которых в рамках установленных прикладных биотехнологических отраслей невозможно.

Следующим этапом работы после подбора условий синтеза биополимерных частиц было варьирование количеств активаторов функциональных групп на поверхности биополимерной матрицы и активного биообъекта иммобилизации – фермента.

### **3.4 Изучение влияния количеств активизирующих агентов и фермента на активность биокатализатора**

Ковалентная сшивка является одним из наиболее распространенных методов иммобилизации ферментов, осуществляемая путем связывания аминокислотных остатков, не входящих в активный центр фермента (например, посредством  $\beta$ -карбоксильных групп аспарагиновой кислоты,  $\epsilon$ -аминогрупп лизина, ОН-групп серина или треонина, SH-групп цистеина, имидазольных групп гистидина), с



функциональными группами носителя посредством химических связей. Обнаружено, что остатки лизина являются наиболее часто используемыми группами для ковалентного связывания ферментов с нерастворимыми носителями вследствие их широкой распространенности на поверхности белка, высокой реакционной способности и редкой вовлеченности в состав активных центров ферментов [192]. Связь между ферментом и материалом носителя может быть достигнута либо путем прямого связывания, либо через спейсеры (промежуточные полифункциональные агенты) [193].

Несмотря на некоторые недостатки (затраты на реагенты и подходящие носители; возможная потеря ферментативной активности вследствие стерических затруднений из-за определенной фиксации энзима, деформации нативной конформации биомолекулы, например, при участии в связывании групп активного центра или использовании токсичных реагентов или агрессивных условий для иммобилизации), неоспоримыми достоинствами ковалентного способа иммобилизации являются [192, 194, 195, 196]:

- 1) прочность и стабильность связи фермента с носителем, предотвращающая его десорбцию с поверхности подложки и загрязнение целевых продуктов реакции;
- 2) легкость контактирования фермента с субстратом благодаря локализации фермента на поверхности материала носителя;
- 3) повышение термостабильности и устойчивости к агрессивным значениям pH.

Ковалентную сшивку стараются проводить в мягких условиях, чтобы сохранить фермент. Однако в некоторых случаях материалы-носители не содержат подходящих функциональных групп или же условия сшивки слишком жесткие. Следовательно, фермент не может быть связан непосредственно с носителем [195]. Таким образом, чтобы избежать потери ферментативной активности, носители перед иммобилизацией часто активируют с помощью функциональных реагентов, что обеспечивает более мягкие условия сшивки [3]. Этап активации создает сильно электрофильные (электрон-дефицитные) группы на материале подложки, которые становятся способны реагировать с сильными нуклеофильными (источник электронов) группами протеинов (NH<sub>2</sub>-группы) [193].

Из-за токсичности интеркалирующих сшивающих агентов были разработаны методы с использованием неинтеркалирующих агентов. Среди них комбинация карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимиды (NHS) является наиболее изученной. При проведении реакции активации EDC реагирует с -COOH-группами макромолекулы с образованием активированного, но нестабильного комплекса (активированного эфира), который затем реагирует с NHS с образованием другого промежуточного соединения; далее, наконец, происходит дальнейшая реакция с NH<sub>2</sub>-группами биомолекулы с образованием стабильного конъюгата [197].

Таким образом, выбор в пользу ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы на поверхности синтезированных альгинатных микросфер вместо физических методов выбран, исходя из двух основных факторов:

1) неоспоримые преимущества ковалентной иммобилизации: высокая прочность связывания фермента с поверхностью носителя, предотвращающая десорбцию биомолекулы, и повышение стабильности биокатализатора;

2) особенность метода эмульгирования/внутреннего гелеобразования, в котором использование кислоты для инициирования высвобождения ионов кальция из его нерастворимой формы может выступать повреждающим биообъект фактором в ходе проведения инкапсуляции [128], т.к. инкапсулянт присутствует в эмульсии в момент непосредственного гелеобразования.

Таким образом, в процессе выполнения исследования, описываемого в данной диссертационной работе, происходит прочное связывание фермента посредством стабильных амидных связей с поверхностью альгинатных микросфер.

Для подбора состава биокатализатора варьировали содержание GOx и активаторов функциональных групп (EDC и NHS), которые использовались для ковалентного связывания глюкозооксидазы на поверхности альгинатных микросфер. На рисунке 3.4 представлено изменение концентрации пероксида водорода в реакционной среде при различном содержании EDC (0,058-0,464 г) и NHS (0,022-0,174 г) на 0,3 г альгината натрия (25 мг GOx) в составе биокатализатора (соотношение этих компонентов между собой выбрано исходя из молярного соотношения этих компонентов в реакции образования эфира, рисунок 2.1).

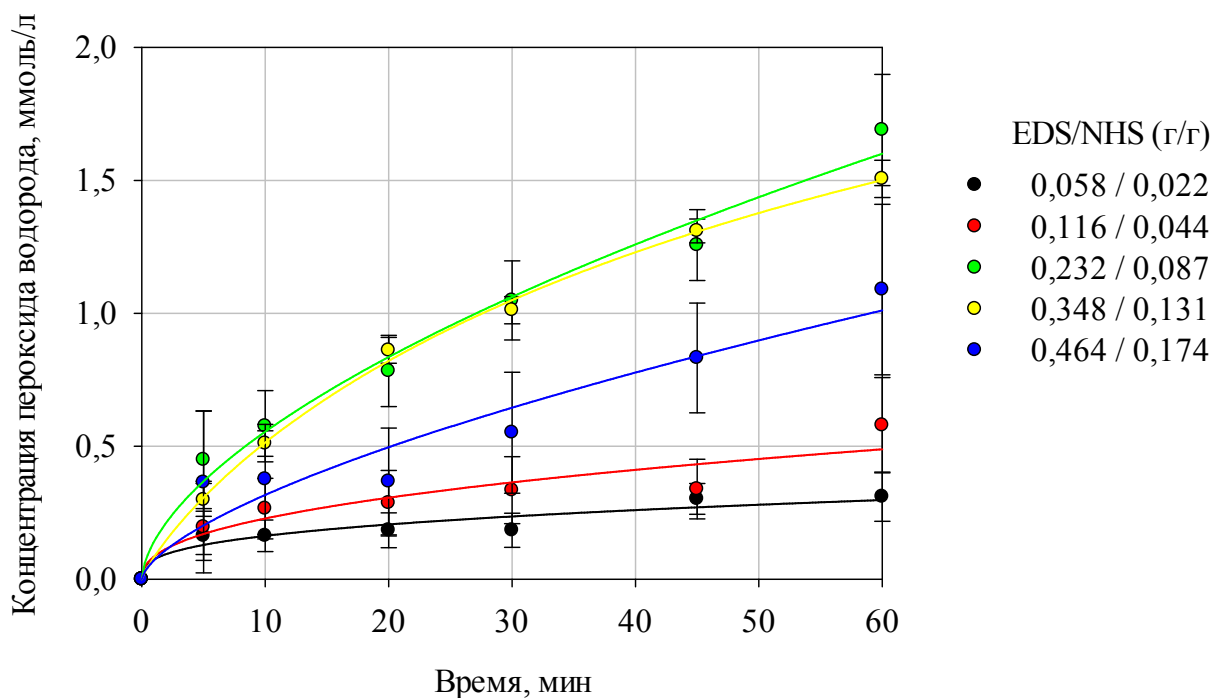


Рисунок 3.4 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различном содержании EDC и NHS в составе биокатализатора (pH = 6,0; t = 30°C)

Как видно из представленных данных, увеличение содержания EDC выше 0,232 г и NHS выше 0,087 г нецелесообразно, так как при этом происходит снижение концентрации образующегося пероксида водорода.

На рисунке 3.5 представлены данные по изменению концентрации образующегося пероксида водорода в реакционной смеси при различном содержании глюкозооксидазы в растворе для иммобилизации с целью получения гетерогенного биокатализатора (на 0,3 г альгината; EDS/NHS 0,232/0,087 г/г).

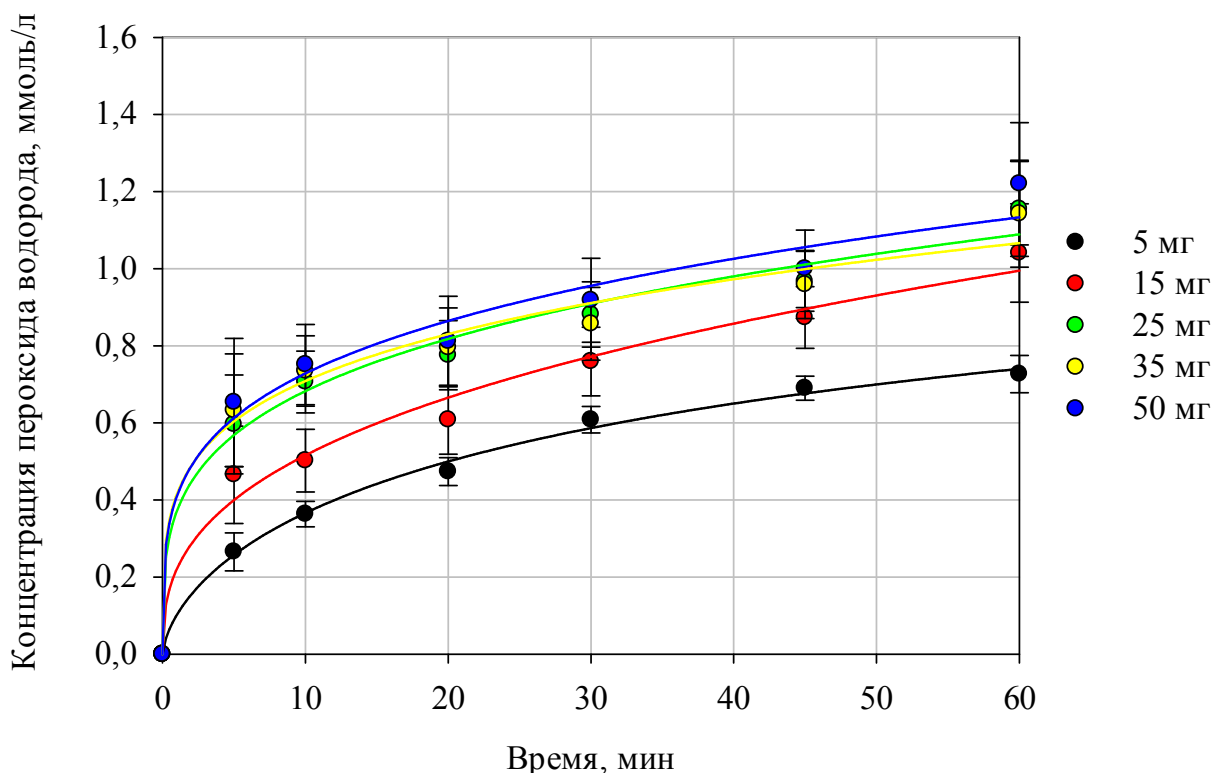


Рисунок 3.5 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различном содержании GOx в составе биокатализатора (pH = 6,0; t = 30°C)

Как видно из рисунка 3.14, увеличение содержания GOx выше 25 мг не приводит к дальнейшему значительному увеличению количества образующегося пероксида водорода в связи с ограниченной емкостью носителя по ферменту.

Таким образом, исходя из полученных результатов, для дальнейших экспериментов был выбран биокатализатор, проявивший наибольшую активность, синтезированный с помощью следующего соотношения компонентов:

- 0,3 г альгината натрия;
- 0,232 г EDC;
- 0,087 г NHS;
- 25 мг GOx.

### 3.5 Определение эффективности иммобилизации

Для оценки эффективности иммобилизации GOx на альгинатных микросферах было проведено сравнение активности синтезированного

оптимального биокатализатора и смыва, оставшегося после его приготовления, а также определена концентрация белка в ферментном препарате в смыве по методу Брэдфорда (раздел 2.5). Результаты экспериментов приведены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Эффективность иммобилизации GOx на альгинатных микросферах

	По методу Брэдфорда	По активности
Эффективность иммобилизации GOx, %	62,4	59,9

Таким образом, значения эффективности иммобилизации, рассчитанные 2 различными способами, мало отличаются, и могут охарактеризовать используемый метод иммобилизации GOx, как достаточно эффективный.

Далее было проведено определение наличия белковых веществ на альгинатных частицах. Идентификация иммобилизованного фермента на поверхности биополимерного носителя проводилась с помощью окрашивания частиц биокатализатора реактивом Брэдфорда (0,5 мл раствора, содержащего микросферы, смешивали с 0,5 мл кумасси G-250) с последующим микрофотографированием образцов для обнаружения окрашенных комплексов фермента с красителем (рисунок 3.6, оптический микроскоп XSZ-107).

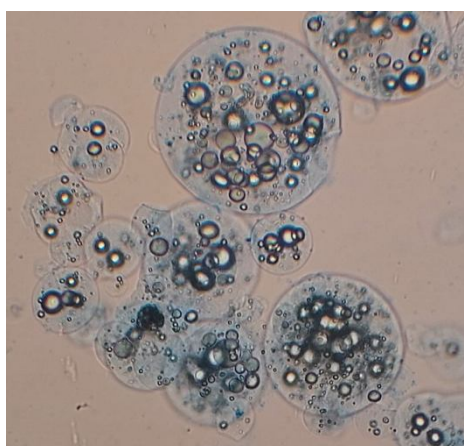


Рисунок 3.6 – Кальций-альгинатные микросферы с иммобилизованным ферментом, образующим синий комплекс с азокрасителем кумасси бриллиантовый синий G-250 (увеличение 160x)

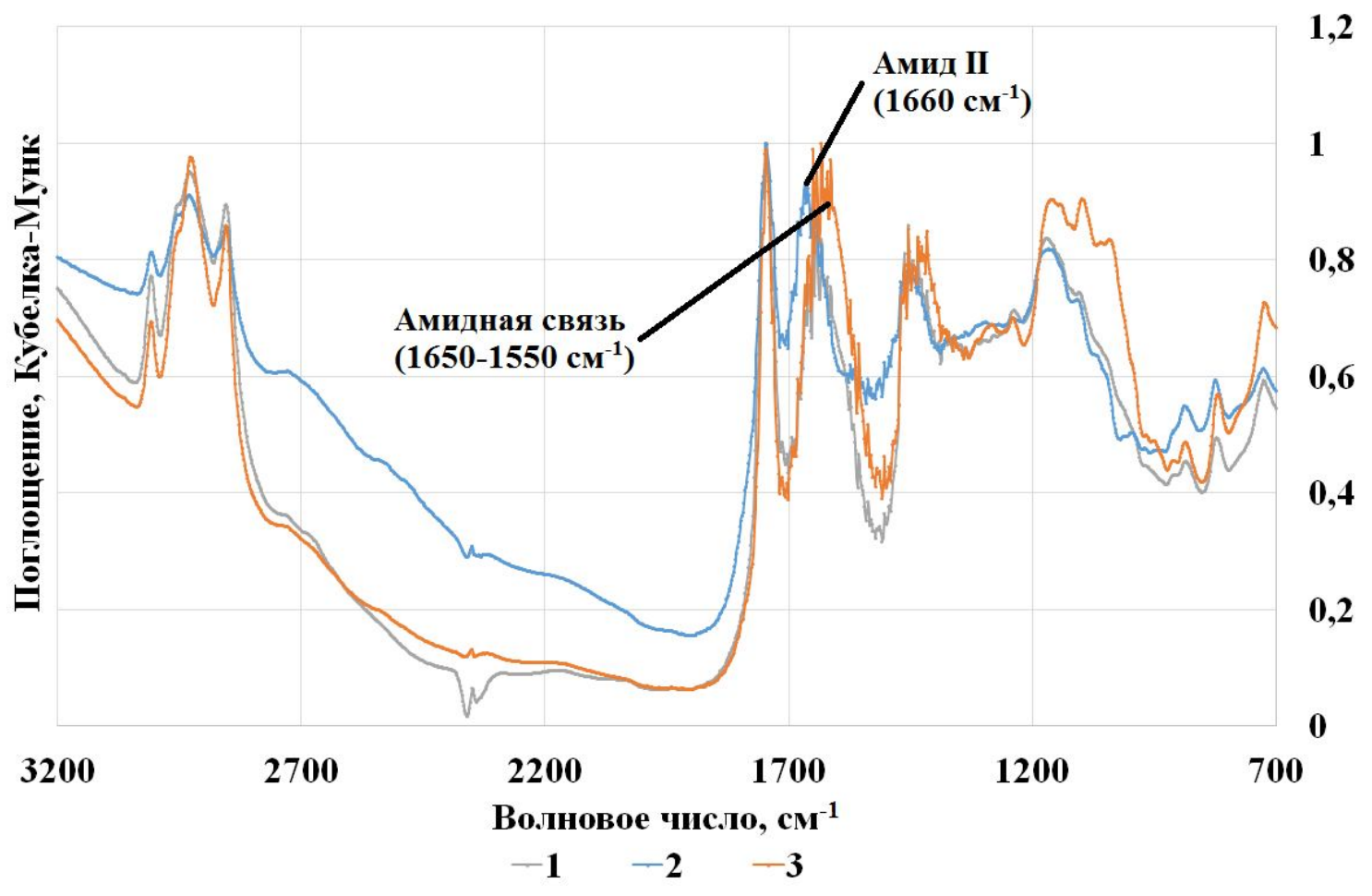
Известно, что кумасси бриллиантовый синий G-250, связываясь с аминокислотными остатками белков, образует с ними окрашенный синий комплекс [166]. На рисунке 3.6 отчетливо видна синяя окраска микросфер с иммобилизованной глюкозооксидазой, образующей комплекс с азокрасителем, что свидетельствует о наличии фермента на поверхности альгинатного носителя.

Следующим этапом исследования стало определение функциональных ковалентных связей, появляющихся в результате проведения реакции активации биополимерной матрицы.

### **3.6 Исследование биокатализатора с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии**

Изучение промежуточных форм биокатализатора методом инфракрасной Фурье-спектроскопии (рисунок 3.7) показало, что в спектре исходных альгинатных микросфер обнаружены полосы поглощения валентных колебаний O–H и C–H ( $4000-2700\text{ см}^{-1}$ ), интенсивные полосы  $1605-1608$  и  $1412-1413\text{ см}^{-1}$ , обусловленные асимметричными и симметричными валентными колебаниями карбоксильной группы и полосы валентных колебаний пиранозного кольца  $809\text{ см}^{-1}$ . В спектре альгинатных микросфер, активированных карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом, выявлена полоса поглощения эфира N-ацилмочевины (полоса Амид II) ( $1660\text{ см}^{-1}$ ), которая отсутствует в предыдущем спектре, что свидетельствует об эффективной активации свободных карбоксильных групп альгината для последующей иммобилизации. В спектре синтезированного биокатализатора выявлены полосы поглощения амидной связи –  $1650-1550\text{ см}^{-1}$ , что подтверждает образование ковалентной связи между активированными карбоксильными группами альгината натрия с аминогруппами глюкозооксидаз.

После подтверждения эффективности иммобилизации следующим этапом работы стало изучение кинетики ферментативных реакций.



1 – альгинатные микросферы; 2 – альгинатные микросферы, активированные EDC и NHS; 3 – альгинатные микросферы, активированные EDC и NHS, с нанесенной GOx

Рисунок 3.7 – Инфракрасные Фурье-спектры промежуточных форм биокатализатора

### 3.7 Изучение кинетики каталитических реакций

#### 3.7.1 Кинетика реакции при варьировании начальной концентрации субстрата и расчет кинетических параметров

Для ферментов (как нативных, так и иммобилизованных) основными кинетическими параметрами являются константа Михаэлиса ( $K_M$ ), предельная скорость реакции ( $V_m$ ) и активность биокатализатора ( $A$ ), рассчитываемые с помощью линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен из начальных скоростей реакции при различных начальных концентрациях субстрата [198].

Для определения кинетических параметров проводили окисление D-глюкозы кислородом воздуха при перемешивании магнитной мешалкой (скорость перемешивания  $300 \text{ мин}^{-1}$  – для исключения внешнедиффузионного торможения) при варьировании начальной концентрации D-глюкозы от 2,2 до 22 ммоль/л в эксперименте с оптимальным биокатализатором. В ходе реакции определялось количество образующегося в реакционной смеси пероксида водорода по методике, описанной выше в п. 2.4. Зависимости концентрации пероксида водорода от времени реакции при варьировании начальной концентрации D-глюкозы представлены на рисунке 3.8 для нативной GOx и на рисунке 3.9 для GOx, иммобилизованной на альгинатных микросферах (масса нативной GOx – 25 мг, аналогично содержанию GOx в иммобилизованном образце).

Из рисунков 3.8-3.9 видно, что GOx, иммобилизованная на альгинатных микросферах, обладает гораздо меньшей активностью по сравнению с ее свободной формой, что связано прежде всего с гетерогенизацией процесса, а также с потерями фермента во время иммобилизации. Иммобилизация также может снижать активность фермента вследствие деформации нативной конформации биомолекулы. Однако иммобилизация позволяет легко отделить фермент от реакционной среды и использовать его повторно, что компенсирует потерю активности при однократном использовании.

По полученным данным были рассчитаны кинетические параметры оптимального биокатализатора (активность  $A$ , предельная скорость реакции  $V_m$  и константа Михаэлиса  $K_M$ ), приведенные в таблице 3.6.



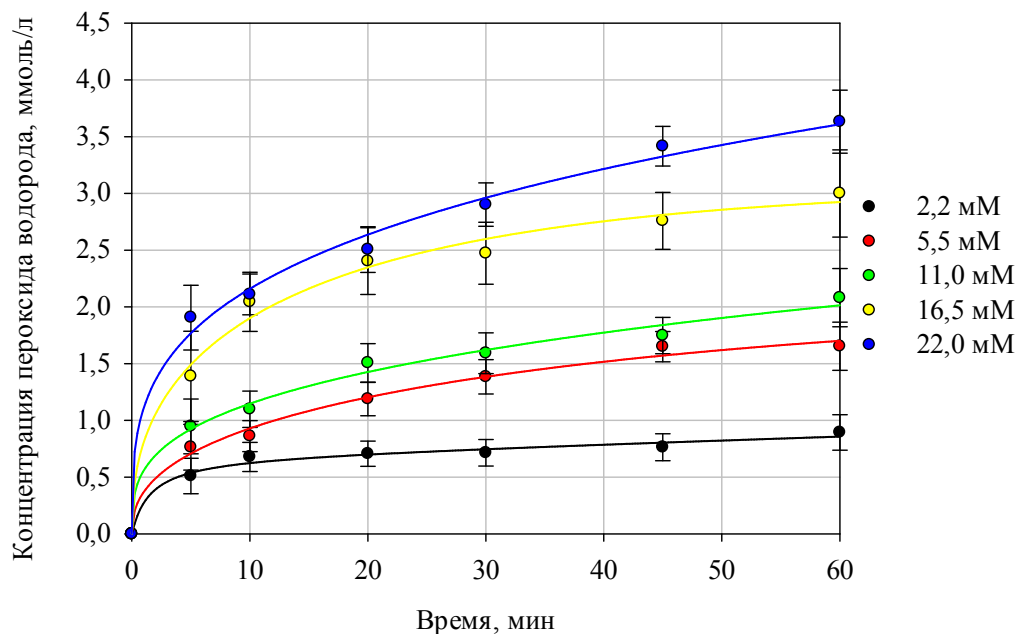


Рисунок 3.8 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для нативной GOx (pH = 6,0; t = 30°C)

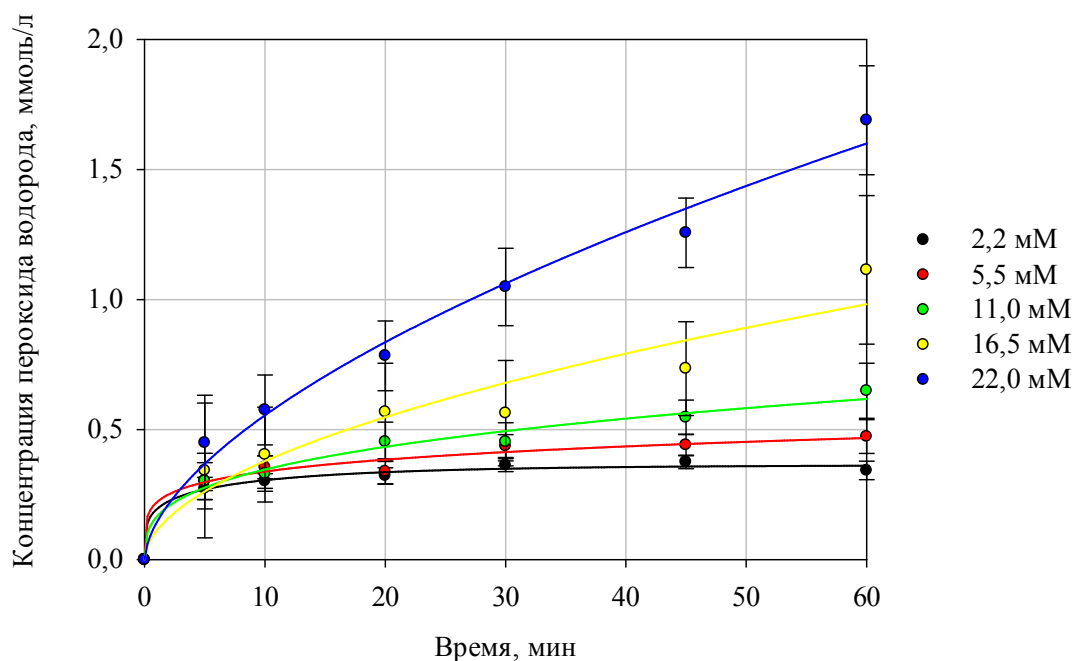


Рисунок 3.9 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для GOx, иммобилизованной на альгинатных микроферах (pH = 6,0; t = 30°C)

Таблица 3.6 – Кинетические параметры исследуемых биокатализаторов

Биокатализатор	A (ед.ак.×10 <sup>3</sup> )	K <sub>M</sub> , ммоль/л	V <sub>m</sub> , ммоль/л·мин
Нативная глюкозооксидаза	5,46±1,39	5,41±1,38	0,34±0,09
Иммобилизованная на альгинатных микросферах глюкозооксидаза (биокатализатор с установленным соотношением компонентов)	3,25±0,83	11,43±2,91	0,20±0,05

Как видно из таблицы 3.6 константа Михаэлиса для иммобилизованной глюкозооксидазы несколько выше, а предельная скорость реакции – ниже, что связано с уменьшением сродства фермента к субстрату, а также затруднением доступа субстрата к активным центрам фермента.

### 3.7.2 Кинетика реакции при варьировании нагрузки на биокатализатор

Для определения зависимости концентрации образующегося пероксида водорода от нагрузки на биокатализатор проводили окисление D-глюкозы кислородом воздуха при варьировании нагрузки на биокатализатор от 8,8 до 70,4 моль D-глюкозы на 1 мг GOx. Зависимости концентрации пероксида водорода от времени реакции при варьировании нагрузки на катализатор представлены на рисунке 3.10 для нативной GOx и на рисунке 3.11 для GOx иммобилизованной на альгинатных микросферах.

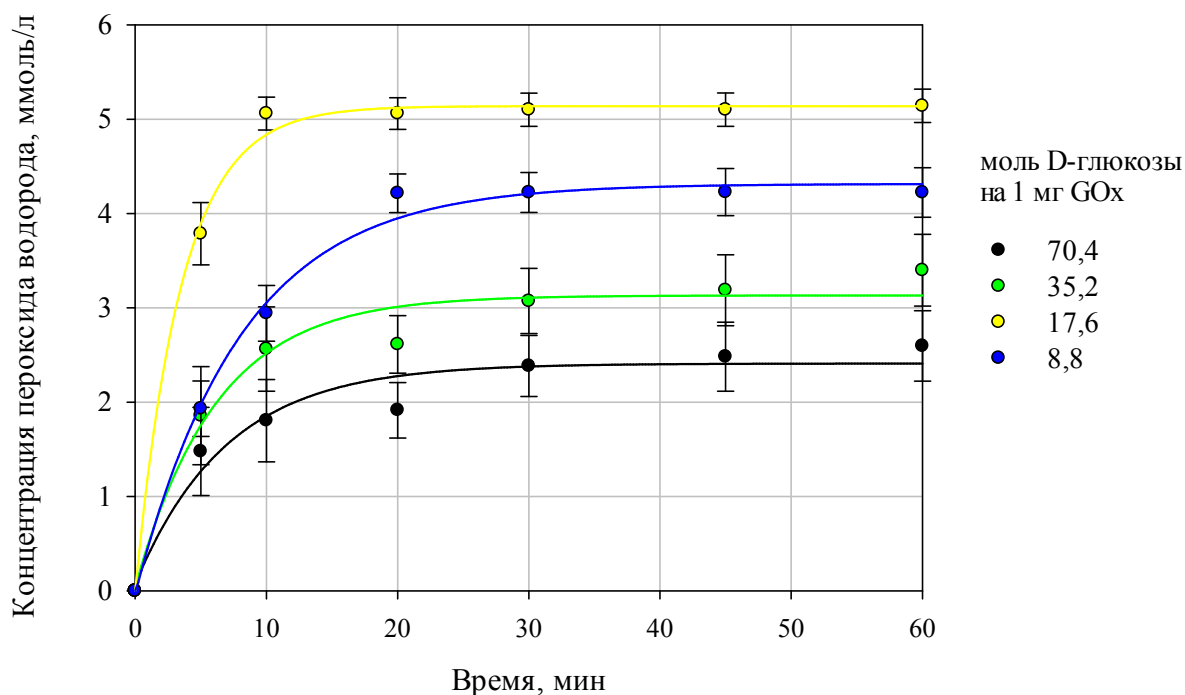


Рисунок 3.10 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различной нагрузке на биокатализатор для нативной GOx (pH = 6,0; t = 30°C)

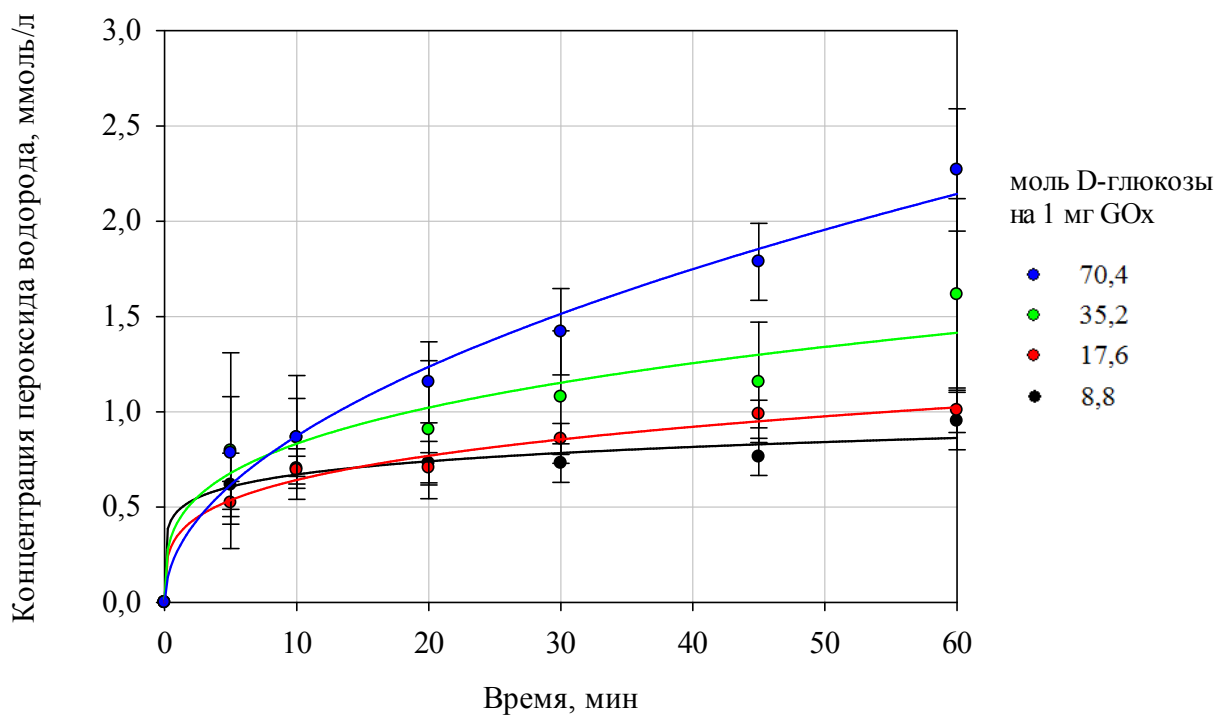


Рисунок 3.11 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различной нагрузке на биокатализатор для GOx, иммобилизованной на альгинатных микросферах (pH = 6,0; t = 30°C)

Из рисунков 3.10-3.11 видно, что эффективность работы нативной GOx существенно снижается при увеличении нагрузки на катализатор. Это может быть связано с ингибированием активных центров GOx субстратом или продуктом реакции. При этом активность иммобилизованной на альгинатных микросферах GOx практически не снижается при увеличении нагрузки на катализатор, что свидетельствует об увеличении устойчивости GOx к ингибирующим воздействиям субстрата и продукта реакции после иммобилизации.

### **3.7.3 Зависимость активности биокатализатора от pH**

На эффективность каталитического действия ферментов (как нативных, так и иммобилизованных) существенное влияние оказывает значение pH реакционной среды. В составе активных центров ферментов присутствуют ионогенные группы, меняющие свое состояние в зависимости от pH среды. Для любого фермента имеется интервал значений pH, в котором активность фермента наибольшая, при этом за счет иммобилизации (в основном – ковалентной) можно как расширять, так и сужать этот интервал [199]. На рисунке 3.12 представлена относительная активность (активность при определенном значении pH, отнесенная к активности при оптимальном значении pH для фермента (6,0-6,1), выраженная в процентах) для нативной и иммобилизованной на альгинатных микросферах GOx. Как видно из представленных данных, относительная активность иммобилизованной на альгинатных микросферах глюкозооксидазы в диапазоне pH, отличном от pH 6,0-6,1, выше, чем для нативного фермента: при pH 3,6-3,7 – на 21,7%, при pH 8,6-8,7 – на 5,97%, при pH 12,01-12,08 – на 19,91%.

Таким образом, как показали эксперименты, иммобилизация на альгинатных микросферах расширила рабочие диапазоны значений pH GOx по сравнению с растворимой формой фермента.

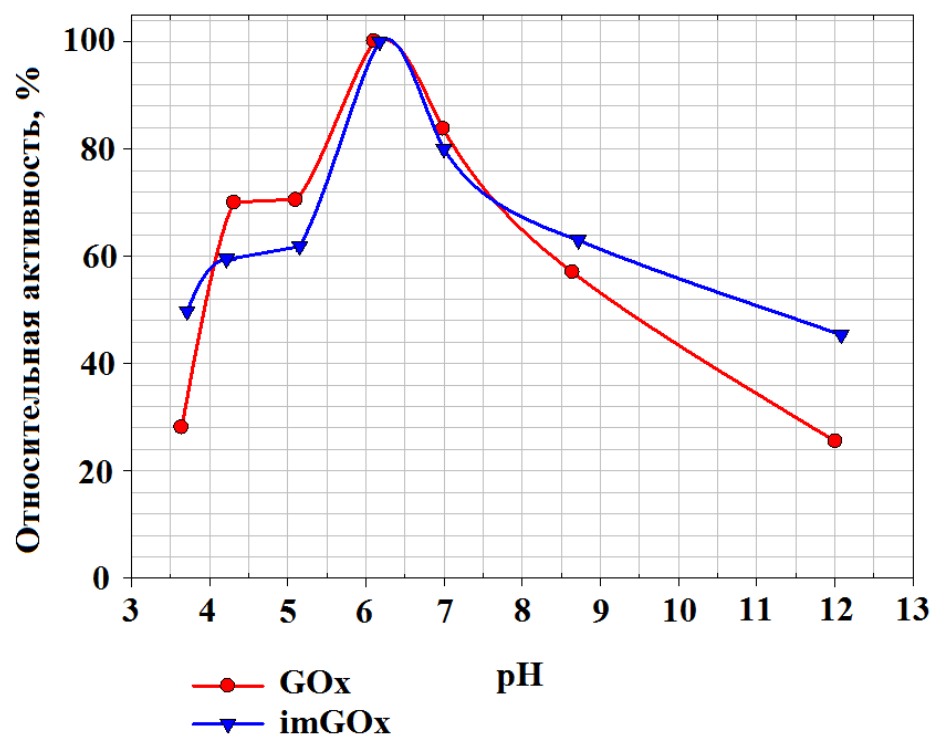


Рисунок 3.12 – Зависимость относительной активности свободной (GOx) и иммобилизованной (imGOx) глюкозооксидазы от значений pH реакционной среды

### 3.7.4 Зависимость активности биокатализатора от температуры

Значительное влияние на активность ферментов оказывает и температура. Для всех ферментов (и нативных, и иммобилизованных) характерно наличие определенного достаточно узкого интервала температур, при которых скорость превращений максимальна («колоколообразная» зависимость). Уменьшение температуры приводит к снижению скорости реакции за счет уменьшения числа молекул фермента и субстрата с высокой энергией, а увеличение – к денатурации белковых молекул ферментов [199]. На рисунке 3.13 представлена относительная активность (активность при определенном значении температуры реакционной смеси, отнесенная к активности при оптимальном значении температуры для фермента (30 °С), выраженная в процентах) для нативной и иммобилизованной на альгинатных микросферах GOx. Как видно из представленных данных, относительная активность иммобилизованной на альгинатных микросферах глюкозооксидазы в температурном диапазоне от 30 до 60 °С на 4-45 % выше, чем для нативного фермента.

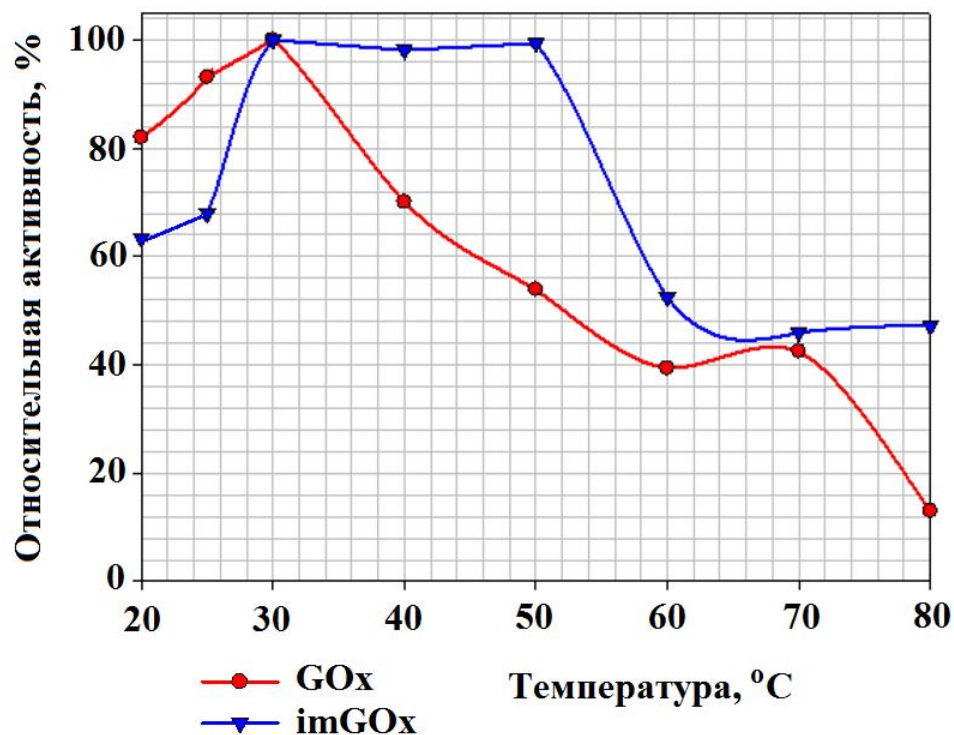


Рисунок 3.13 – Зависимость относительной активности свободной (GOx) и иммобилизованной (imGOx) глюкозооксидазы от температуры реакционной среды

Таким образом, как показали эксперименты, иммобилизация на альгинатных микросферах расширила рабочий диапазон температуры GOx по сравнению с растворимой формой фермента, что свидетельствует о более высокой устойчивости синтезированного биокатализатора. Увеличение стабильности иммобилизованного биокатализатора в диапазоне 30-50°C открывает перспективы его применения в прикладных биотехнологических процессах, например, в хлебопечении, где температура расстойки теста составляет 35-38 °C (согласно «Правилам организации и ведения технологического процесса на хлебопекарных предприятиях» [200]). Таким образом, иммобилизованная на биополимерных микросферах глюкозооксидаза может использоваться в качестве хлебопекарного улучшителя.

### 3.8 Термогравиметрические исследования биокатализатора

Термогравиметрический анализ синтезированного биокатализатора проводился с целью оценки изменений в его свойствах, происходящих в процессе выпечки хлебобулочных изделий.

На рисунке 3.14 приведена термогравиметрическая кривая для образца биокатализатора, нагретого со скоростью 20 °С в минуту до 100 °С в инертной среде аргона, на рисунке 3.15 – для образца, нагретого со скоростью 20 °С в минуту в окислительной среде аргон-кислород, до температуры 200 °С.

Как показали термогравиметрические исследования, при нагревании образцов до 100 °С происходит в большей степени дегидратация образцов с соответствующей потерей массы, что связано прежде всего с существенным снижением водосвязывающей способности биополимеров (к которым относятся и альгинат, и фермент). В альгинатной цепи одновременно с потерей капиллярно-сорбированной воды происходит переход макромолекул альгината натрия из конформации двойной спирали в конформацию статистического клубка [201]. При нагреве образца до температуры более 140 °С существенно интенсифицируются процессы разрушения связей в биокатализаторе, а также молекулах альгината и фермента, при этом происходит разрыв пептидной связи в биокатализаторе, гидролиз белковых молекул фермента, разрыв связей между мономерными звеньями альгинатной цепи и дегидратация, которая обусловлена термической конденсацией соседних гидроксильных групп звеньев [202]. Также при нагреве образца до температуры более 150 °С существенно увеличивается содержание в образце редуцирующих сахаров, что приводит к проявлению реакций карамелизации моно- и дисахаридов и меланоидинообразования редуцирующих сахаров и аминокислот с образованием окрашенных в бурый цвет соединений. Интенсивность окраски образца, нагретого до 200 °С существенно выше, что свидетельствует о достаточно большом количестве продуктов этих реакций. В образце, нагретом до 100 °С, окраска проявляется гораздо слабее, что свидетельствует в большей степени о потере образцом капиллярно-сорбированной воды.

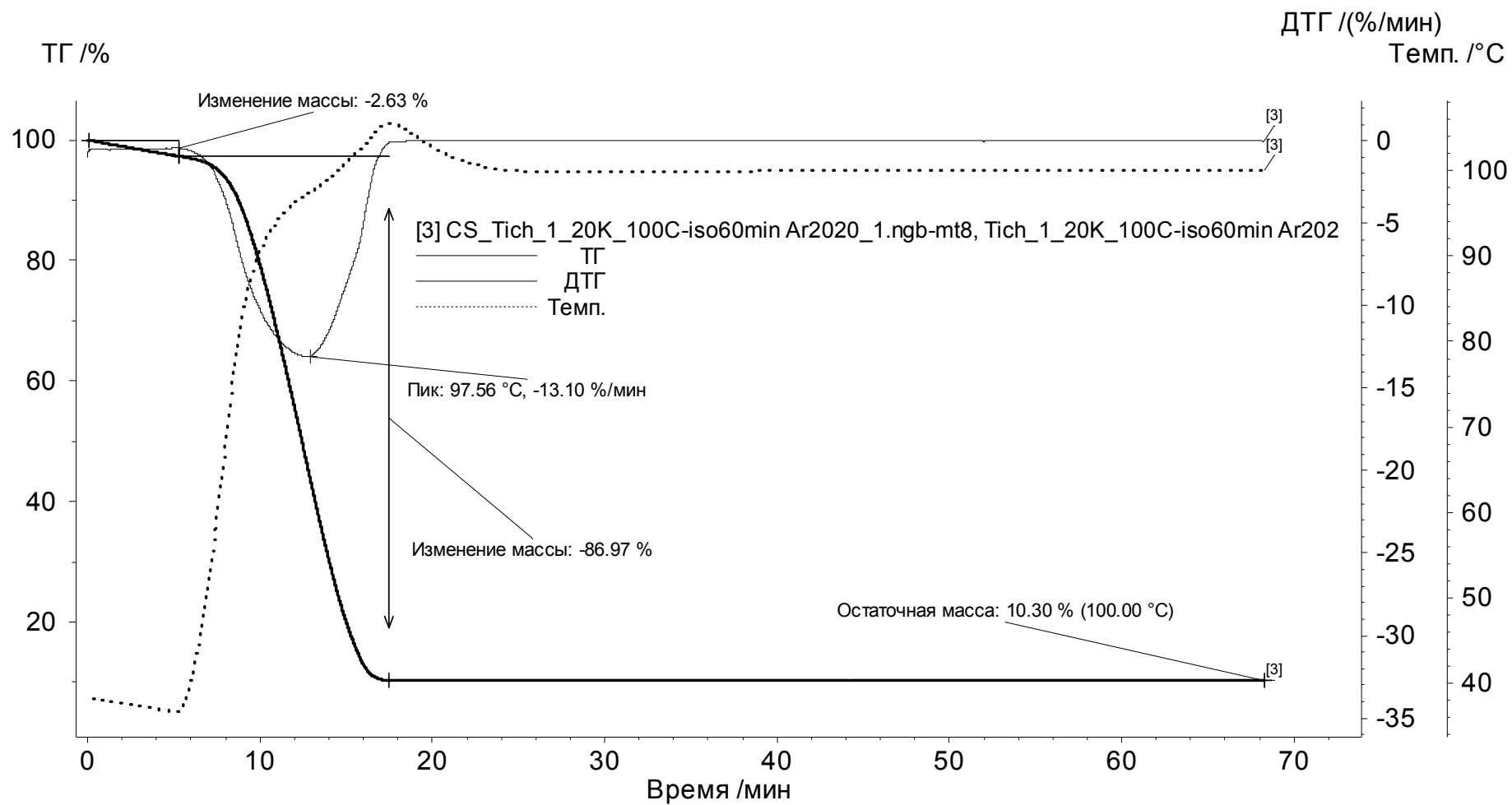


Рисунок 3. 14 – Термогравиметрическая кривая для образца биокатализатора, нагретого со скоростью 20 °С в минуту до 100 °С в инертной среде аргона



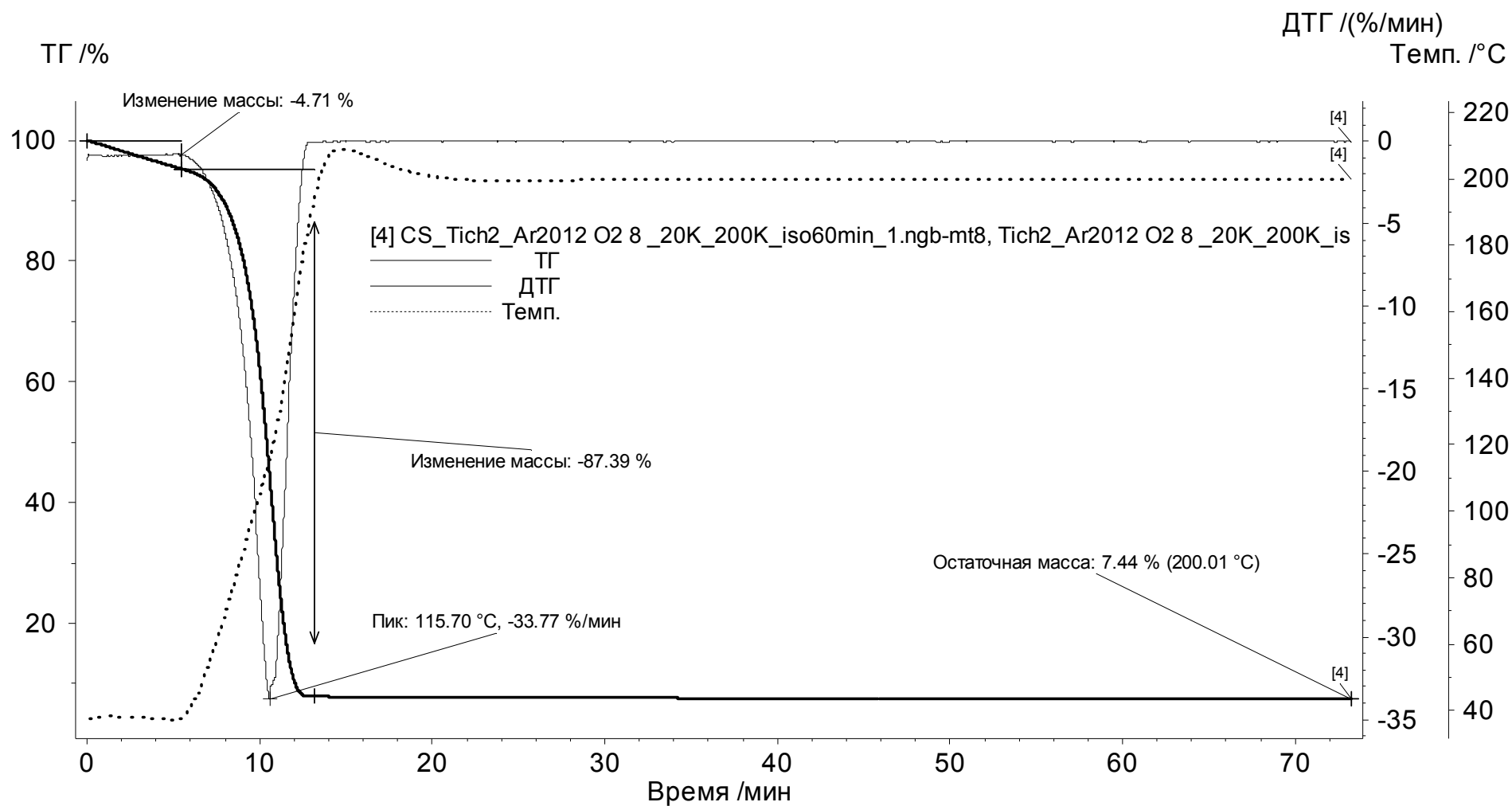


Рисунок 3.15 – Термогравиметрическая кривая для образца биокатализатора, нагретого со скоростью 20 °С в окислительной среде аргон-кислород, до температуры 200 °С

### 3.9 Использование биокатализатора в хлебопечении

Выбор конкретного иммобилизованного фермента или режима иммобилизации должен основываться на сопоставлении всех преимуществ и недостатков, присущих свободной и иммобилизованной форме энзима [203], что определяет использование получаемых биокатализаторов в тех или иных биотехнологических отраслях. Использование иммобилизованных ферментов и биокаталитических процессов на их основе стало постоянной технологической стратегией в рамках потребностей мировой биотехнологической промышленности, охватывающей отрасли медицины и фармацевтики, текстильные и биотопливные производства, охрану окружающей среды, пищевую индустрию и т.д. [204] Промышленное применение ферментов в рамках пищевого сектора включает в себя использование ферментативных процессов для получения продуктов питания (таких как выпечка, молочные продукты, использование в конверсии крахмала) и напитков (таких как пиво, вино, фруктовые и овощные соки) [203] с требуемыми потребительскими качествами, например, иммобилизованные в альгинатные гелевые шарики гликозидазы имеют большой потенциал для винодельческой промышленности, в частности, для улучшения ароматических свойств напитков [205].

Одним из интересных приложений глюкозооксидазы в пищевой индустрии является ее широкое применение в хлебопечении в свободной форме в качестве технологической добавки для улучшения хлебопекарных свойств теста [206]. Ферменты – важный ингредиент, используемый в большинстве хлебобулочных изделий, и они приобрели еще большее значение в выпечке из-за ограничений на использование химических добавок, особенно при производстве хлеба и других ферментированных продуктов. Ферментативная обработка пшеничной муки – интересная альтернатива для изменения структуры теста и, как следствие, улучшения функциональных свойств муки. Ферменты считаются натуральными, нетоксичными и безопасными (англ. Generally recognized as safe, GRAS) компонентами и не остаются активными в конечном продукте после выпечки [207-209].

Ферменты, сшивающие глютен, играют важную роль в современных процессах выпечки. Через различные биохимические механизмы (окислительное связывание тиоловых групп; сшивание остатков тирозина из-за действия промежуточных реакционноспособных соединений, таких как перекись водорода; ацил-трансферные реакции между аминокислотными остатками), эти ферменты способствуют образованию ковалентных связей между полипептидными цепями внутри белка (внутримолекулярные связи) или между различными белками (межмолекулярные связи), улучшая функциональное поведение теста во время процесса выпечки хлеба. Действие глюкозооксидазы обусловлено образующейся в результате реакции перекиси водорода, которая вызывает окисление свободных сульфгидрильных звеньев белков глютена (глиадинов и глютеинов) с образованием дисульфидных поперечных связей ( $-S-S-$ ), и гелеобразование водорастворимых пентозанов, тем самым изменяя реологические свойства теста из пшеничной муки. Образование дисульфидных и недисульфидных связей происходит за счет связывания двух остатков цистеина, которые находятся рядом в матрице пищевого белка, и сшивки дитирозином, что, как следствие, приводит к ковалентному сшиванию и образованию белковой сети. Также улучшение свойств мякиша может быть обусловлено сшиванием фракции альбумин/глобулин как дисульфидными, так и недисульфидными связями [207, 210, 211]. Глюкозооксидазу можно добавлять и в замороженное тесто с целью сохранения и поддержания его прочностных и реологических характеристик и для замедления его сиропирования [212]. Глюкозооксидаза также может использоваться в сочетании с другими ферментами, например, с липазой [213],  $\alpha$ -амилазой и ксиланазой [214].

Несмотря на хорошее воздействие на муку, свободная глюкозооксидаза все же имеет некоторые недостатки, а именно низкую стабильность в муке и тесте (25% активности фермента теряется в первые 5 минут замешивания с дополнительной потерей 20%, наблюдаемой через 20 минут). Имобилизация позволяет преодолеть эти недостатки. По сравнению со свободными ферментами в растворе иммобилизованные энзимы более устойчивы к изменениям окружающей среды [143]. Таким образом, использование глюкозооксидазы в иммобилизованном виде в качестве хлебопекарного улучшителя полностью оправдано.

В таблице 3.7 приведена сравнительная характеристика образцов, полученных при пробной выпечке без использования GOx, с использованием нативной GOx и с использованием иммобилизованной на альгинатных микросферах GOx.

Фотографии проведенной пробной выпечки приведены на рисунке 3.16, иллюстрирующие влияние добавленной глюкозооксидазы на внешнюю структуру хлеба.

а)



б)



в)



Рисунок 3.16 – Результаты пробной выпечки:

- а) без использования биокатализатора; б) 25 мг биокатализатора на 225 г муки;
- в) 100 мг биокатализатора на 225 г муки

Таблица 3.7 – Сравнительная характеристика образцов пробной выпечки

№	Добавка ГОх (на 225 г муки)	Характеристика
Без добавления фермента		
1	Без ГОх	<p>Пористость неравномерная, с отдельными пустотами, мякиш умеренно эластичный.                      Вкус обычный, без привкуса.                      Цвет – светло-коричневый, неравномерный.                      Мякиш крошится и липнет к ножу при нарезке.                      Форма булки – практически без закруглений (свидетельствует о плохом поднятии теста).                      Корка хрустящая, не очень прочная.                      Наблюдаются небольшие участки непромеса.</p>
С добавлением нативной ГОх		
2	0,5 мг	<p>Пористость неравномерная, с мелкими порами, мякиш умеренно эластичный.                      Вкус обычный, с кислым привкусом.                      Цвет – светло-коричневый.                      Мякиш крошится и липнет к ножу при нарезке.                      Форма булки – практически без закруглений (свидетельствует о плохом поднятии теста).                      Корка хрустящая, не очень прочная.                      Наблюдаются небольшие участки непромеса.</p>
3	2 мг	<p>Более высокая пористость, с наличием мелких, равномерных пор, мякиш умеренно эластичный.                      Вкус обычный, без привкуса.                      Цвет – светло-коричневый, тон светлее, чем без добавок.                      Мякиш не крошится и не липнет к ножу при нарезке.                      Форма булки – с ярко выраженным подъемом (закруглением) наверху (свидетельствует о хорошем поднятии теста).                      Корка хрустящая и прочная.                      Участков непромеса нет.</p>
4	4 мг	<p>Более высокая пористость, с мелкими, равномерными порами, мякиш умеренно эластичный.                      Вкус обычный, без привкуса.                      Цвет – светло-коричневый, тон светлее, чем без добавок.                      Мякиш не крошится и не липнет к ножу при нарезке.                      Форма булки – с ярко выраженным подъемом (закруглением) наверху (свидетельствует о хорошем поднятии теста).                      Корка хрустящая и прочная.                      Участков непромеса нет.</p>
5	8 мг	<p>Более высокая пористость, с мелкими, неравномерными порами, мякиш достаточно эластичный.                      Вкус обычный без привкуса.                      Цвет – светло-коричневый, тон светлее, чем без добавок.                      Мякиш не крошится, но прилипает к ножу при нарезке.                      Форма булки – с ярко выраженным подъемом (закруглением) наверху (свидетельствует о хорошем поднятии теста).                      Корка хрустящая и прочная.                      Есть небольшие участки непромеса (влажный мякиш) в центре мякиша.</p>

Продолжение таблицы 3.7

С добавлением GOx, иммобилизованной на альгинатных микросферах		
6	6,25 мг биокатализатора (0,5 мг GOx)	Хлеб более пористый, с мелкими, равномерными порами, мякиш очень эластичный. Вкус обычный без привкуса, чуть сладковатый. Цвет – светло-коричневый, тон светлее, чем без добавок. Мякиш не крошится, слегка липнет к ножу при нарезке. Форма булки – с выраженным подъемом (закруглением) наверху (свидетельствует о хорошем поднятии теста). Корка хрустящая и прочная. Есть небольшие участки непромеса в центре мякиша.
7	25 мг биокатализатора (2 мг GOx)	Хлеб более пористый, с мелкими, равномерными порами, мякиш очень эластичный. Вкус обычный, без неприятного привкуса, выраженный сладковатый. Цвет – светло-коричневый, тон светлее, чем без добавок. Мякиш не крошится, не липнет к ножу при нарезке. Форма булки – с выраженным подъемом (закруглением) наверху (свидетельствует о хорошем поднятии теста). Корка хрустящая и прочная. Участков непромеса нет.
8	50 мг биокатализатора (4 мг GOx)	Хлеб более пористый, с мелкими, равномерными порами, мякиш очень эластичный. Вкус обычный, без неприятного привкуса, выраженный сладковатый. Цвет – светло-коричневый, тон светлее, чем без добавок. Мякиш не крошится, не липнет к ножу при нарезке. Форма булки – с ярко выраженным подъемом (закруглением) наверху (свидетельствует о хорошем поднятии теста). Корка хрустящая и прочная. Участков непромеса нет.
9	100 мг биокатализатора (8 мг GOx)	Хлеб более пористый, с мелкими, неравномерными порами, мякиш достаточно эластичный, Вкус обычный без неприятного привкуса, выраженный сладковатый. Цвет – светло-коричневый, тон светлее, чем без добавок. Мякиш не крошится, прилипает к ножу при нарезке. Форма булки – с ярко выраженным подъемом (закруглением) наверху (свидетельствует о хорошем поднятии теста). Корка хрустящая и прочная. Есть небольшие участки непромеса (влажный мякиш) в центре мякиша.

Согласно ГОСТ 27839-2013, качество клейковины – это характеристика, обуславливаемая совокупностью реологических свойств (растяжимости, упругости, эластичности), обуславливающих величину деформации сжатия клейковины, сформованной в виде шарика массой 4 г, выражаемая в условных единицах

прибора типа ИДК - ед. ИДК - и классифицируемая по группам. Таким образом, условные единицы прибора типа ИДК отражают упруго-эластичные свойства клейковины, на основании которых можно сделать вывод о качестве готового изделия.

Используемая рецептура замеса включала в себя 35 г пшеничной муки и 20 мл воды, количество добавляемых микросфер с ферментом и без него варьировалось. Результаты измерения упруго-эластичных свойств клейковины, выраженные в условных единицах ед. ИДК, снятые с помощью измерителя деформации клейковины ИДК-3М, приведены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Зависимость упруго-эластичных свойств клейковины от количества добавки в тесто

Количество добавки в тесто, мг (в пересчете на 225 г муки)	Ед. ИДК	Качество клейковины (в соответствии с таблицей 6, ГОСТ 27839-2013)
0	95,8±0,5	Удовлетворительная слабая
Пустые альгинатные микросферы		
92	93,6±0,5	Удовлетворительная слабая
46	94,8±0,5	Удовлетворительная слабая
23	93,1±0,5	Удовлетворительная слабая
6	96,3±0,5	Удовлетворительная слабая
Альгинатные микросферы с GOx		
100 (8 мг GOx)	96,6±0,5	Удовлетворительная слабая
50(4 мг GOx)	95,5±0,5	Удовлетворительная слабая
25(2 мг GOx)	82,1±0,5	Удовлетворительная слабая
6(0,5 мг GOx)	90,3±0,5	Удовлетворительная слабая

Как показали эксперименты, хлеб без использования фермента отличается неравномерной пористостью, невыраженным вкусом, сильно крошится, липнет к ножу при нарезке, имеются небольшие участки непромеса, корка непрочная (рисунок 16, а). При использовании 25 мг биокатализатора хлеб получается более пористым, с наличием мелких равномерных пор, с выраженным сладковатым

привкусом; его мякиш не крошится и не липнет к ножу при нарезке, корка хрустящая и прочная, цвет мякиша имеет несколько более светлый тон, чем у хлеба без добавок, участки непромеса отсутствуют (рисунок 3.16, б). При увеличении содержания биокатализатора до 100 мг ухудшаются органолептические свойства мякиша – появляются участки непромеса, мякиш становится более липким и менее пористым (рисунок 3.16, в), что может быть связано с избыточным набуханием альгинатных микросфер в массе теста. Также известно, что добавление повышенных концентраций глюкозооксидазы в тесто из пшеничной муки приводит к значительным изменениям реологии теста и качества хлеба; степень эффекта сильно зависит от количества фермента и качества исходной пшеничной муки [210]. Данные согласуются со значениями ИДК, полученными с помощью измерителя деформации клейковины. Сырая клейковина без добавок демонстрирует качества, присущие удовлетворительно слабой клейковине. При использовании пустых микросфер нельзя сказать об улучшении качества теста – клейковина остается удовлетворительно слабой, а значения ИДК не подчиняются какой-либо определенной зависимости. При использовании фермента, иммобилизованного на альгинатных микрочастицах, качество клейковины претерпевает явные изменения. Наилучший результат показывает добавка 25 мг биокатализатора, демонстрирующая улучшение свойств клейковины, она становится более упругой и эластичной, что свидетельствует об активности фермента, проявляющейся в массе теста. Большие добавки биокатализатора практически не изменяют или немного увеличивают показатель ИДК, что связано с набуханием альгината в массе клейковины и появлением плотных участков непромеса.

Таким образом, экспериментально доказано, что добавление биокатализатора в количестве от 25 до 50 мг на 225 г муки благоприятно отражается на хлебопекарных свойствах муки и органолептических показателях готового хлебобулочного изделия, добавление биокатализатора в количестве выше 50 мг не является целесообразным. Использование иммобилизованной формы глюкозооксидазы значительно улучшает эластичность мякиша хлеба (по сравнению со свободной формой фермента). Это связано не только с увеличением стабильности фермента и его устойчивости к денатурации (что позволяет ферменту



оставаться активным в течение более длительного периода), но также с замедлением образования  $H_2O_2$  в тесте, т.к. большое количество перекиси снижает эластичность теста сразу после замеса, делая его сухим и крепким [143]. Увеличение стабильности иммобилизованного фермента в температурном диапазоне 30-60°C, что установлено в п. 3.7, позволяет ферменту сохранять активность в процессе замешивания теста, расстойки и выпечки в течение более долгого периода времени, таким образом, обеспечивая пролонгированное воздействие энзима на клейковину хлеба. Сладковатый привкус, получаемый в результате разложения микросфер альгината, не портит вкусовые свойства готового изделия.

Таким образом, было показано, что внесение иммобилизованной глюкозооксидазы при замесе способствует укреплению клейковины, увеличению прочности и эластичности теста и объёма изделия и образованию мякиша с улучшенными вязкоупругими и структурными свойствами, обеспечивает обрабатываемость теста, хорошее удержание газа, большой объём хлеба и тонкую структуру мякиша, что связано с окислением свободных сульфгидрильных групп в структуре клейковинных белков с последующим образованием дисульфидных связей, что согласуется с работами авторов [206, 209, 215]. При этом сам фермент инактивируется, а сами микросферы созданы на основе альгината – полимера, разрешенного в качестве вспомогательного материала для нужд пищевой промышленности.

### **3.10 Определение устойчивости биокатализатора при хранении и исследование его морфологии методом просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии**

Для определения устойчивости синтезированного биокатализатора при хранении была изучена его активность после хранения в течение 1 и 2 месяцев 3 способами: в сухом виде в холодильнике, в буферном растворе в холодильнике и в лиофильно высушенном виде в морозильной камере. Для выравнивания условий экспериментов перед определением активности биокатализатор выдерживался в буферном растворе с  $pH=6,0$  в течение 1 часа при комнатной температуре.

Результаты исследований в виде процента сохраненной активности приведены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Сохранение активности биокатализатора при хранении его различными способами

№	Способ обработки биокатализатора	Условия хранения биокатализатора	Влажность образца, % масс.	Сохранение исходной активности, %
1	Отфильтрованный и залитый буферным раствором (100 мл, рН = 6,0)	В холодильнике при +2...+4°C 2 месяца	86	19,6
2	Отфильтрованный и высушенный на воздухе	В холодильнике при +2...+4°C 2 месяца	12	61,3
3	Отфильтрованный, замороженный до -18°C и лиофильно высушенный	В морозильной камере при -18 °C 2 месяца	1,5	25,5
4	Отфильтрованный и залитый буферным раствором (100 мл, рН = 6,0)	В холодильнике при +2...+4°C 1 месяц	86	23,1
5	Отфильтрованный и высушенный на воздухе	В холодильнике при +2...+4°C 1 месяц	12	79,6
6	Отфильтрованный, замороженный до -18°C и лиофильно высушенный	В морозильной камере при -18°C 1 месяц	1,5	32,2

Из представленных данных видно, что наиболее эффективно хранение отфильтрованного биокатализатора в высушенном виде в холодильнике при +2-+4°C, что позволяет сохранить более 70% от исходной активности к истечению 1 месяца хранения и более 60% от исходной активности к истечению 2 месяцев хранения. При этом лиофильное высушивание и хранение в морозильной камере при -18°C, а также хранение в буферном растворе нецелесообразны, так как эти способы хранения приводят к существенному снижению активности биокатализатора. Значительная потеря активности глюкозооксидазы при лиофильной сушке связана с денатурацией фермента и с деформацией поверхности

альгинатных микросфер в результате обезвоживания в процессе лиофилизации [144]. Быстрая сублимация замороженной воды из альгинатной матрицы приводит к образованию полостей и трещин, где раньше присутствовали кристаллы льда [120], которые оказывают повреждающее воздействие на белок. Для защиты биообъектов могут использоваться различные покрытия микрочастиц другими полимерами, например, хитозаном [142, 143] или желатином [174].

Результаты исследования микросфер с иммобилизованным ферментом методом ПЭМ с использованием негативного контрастирования уранилацетатом приведены на рисунке 3.17, иллюстрирующем изменения в морфологии микрочастиц, происходящие в результате их замораживания и последующей лиофильной сушки.

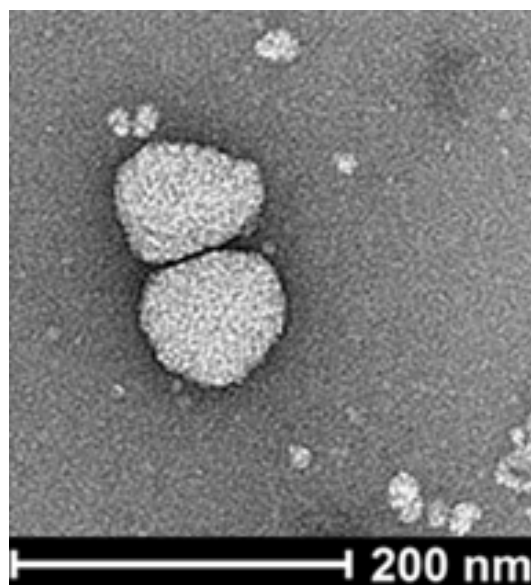


Рисунок 3.17 – Результаты исследования образцов методом ПЭМ

Лиофильно высушенные микросферы демонстрируют заметное уменьшение размеров по сравнению с влажной формой микрогеля. Также отмечается наличие определенных деформаций в структуре частиц, морщинистость, частичное утрачивание ими сферической формы. Все эти изменения морфологии иммобилизованного биокатализатора связаны, прежде всего, с потерями воды в результате быстрой сублимации замороженной воды из альгинатной матрицы. Объясняется это тем, что альгинат натрия представляет полимер, набухающий в водной среде и сохраняющий при этом сферическую форму, однако обезвоживание

во время лиофилизации приводит к потере способности поддерживать эту сферическую структуру [144]. При этом микросферы меньшего диаметра прилипают к поверхности более крупных частиц. Таким образом, изменения в биополимерной матрице, происходящие в результате лиофильного высушивания, объясняют потерю активности биокатализатора.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день микрогели на основе природного полисахарида – альгината, являются весьма привлекательными биополимерными носителями для иммобилизации ферментов, что делает использование биокатализаторов на их основе в различных биотехнологических процессах весьма перспективным. Физико-химические свойства альгината, а именно, наличие большого количества реакционноспособных групп и способность к гелеобразованию в мягких условиях, предоставляют широкие возможности для модификации и изменения химической структуры биополимера, обеспечивая эксплуатационную гибкость и значительные функциональные возможности для многоцелевого применения. Таким образом, иммобилизация ферментов на альгинатных гидрогелях позволяет преодолевать недостатки, присущие нативной форме энзимов, и получать эффективные биокатализаторы с заданными свойствами.

На основании проведенной исследовательской работы можно сделать следующие выводы:

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

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

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

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

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

6) Пробная выпечка с использованием синтезированного биокатализатора в качестве добавки к тесту показали, что добавление биокатализатора (25-50 мг на

225 г муки) при замесе благоприятно отражается на хлебопекарных свойствах муки и органолептических показателях готового хлебобулочного изделия, способствуя укреплению клейковины и образованию мякиша с улучшенными структурными свойствами.

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

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bilal M. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint / M. Bilal, Y. Zhao, S. Noreen, S. Z. H. Shah, R. N. Bharagava, H. M. N. Iqbal // *Biocatalysis and Biotransformation*. – 2019. – 37(3). – P. 159-182.
2. Labus K. Comparative Study on Enzyme Immobilization Using Natural Hydrogel Matrices—Experimental Studies Supported by Molecular Models Analysis / K. Labus, K. Wolanin, Ł. Radosinski // *Catalysts*. - 2020. – 10(5). –489.
3. Rehm F.B.H. Bioengineering toward direct production of immobilized enzymes: A paradigm shift in biocatalyst design / B. H. A. Rehm, S. Chen, B. H. A. Rehm // *Bioengineered*. - 2018. – 9(1). – P. 6-11.
4. Homaei A.A. Enzyme immobilization: an update / A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato // *Journal of Chemical Biology*. – 2013. – 6(4). – P. 185-205.
5. Basso A. Industrial applications of immobilized enzymes – A review / A. Basso, S. Serban // *Molecular Catalysis*. – 2019. – 479. –110607.
6. Chapman J. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks / J. Chapman, A. E. Ismail, C. Z. Dinu // *Catalysts*. - 2018. – 8(6). –238.
7. Sharmeen S. 11 – Application of polysaccharides in enzyme immobilization / S. Sharmeen, Md. S. Rahman, Md. M. Islam, Md. S. Islam, Md. Shahruzzaman, A. K. Mallik, P. Haque, M. M. Rahman // *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications* / Edited by: S. Maiti, S. Jana. – Woodhead Publishing, 2019. – P. 357-395.
8. Zdarta J. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility / J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo // *Catalysts*. - 2018. – 8(2). –92.
9. Bilal M. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization / M. Bilal, H. M. N. Iqbal // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – 130. – P. 462-482.
10. Bao Z. Natural Polymer-Based Hydrogels with Enhanced Mechanical Performances: Preparation, Structure, and Property / Z. Bao, C. Xian, Q. Yuan, G. Liu, J. Wu // *Advanced Healthcare Materials*. – 2019. –1900670.



11. Smith A.M. 13 – Biopolymers as wound healing materials / A.M. Smith, S. Moxon, G.A. Morris // *Wound Healing Biomaterials, Volume 2: Functional Biomaterials* / Edited by M. S. Ågren. – Woodhead Publishing, 2016. – P. 261-287.
12. Martau G.A. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability / G. A. Martau, M. Mihai, D. C. Vodnar // *Polymers*. - 2019. – 11(11). –1837.
13. Gheorghita R. Applications of Biopolymers for Drugs and Probiotics Delivery / R. Gheorghita, L. Anchidin□Norocel, R. Filip, M. Dimian, M. Covasa // *Polymers*. – 2021. – 13(16). –2729.
14. Vieira M.G.A. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review / M. G. A. Vieira, M. A. da Silva, L. O. dos Santos, M. M. Beppu // *European Polymer Journal*. – 2011. – 47. – P. 254–263.
15. Mohan S. Chapter 3: Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology / S. Mohan, O. S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas, S. P. Songca // *Recent Advances in Biopolymers* / Edited by Farzana Khan Perveen. – 2016. – P. 47-72.
16. Mensitieri G. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources / G. Mensitieri, E. Di Maio, G. G. Buonocore, I. Nedi, M. Oliviero, L. Sansone, S. Iannace // *Trends in Food Science & Technology*. – 2011. – 22. – P. 72-80.
17. Yadav P. Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review / P. Yadav, H. Yadav, V. G. Shah, G. Shah, G. Dhaka // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. – 2015. – 9(9). – P. 21-25.
18. Rendón-Villalobos R. Chapter 8: The Role of Biopolymers in Obtaining Environmentally Friendly Materials / R. Rendón□Villalobos, A. Ortiz□Sánchez, E. Tovar□Sánchez, E. Flores□Huicochea // *Composites from Renewable and Sustainable Materials* / Edited by M. Poletto. – 2016. – P. 151-159.
19. Kumaran S.K. 11 – Biopolymers and natural polymers / S. K. Kumaran, M. Chopra, E. Oh, H.-J. Choi // *Polymer Science and Nanotechnology Fundamentals and Applications* / Edited by R. Narain. – Elsevier, 2020. – P. 245-256.
20. Grujić R. 8 – Biopolymers as Food Packaging Materials / R. Grujić, D. Vujadinović, D. Savanović // *Advances in Applications of Industrial Biomaterials* /

Edited by: E. Pellicer, D. Nikolic, J. Sort, M. Baró, F. Zivic, N. Grujovic, R. Grujic, S. Pelemis. – Springer Cham, 2017. – P. 139–160.

21. Zhang Z. Chapter 23. Biodegradable Polymers / Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, J. Kohn // Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition) / Edited by R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti. – Academic Press, 2014. – P. 441-473.

22. Dave P.N. Chapter 3. Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials: Recent Trends and Their Applications / P. N. Dave, A. Gor // Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications. A volume in Micro and Nano Technologies / Edited by C. M. Hussain. – Elsevier, 2018. – P. 36-66.

23. Guarino V. Degradation properties and metabolic activity of alginate and chitosan polyelectrolytes for drug delivery and tissue engineering applications / V. Guarino, T. Caputo, R. Altobelli, L. Ambrosio // AIMS Materials Science. – 2015. – 2(4). – P. 497-502.

24. Szekalska M. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications / M. Szekalska, A. PuciBowska, E. Szymanska, P. Ciosek, K. Winnicka // International Journal of Polymer Science. – 2016. – 8. – P. 1-17.

25. Nagarajan A. Mini review on Alginate: Scope and Future perspectives / A. Nagarajan, A. Shanmugam, A. Zackaria // journal of Algal Biomass Utilization. - 2016. – 7(1). – P. 45-55.

26. Hariyadi D.M. Current Status of Alginate in Drug Delivery / D. M. Hariyadi, N. Islam // Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1-16.

27. Abasalizadeh F. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting / F. Abasalizadeh, S. V. Moghaddam, E. Alizadeh, E. Akbari, E. Kashani, S. M. B. Fazljou, M. Torbati, A. Akbarzadeh // Journal of Biological Engineering. – 2020. – 14(8). – P. 1–22.

28. Hasnain M.S. Chapter 6. Alginate nanoparticles in drug delivery / M. S. Hasnain, A. K. Nayak, M. Kurakula, M. N.Hoda // Alginates in Drug Delivery / Edited by: A. K. Nayak, M. S. Hasnain. – Academic Press, 2020. – P. 129-152.

29. Guo Y. New extraction technology and characterization of sodium alginate / Y. Guo, S. Zhang // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2020. – 474(5). – P. 1-8.
30. Alnoch R.C. Recent Trends in Biomaterials for Immobilization of Lipases for Application in Non-Conventional Media / R. C. Alnoch, L. A. dos Santos, J. M. de Almeida, N. Krieger, C. Mateo // Catalysts. – 2020. – 10(6). – 697.
31. Pereira L. Introductory Chapter: Alginates – A General Overview / L. Pereira, J. Cotas // Alginates - Recent Uses of This Natural Polymer / Edited by: L. Pereira. – 2020. – P. 1-16.
32. Urtuvia V. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production / V. Urtuvia, N. Maturana, F. Acevedo, C. Peña, A. Díaz Barrera // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2017. – 33:198. – 198.
33. Al-kafaween M.A. Effects of Trigona honey on the Gene Expression Profile of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 / M. A. Al-kafaween, A. B. M. Hilmi, N. Jaffar, H. A. N. Al-Jamal, M. K. Zahri, M. Amonov, B. Mabrouka, N. A. Elshoryi // Jordan Journal of Biological Sciences. – 2020. – 13(2). – P. 133 - 138.
34. Choukaife H. Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables / H. Choukaife, A. A. Doolaanea, M. Alfatama // Pharmaceuticals. - 2020. – 13(11). – 335.
35. Ertesvåg H. Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses / H. Ertesvåg // Frontiers in Microbiology. - 2015. - 6:523. – P. 1-10.
36. Parreidt T.S. Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications / T. S. Parreidt, K. Müller, M. Schmid // Foods. - 2018. – 7. – P. 170.
37. Puscaselu R.G. Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders / R. G. Puscaselu, A. Lobiuc, M. Dimian, M. Covasa // Polymers. – 2020. – 12(10). –2417.

38. Sreekumar K. A Comprehensive Review on Alginates / K. Sreekumar, B. Bindhu // International Journal of Recent Technology and Engineering (IJRTE). – 2019. – 8(1C2). – P. 1095-1097.
39. Sun J. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications / J. Sun, H. Tan // Materials. – 2013. – 6. – P. 1285-1309.
40. Wróblewska-Krepsztul J. Biopolymers for Biomedical and Pharmaceutical Applications: Recent Advances and Overview of Alginate Electrospinning / J. Wróblewska-Krepsztul, T. Rydzkowski, I. Michalska-Požoga, V. K. Thakur // Nanomaterials. – 2019. – 9. – 404.
41. Gutierrez E. 3D Printing of Antimicrobial Alginate/Bacterial-Cellulose Composite Hydrogels by Incorporating Copper Nanostructures / E. Gutierrez, P. A. Burdiles, F. Quero, P. Palma, F. Olate-Moya, H. Palza // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2019. – 5. – P. 6290–6299.
42. Okur N.Ü. An alternative approach to wound healing field; new composite films from natural polymers for mupirocin dermal delivery / N. Ü. Okur, N. Hökenek, M. E. Okur, S. Ayla, A. Yoltas, P. I. Sifaka, E. Cevher // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2019. – 27. – P. 738–752.
43. Szekalska M. *In vivo* anti-inflammatory and anti-allergic activities of cynaroside evaluated by using hydrogel formulations / M. Szekalska, K. Sosnowska, M. Tomczykowa, K. Winnicka, I. Kasacka, M. Tomczyk // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2020. – 121. – 109681.
44. Shtenberg Y. Mucoadhesive alginate pastes with embedded liposomes for local oral drug delivery / Y. Shtenberg, M. Goldfeder, H. Prinz, J. Shainsky, Y. Ghantous, I. A. El-Naaj, A. Schroeder, H. Bianco-Peled // Nanomaterials. – 2018. – 111. – P. 62-69.
45. El-Houssiny A.S. Sodium alginate nanoparticles as a new transdermal vehicle of glucosamine sulfate for treatment of osteoarthritis / A. S. El-Houssiny, A. A. Ward, D. M. Mostafa, S. L. Abd-El-Messieh, K. N. Abdel-Nour, M. M. Darwish, W. A. Khalil // Eur. J. Nanomed. – 2017. – 9(3–4). – P. 105–114.
46. Spadari C. de C. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis / C. de C. Spadari, F. W.

M. da Silva de Bastiani, L. B. Lopes, K. Ishida // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – 14. – P. 5187–5199.

47. Lenger E. Hollow Silver Alginate Microspheres for Drug Delivery and Surface Enhanced Raman Scattering Detection / E. Lengert, A. Yashchenok, V. Atkin, A. Lapanje, D. A. Gorin, G. Sukhorukov, B. Parakhonskiy // *RSC Advances*. – 2016. – 24. – P. 1-7.

48. Elmowafy M. Soy isoflavone-loaded alginate microspheres in thermosensitive gel base: attempts to improve wound-healing efficacy / M. Elmowafy, K. Shalaby, A. Salama, G. M. Soliman, N. K. Alruwaili, E. M. Mostafa, E. F. Mohammed, A. El Ghany A. Moustafa, A. Zafar // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2019. – 71(5). – P. 774-787.

49. Re-evaluation of alginic acid and its sodium, potassium, ammonium and calcium salts (E 400–E 404) as food additives / Peter Aggett [et al] // *EFSA Journal*. – 2017. – 15(11). – P. 1-57.

50. ТР ТС 029/2012. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств: технический регламент Таможенного союза: издание официальное: принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 20 июля 2012 г. № 58: введен впервые: дата введения 2013-07-1. – 308 с.

51. Rayner M. Chapter 5 - Application of Natural Polymers in Food / M. Rayner, K. Östbring, J. Purhagen // *Natural Polymers: Industry Techniques and Applications* / Edited by O. Olatunji. – Springer Cham, 2016. – P. 115–161.

52. Vilela C. A concise guide to active agents for active food packaging / C. Vilela, M. Kurek, Z. Hayouka, B. Röcker, S. Yildirim, M. D. C. Antunes, J. Nilsen-Nygaard, M. K. Pettersen, C.S.R. Freire // *Trends in Food Science & Technology*. – 2018. – 80. – P. 212–222.

53. Ching S.H. Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties / S.H. Ching, N. Bansal, B. Bhandari // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2017. – 57(6). – P. 1133-1152.

54. Essifi K. Optimization of gallic acid encapsulation in calcium alginate microbeads using Box-Behnken Experimental Design / K. Essifi, M. Lakrat, D.

Berraaouan, M. □ L. Fauconnier, A. El Bachiri, A. Tahani // Polymer Bulletin. – 2020. – 78(10). – P. 1–26.

55. Benavides S. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation / S. Benavides, P. Cortés, J. Parada, W. Franco // Food Chemistry. - 2016. – 204. – P. 77–83.

56. Kopp V.V. Microencapsulation of clove essential oil with gelatin and alginate / V. V. Kopp, C. B. Agustini, J. H. Z. dos Santos, M. Gutterres // XXXV. Congress of IULTCS. – 2019. – P. 1–7.

57. Gallo T.C.B. Oregano essential oil encapsulated in alginate beads: Release kinetics as affected by electrostatic interaction with whey proteins and freeze-drying / T. C. B. Gallo, M. G. Cattelan, I. D. Alvim, V. R. Nicoletti // Journal of Food Processing and Preservation. – 2020. – 44(12). – P. 1–11.

58. Abubakr N. Effects of encapsulation process parameters of calcium alginate beads on Vitamin B12 drug release kinetics / N. Abubakr, A. Jayemanne, N. Audrey, S. X. Lin, X. D. Chen // Journal of Food Processing and Preservation. – 2019. – 5. – P. 804–810.

59. Singh J. Optimizing microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol with pectin and sodium alginate / J. Singh, K. Kaur, P. Kumar // Journal of Food Science and Technology. - 2018. – 55. – P. 3625–3631.

60. Mong Thu T.T. Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginoseus* using alginate and different copolymer types / T. T. Mong Thu, W. Krasaekoopt // Agriculture and Natural Resources. - 2016. – 50. – P. 155-161.

61. Missau J. Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads / J. Missau, A.J Scheid, E. L Foletto, S. L Jahn, M. A Mazutti, R. C Kuhn // Sustainable Chemical Processes. – 2014. – 2:13. – P. 1-6.

62. Estevinho B.N. Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process / B. N. Estevinho, A. M. Damas, P. Martins, F. Rocha // Food Research International. – 2014. – 64. – P. 134-140.

63. Hariyadi D.M. Novel alginate gel microspheres produced by impinging aerosols for oral delivery of proteins / D. M. Hariyadi, Y. Wang, S. Chien-Yu Lin, T.

Bostrom, B. Bhandari, A. G. A. Coombes // Journal of Microencapsulation. – 2012. – 29(3). – P. 250–261.

64. Mahmoud M. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions / M. Mahmoud, N.A. Abdallah, K. El-Shafei, N. F. Tawfik, H. S. El-Sayed // Heliyon. – 2020. – 6(3). – P. 1–14.

65. Prasanna P.H.P. Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk / P.H.P. Prasanna, D. Charalampopoulos // Food Bioscience. – 2018. – 21. – P. 72-79.

66. Rajmohan D. Characterization of Spirulina-Alginate Beads Formed Using Ionic Gelation / D. Rajmohan, D. Bellmer // International Journal of Food Science. – 2019. – P. 1-8.

67. Paques J.P. Preparation methods of alginate nanoparticles / J.P. Paques, E. van der Linden, C.J.M. van Rijn, L.M.C. Sagis // Advances in Colloid and Interface Science. – 2014. – 209. – P. 163-171.

68. Uyen N.T.T. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review / N. T. T. Uyen, Z. Ain A. Hamid, N.X.T. Tram, N.B. Ahmad // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – 135. – P. 1035-1046.

69. Poncelet D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology / D. Poncelet, R. Lencki, C. Beaulieu, J.P. Halle, R.J. Neufeid, A. Fournier // Applied and Microbiology Biotechnology. – 1992. – 38. – P. 39-45.

70. Dhamecha D. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future / D. Dhamecha, R. Movsas, U. Sano, J. U. Menon // International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – 569. – 118627.

71. Brun-Graeppi A.K.A.S. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers / A.K.A.S. Brun-Graeppi, C. Richard, M. Bessodes, D. Scherman, Otto-Wilhelm Merten // Journal of Controlled Release. – 2011. – 149. – P. 209-224.

72. Wang L. Microspheres and Microcapsules for Protein Delivery: Strategies of Drug Activity Retention / L. Wang, Y. Liu, W. Zhang, X. Chen, T. Yang, G. Ma // Current Pharmaceutical Design. – 2013. – 19. – P. 6340-6352.

73. Zhongxiang F. Encapsulation techniques for food ingredient systems / F. Zhongxiang, B. Bhandari // Food materials science and engineering / Edited by B. Bhandari, Y. H. Roos. – West Sussex, United Kingdom: Wiley – Blackwell, 2012. – P. 320-348.
74. Draget K.I. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels / K. I. Draget, G. Skjak-Bræk, B. T. Stokke // Food Hydrocolloids. – 2016. – 20. – P. 170-175.
75. Mørch Y.A. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Sr}^{2+}$  on Alginate Microbeads / Y.A. Mørch, I. Donati, B.L. Strand, G. Skjak-Bræk // Biomacromolecules. – 2016. – 7(5). – P. 6724–6737.
76. Lee K.Y. Alginate: properties and biomedical applications / K. Y. Lee, D. J. Mooney // Progress in Polymer Science. – 2012. – 37(1). – P. 106–126.
77. Poojari R. Composite alginate microspheres as the next-generation egg-box carriers for biomacromolecules delivery / R. Poojari, R. Srivastava // Expert Opin Drug Deliv. – 2013. – 10(8). – P. 1061-1076.
78. Xie Y. Application of Alginate-Based Hydrogels in Hemostasis / Y. Xie, P. Gao, F. He, C. Zhang // Gels. - 2022. – 8(2). – 109.
79. Sosnik A. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers / A. Sosnik, K. P. Seremeta // Advances in Colloid and Interface Science. – 2015. – 223. – P. 40-54.
80. Szekalska M. Influence of Sodium Alginate on Hypoglycemic Activity of Metformin Hydrochloride in the Microspheres Obtained by the Spray Drying / M. Szekalska, M. Wróblewska, K. Sosnowska, K. Winnicka // International Journal of Polymer Science. – 2016. – P. 1-13.
81. Wang F. Retinoic acid-loaded alginate microspheres as a slow release drug delivery carrier for intravitreal treatment / F. Wang, S. He, B. Chen // Biomedicine & Pharmacotherapy. - 2018. – 97. – P. 722–728.
82. Bagheri L. Spray-dried alginate microparticles carrying caffeine-loaded and potentially bioactive nanoparticles / L. Bagheri, A. Madadlou, M. Yarmand, M.E. Mousavi // Food Research International. – 2014. – 62. – P. 1113-1119.



83. Bowey K. Characterization of biologically active insulin-loaded alginate microparticles prepared by spray drying / K. Bowey, B.E. Swift, L.E. Flynn, R.J. Neufeld // *Drug Development and Industrial Pharmac.* – 2013. – 39(3). - P. 457-465.
84. Sivadas N. Inhalable, bioresponsive microparticles for targeted drug delivery in the lungs / N. Sivadas, S.-A. Cryan // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* – 2011. – 63. – P. 369–375.
85. Hu L. Microencapsulation of brucea javanica oil: Characterization, stability and optimization of spray drying conditions / L. Hu, J. Zhang, Q. Hu, N. Gao, S. Wang, Y. Sun, X. Yang // *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* – 2016. – 36. – P. 46-54.
86. Bokkhim H. Characterization of alginate-lactoferrin beads prepared by extrusion gelation method / H. Bokkhim, N. Bansal, L. Grondahl, B. Bhandari // *Food Hydrocolloids.* – 2016. – 53. – P. 270-276.
87. Sarlesh R. A review on microspheres: methods of preparation and evaluation / R. Sarlesh, A. Pathak, N. Shrivastava, S. S. Baghel, R. S. Baghel // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* – 2016. – 1(1). – P. 422-438.
88. Raha A. Design and Characterization of Ibuprofen Loaded Alginate Microspheres Prepared by Ionic Gelation Method / A. Raha, S. Bhattacharjee, P. Mukherjee, M. Paul, A. Bagchi // *International Journal of Pharma Research and Health Sciences.* – 2018. – 6(4). – P. 2713-2716.
89. Bose P.S.C. Preparation and evaluation of indomethacin loaded alginate microsphere / P.S.C. Bose, R. Nagaraju, D. Saritha, B. Padmasri, P.S. Redd // *Ceska a Slovenska Farmacie.* – 2016. – 65. – P. 104-110.
90. Nayak A.K. Swelling and drug release behavior of metformin HCl-loaded tamarind seed polysaccharide-alginate beads / A.K. Nayak, D. Pal, K. Santra // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2016. – 82. – P. 1023-1027.
91. Chen K.-Yu. Preparation and Characterization of Quaternized Chitosan Coated Alginate Microspheres for Blue Dextran Delivery / K.-Yu Chen, Si-Y. Zeng // *Polymers.* – 2017. – 9(210). – P. 1-22.
92. Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable-Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice / Keerti, A. Gupta, V. Kumar, A. Dubey, A. K. Verma // *International Scholarly Research Notices.* – 2014. – P. 1-8.

93. Yu W. Study on membrane characteristics of alginate–chitosan microcapsule with cell growth / W. Yu, H. Song, G. Zheng, X. Liu, Y. Zhang, X. Ma // *Journal of Membrane Science*. – 2011. – 377. – P. 214– 220.
94. Moghtader F. Phages in modified alginate beads / F. Moghtader, S. Eğri, E. Piskin // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. - 2016. – 45(2). – P. 357-363.
95. Felix J.B. Protective antibody response following oral vaccination with microencapsulated *Bacillus Anthracis* Sterne strain 34F2 spores / J.B. Felix, S.P. Chaki, Y. Xu, T.A. Ficht, A.C. Rice-Ficht, W.E. Cook // *npj Vaccines*. – 2020. – 5 (59). – P. 1-12.
96. Zhang Y. Preparation of a colon-specific sustained-release capsule with curcumin-loaded SMEDDS alginate beads / Y. Zhang, Y. Bai, H. Chen, Y. Huang, P. Yuan, L. Zhang // *RSC Advances*. – 2017. – 7. – P. 22280–22285.
97. Chan L.W. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system / L.W. Chan, H.Y. Lee, P.W.S. Heng // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – 63. – P. 176–187.
98. Paques J.P. Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with  $\text{CaCl}_2$  nanoparticles / J. P. Paques, E. van der Linden, C.J.M. van Rijn, L.M.C. Sagis // *Food Hydrocolloids*. – 2013. – 31(2). – P. 428-434.
99. Chan E.-S. Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness / E.-S. Chan, T.-K. Lim, W.-P. Voo, R. Pogaku, B. Ti Tey, Z. Zhang / *Particuology*. – 2011. – 9. – P. 228-234.
100. Zhou Y. A new size and shape controlling method for producing calcium alginate beads with immobilized proteins / Y. Zhou, S. Kajiyama, H. Masuhara, Y. Hosokawa, T. Kaji, K. Fukui // *J. Biomedical Science and Engineering*. – 2019. – 2. – P. 287-293.
101. Prüße U. Bead production with JetCutting and rotating disc/nozzle technologies / U. Prüße, U. Jahnz, P. Wittlich, J. Breford, K.-D. Vorlop // *Landbauforschung Völkenrode*. – 2012. – 241. – P. 1-10.
102. Prüße U. Comparison of different technologies for alginate beads production / U. Prüße [et al.] // *Chemical Papers*. – 2018. – 62 (4). – P. 364–374.

103. Reis P.C. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles / C. P. Reis [et al.] // Chemical Papers. – 2016. – 23(3). – P. 245–257.
104. Liu Li. Preparation of monodisperse calcium alginate microcapsules via internal gelation in microfluidic-generated double emulsions / Li Liu, F. Wua, X.-J. Ju, R. Xie, W. Wang, C. Hui Niu, L.-Y. Chu // Journal of Colloid and Interface Science. – 2013. – 404. – P. 85–90.
105. Srisuwan Y. Preparation and Characterization of Keratin/Alginate Blend Microparticles / Y. Srisuwan, P. Srihanam // Advances in Materials Science and Engineering. – 2018. – P. 1-8.
106. Zhai P. Preparation and characterization of alginate microspheres for sustained protein delivery within tissue scaffolds / P. Zhai1, X B Chen, D. J Schreyer // IOP Publishing. - 2013. – 5. – P. 1-11.
107. Arisanti C.I.S. Chitosan Reinforced Alginate Microcapsules Retained The Release of Papain in Simulated Gastric Fluid / C.I.S. Arisanti, H. Rachmawati, J.S. Pamudji, Y.C. Sumirtapura // Journal of Pharmaceutical Science and Application. – 2012. – 1(1). – P. 47–61.
108. Patole V.C. Mesalamine-loaded alginate microspheres filled in enteric coated HPMC capsules for local treatment of ulcerative colitis: *in vitro* and *in vivo* characterization / V. C. Patole, A. P. Pandit // Journal of Pharmaceutical Investigation. – 2018. – 48. – P. 257–267.
109. Wang Q.-S. Colon targeted oral drug delivery system based on chitosan/alginate microspheres loaded with icariin in the treatment of ulcerative colitis / Q.-S. Wang, G.-F. Wang, J. Zhou, Li-Na Gao, Y.-Lu Cui // International Journal of Pharmaceutics. – 2016. – 515(1-2). – P. 176-185.
110. Soliman E.A. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity / E. A. Soliman, A.Y. El-Moghazy, M. S. M. El-Din, M. A. Massoud // Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences. – 2013. – 3. – P. 48-55.
111. Dong X. Encapsulation artocarpanone and ascorbic acid in O/W microemulsions: Preparation, characterization, and antibrowning effects in apple juice /

X. Dong, Q. Zhu, Y. Dai, J. He, H. Pan, J. Chen, Z.-P. Zheng // Food Chemistry. – 2016. – 192. – P. 1033-1040.

112. Hoesli C.A. Mammalian Cell Encapsulation in Alginate Beads Using a Simple Stirred Vessel / C.A. Hoesli, R.L.J. Kiang, K. Raghuram, R.G. Pedroza, K.E. Markwick, A.M.R. Colantuoni, J.M. Piret // Journal of Visualized Experiments. – 2017. – 124. – P. 1-12.

113. Börner R.A. Microcultivation of anaerobic bacteria single cells entrapped in alginate microbeads / R.A. Börner, M.T.A. Aliaga, B. Mattiasson // Biotechnol Lett. – 2013. – 35. – P. 397-405.

114. Sarkar P. Impact of starch-based emulsions on the antibacterial efficacies of nisin and thymol in cantaloupe juice / P. Sarkar, A. K. Bhunia, Y. Yao // Food Chemistry. - 2017. – 217. – P. 155-162.

115. Inanlou F. Preparation and in-vitro characterization of alginate microspheres incorporating leptospiral antigens as a delivery system and adjuvant / F. Inanlou, P. Khaki, N. Mohammadpour, H. Zolfagharian // Archives of Razi Institute. – 2016. – 71(3). – P. 161-168.

116. McClements D.J. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability / D. J. McClements // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. - 2017. - 47. – P. 611–649.

117. Rabanel J.-M. Progress Technology in Microencapsulation Methods for Cell Therapy / J.-M. Rabanel, X. Banquy, H. Zouaoui, M. Mokhtar // Biotechnol. Prog. – 2019. – 25(4). – P. 946–963.

118. Ramana Reddy K.V. Alginate Microspheres: The Innovative Approaches to Production of the Microbeads/Micro-Particles / K. V. Ramana Reddy, J. Gupta, P. Izharuddin // Journal of Drug Delivery & Therapeutics. - 2019. – 9(4-s). – P. 774-781.

119. Cook M.T. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery / M.T. Cook, G. Tzortzis, D. Charalampopoulos, V.V. Khutoryanskiy // Journal of Controlled Release. – 2012. – 162. – P. 56-67.

120. Holkem A.T. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying / A. T. Holkem, G.C. Raddatz, G.L. Nunes, A.J. Cichoski, E. Jacob-

Lopes, C.R. Ferreira Grosso, C.R. de Menezes // *LWT - Food Science and Technology*. – 2016. – 71. – P. 302-308.

121. Zhao Y. Preparation of Calcium Alginate Microgel Beads in an Electrodipersion Reactor Using an Internal Source of Calcium Carbonate Nanoparticles / Y. Zhao, M.T. Carvajal, You-Yeon Won, M.T. Harris // *Langmuir*. – 2017. – 23(25). – P. 12489-12496.

122. Poncelet D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry / D. Poncelet, B.P. De Smet, C. Beaulieu, M.L. Huguet, A. Fournier, R.J. Neufeld // *Applied and Microbiology Biotechnology*. – 1995. – 43. – P. 644-650.

123. Wan L.S.C. Drug encapsulation in alginate microspheres by emulsification / L. S. C. Wan, P. W. S. Heng, L. W. Chan // *J. Microencapsulation*. - 1992. – 9(3). – P. 309-316.

124. Poncelet D. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation / D. Poncelet // *Annals New York Academy of Sciences*. - 2011. - 944. – P. 74-82.

125. Mark D. Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzle / D. Mark, S. Haeberle, R. Zengerle, J. Ducree, G. T. Vladisavljevic // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2019. – 336. – P. 634–641.

126. Leong J.-Y. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems / J.-Y. Leong, W.-H. Lam, K.-W. Ho, W.-P. Voo, M. Fu-Xiang Lee, H.-P. Lim, S.-Lu Lim, B.-Ti Tey, D. Poncelet, E.-S. Chan // *Particuology*. – 2016. – 24. – P. 44-60.

127. Lupo B. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms / B. Lupo, A. Maestro, J. M. Gutierrez, C. Gonzalez // *Food Hydrocolloids*. – 2015. – 49. – P. 25-34.

128. Song H. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process / H. Song, W. Yua, M. Gao, X. Liu, X. Ma // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – 96. – P. 181-189.

129. Zhang H. Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers / H. Zhang, E. Tumarkin, R. May A. Sullan, G. C. Walker, E. Kumacheva // *Macromolecular Rapid Communication*. – 2017. – 28. – P. 527-538.
130. Wang C. Facile fabrication of hybrid colloidosomes with alginate gel cores and shells of porous CaCO<sub>3</sub> microparticles / C. Wang, H. Liu, Q. Gao, X. Liu, Z. Tong // *Chemphyschem*. – 2017. – 8(8). – P. 1157-1160.
131. Liu H. Microfluidic Generation of Uniform Quantum Dot-encoded Microbeads by Gelation of Alginate / H. Liu, G. Li, X. Sun, Y. He, S. Sun, H. Ma // *RSC Advances*. – 2013. – 1(3). – P. 1–7.
132. Liu X.D. Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources / X. D. Liu [et al.] // *J. microencapsulation*. – 2012. – 19(6). – P. 775-782.
133. Ribeiro A.J. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique / A.J. Ribeiro, C. Silva, D. Ferreira, F. Veiga // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – 25. – P. 31-40.
134. Vanderberg G.W. Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation / G. W. vanderberg, J. de la Noüe // *J. microencapsulation*. – 2011. – 18(4). – P. 433-441.
135. Cai S. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO<sub>3</sub> as calcium sources / S. Cai, M. Zhao, Y. Fang, K. Nishinari, G. O. Phillips, F. Jiang // *Food Hydrocolloids*. – 2014. – 39. – P. 295-300.
136. Lupo B. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate Cocoa polyphenols / B. Lupo, A. Maestro, M. Porras, J.M. Gutierrez, C. Gonzalez // *Food Hydrocolloids*. – 2014. – 38. – P. 56-65.
137. Guan H. Encapsulated ecdysone by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability / H. Guan, D. Chi, J. Yu, H. Li // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – 168. – P. 94-101.
138. Ahmed M.M. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium-sodium alginate microparticles / M.M. Ahmed, S. Abd El-Rasoul, S.H. Auda, M A. Ibrahim // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2013. – 21. – P. 61-69.

139. Silva C.M. Microencapsulation of Hemoglobin in Chitosan-coated Alginate Microspheres Prepared by Emulsification/Internal Gelation / C.M. Silva, A.J. Ribeiro, M. Figueiredo, D. Ferreira, F. Veiga // *The AAPS Journal*. – 2016. – 7(4). – P. 903-913.
140. Silva C.M. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability / C.M. Silva, A.J. Ribeiro, I.V. Figueiredo, A.R. Gonçalves, F. Veiga // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2016. – 311. – P. 1-10.
141. Ribeiro A.J. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres / A.J. Ribeiro, R.J. Neufeld, P. Arnaud, J.C. Chaumeil // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1999. – 187. – P. 115-123.
142. Liu Q. Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogelmicrospheres formulated by an emulsification–internalgelation–adsorption–polyelectrolyte coating method / Q. Liu, A. M. Rauth, X. Yu Wu // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – 339. – P. 148–156.
143. Wang X. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules / X. Wang, K.-X. Zhu, H.-M. Zhou // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – 12. – P. 3042-3054.
144. Ji R. Extending Viability of *Bifidobacterium longum* in Chitosan-Coated Alginate Microcapsules Using Emulsification and Internal Gelation Encapsulation Technology / R. Ji, J. Wu, J. Zhang, T. Wang, X. Zhang, L. Shao, D. Chen, J. Wang // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – 10. – P. 1-10.
145. Naranjo-Durán A.M. Modified-release of encapsulated bioactive compounds from annatto seeds produced by optimized ionic gelation techniques / A. M. Naranjo-Durán, J. Quintero-Quiroz, J. Rojas-Camargo, G. L. Ciro-Gómez // *Scientific Reports*. – 2021. – 11. – P. 1–10.
146. Ferri S. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird's Eye View of Glucose Sensing Enzymes / S. Ferri, K. Kojima, K. Sode // *Journal of Diabetes Science and Technology*. – 2011. – 5. – P. 1068-1076.
147. Dubey M.K. Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates / M.K. Dubey, A. Zehra, M. Aamir, M. Meena, L. Ahirwal, S. Singh, S. Shukla, R. S. Upadhyay, R. Bueno-Mari, V. K. Bajpai // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – 8. – P. 1-22.

148. Zehra A. Chapter 24 Fungal biomolecules and their implications / A. Zehra, M. K. Dubey, A. Tiwari, M. Meena, P. Kumari, V. K. Singh, V. K. Gupta, R. S. Upadhyay // *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments* / Edited by Dr. Vijai Kumar Gupta, Prof. Robert L. Mach, Prof. S. Sreenivasaprasad. – John Wiley & Sons, Ltd., 2015. – P. 363-375.
149. Kornecki J.F. Enzyme production of D-gluconic acid and glucose oxidase: successful tales of cascade reactions / J.F. Kornecki, D. Carballares, P.W. Tardioli, R.C. Rodrigues, A. Berenguer-Murcia, A.R. Alcantarae, R. Fernandez-Lafuente // *Catalysis Science & Technology*. – 2020. – 10. – P. 5740-5771.
150. Bankar S.B. Glucose oxidase - An overview / S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan // *Biotechnology Advances*. – 2019. – 27. – P. 489–501.
151. Sumaiya S. A. A Review on Glucose Oxidase / S. A. Sumaiya, R. Trivedi // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2015. – 4(8). – P. 636-642.
152. Lescovac V. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors / V. Leskovic, S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, D. Peričin // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2015. – 37(4). – P. 731-750.
153. Bollella P. Enzyme-Based Biosensors: Tackling Electron Transfer Issues / P. Bollella, E. Katz // *Sensors*, MDPI. – 2020. - 20(12). – P. 1-32.
154. Wilson R. Glucose oxidase: an ideal enzyme / R. Wilson, A.P.F. Turner // *Biosensors & Bioelectronics*. – 1992. – 7(3). – P. 165-185.
155. Rohmayanti T. Enzymatic activity of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* IPBCC.08.610 On Modified Carbon Paste Electrode as Glucose Biosensor / T. Rohmayanti, L. Ambarsari, A. Maddu // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2017. – 58. – P. 1-6.
156. Cao X. Catalytic activity and stability of glucose oxidase/horseradish peroxidase co-confined in macroporous silica foam / X. Cao, Y. Li, Z. Zhang, J. Yu, J. Qian, S. Liu // *Analyst*. – 2012. – 24(137). – P. 5785-5791.
157. Zhang Y. Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase–horseradish peroxidase cascade / Y. Zhang, S. Tsitkov, H. Hess // *Nature Communications*. – 2016. – 7. – 13982.



158. Nguyen L.T. Combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase for catalyzing cascade chemical reactions / Le T. Nguyen, K.-L. Yang // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2017. – 100. – P. 52-59.
159. Pitzalis F. A bienzymatic biocatalyst constituted by glucose oxidase and Horseradish peroxidase immobilized on ordered mesoporous silica / F. Pitzalis, M. Monduzzi, A. Salis // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2017. – 241. – P. 145-154.
160. Yuan M. A New Cold-Active Glucose Oxidase From *Penicillium*: High-Level Expression and Application in Fish Preservation / M. Yuan, C. Ning, S. Yang, Q. Liang, H. Mou, Z. Liu // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – 11. – P. 1-14.
161. Isolation and charecterization of Glucose Oxidase (GOD) from *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. / S.V. Bhat, B.R. Swathi, M. Rosy, M. Govindappa // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2013. – 2(6). – P. 153-161.
162. Zhu, X. Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery / X. Zhu, M. Su, S. Tang, L. Wang, X. Liang, F. Meng, Y. Hong, Z. Xu // *Mol. Vis.* – 2012. – 18. – P. 1973-1982.
163. Тихонов Б.Б. Определение активности глюкозооксидазы спектрофотометрическим методом / Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман // *Вестник Тверского государственного университета. Серия «Химия»*. – 2021. – 2(44). – С. 18–25.
164. Talens-Perales D. Enzymes: Functions and Characteristics / D. Talens-Perales, J. Marín-Navarro, J. Polaina // *Encyclopedia of Food and Health* / Edited by B. Caballero, P.M. Finglas, F. Toldrá. – Academic Press, 2016. – P. 532-538.
165. Bradford M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. - 1976. - 72. – P. 248-254.
166. Walker J.M. *The Protein Protocols Handbook, Second Edition* / Edited by J.M. Walker. – Humana Press Inc., 2012. – 1173p.
167. Martinsen A. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates / A. Martinsen, G.

Skjåk-Bræk, O. Smidsrød, F. Zanetti, S. Paoletti // Carbohydrate Polymers. – 1991. - 15 (2). – P. 171–193.

168. Усов А.И. Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определение состава и установления строения / А. И. Усов // Успехи химии. - 1999. – 68(11). – С. 1051-1061.

169. Ramos P.E. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics / P. E. Ramos, P. Silva, M. M. Alario, L. M. Pastrana, J. A. Teixeira, M. A. Cerqueira, A.A. Vicente // Food Hydrocolloids. – 2018. – 77. – P. 8-16.

170. Jiao W. Effects of Molecular Weight and Guluronic Acid/Mannuronic Acid Ratio on the Rheological Behavior and Stabilizing Property of Sodium Alginate / W. Jiao, W. Chen, Y. Mei, Y. Yun, B. Wang, Q. Zhong, H. Chen, W. Chen // Molecules. – 2019. – 24. –4374.

171. Davis T.A. H-NMR Study of Na Alginates Extracted from *Sargassum* spp. in Relation to Metal Biosorption / T.A. Davis [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2013. – 110. – P. 75-90.

172. Abka□khajouei R. Structures, Properties and Applications of Alginates / R. Abka□khajouei, L. Tounsi, N. Shahabi, A. K. Patel, S. Abdelkafi, P. Michaud // Marine Drugs. – 2022. – 20(6). –364.

173. Lee K.Y. Alginate: Properties and biomedical applications / K. Y. Lee, D. J. Mooney // Progress in Polymer Science. – 2012. – 37. – P. 106– 126.

174. Tu L. Preparation and characterization of alginate–gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/internal gelation / L. Tu, Y. He, H. Yang, Z. Wu, L Yi // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2015. – 26(12). – P. 735-749.

175. Baimark Y. Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca<sup>2+</sup> post-cross-linking / Y. Baimark, Y. Srisuwan // Advanced Powder Technology. – 2014. – 25(5). – P. 1541-1546.

176. Nagpal M. Formulation Development and Evaluation of Alginate Microspheres of Ibuprofen / M. Nagpal, D.K. Maheshwari, P. Rakha, H. Dureja, S. Goyal, G. Dhingra // Journal of Young Pharmacists. – 2012. – 4(1). – P. 13–16.

177. Uyen N.T.T. Fabrication and characterization of alginate microspheres / N.T.T. Uyen, Z.A.A. Hamid, A. Nurazreena // *Materials Today: Proceedings*. – 2019. – 17. – P. 792-797.
178. Kim E.S. Calcium-alginate microparticles for sustained release of catechin prepared via an emulsion gelation technique / E.S. Kim, Ji-Soo Lee, H.G. Lee // *Food Science and Biotechnology*. – 2016. – 25(5). - P. 1337-1343.
179. Martin M.J. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716 / M.J. Martin, F. Lara-Villoslada, M.A. Ruiz, M.E. Morales // *LWT - Food Science and Technology*. – 2013. – 53. – P. 480-486.
180. Zheng X. Omp16-based vaccine encapsulated by alginate-chitosan microspheres provides significant protection against *Haemophilus parasuis* in mice / X. Zheng, X. Yang, X. Li, G.-H. Qiu, A. Dai, Q. Huang, C. Huang, X. Guo // *Vaccine*. – 2017. – 35(10). – P. 1417-1423.
181. Квартальные успехи. Россия наращивает производство растительного масла в 2022 г. – Текст: электронный // *OleoScope.com* – информационно-аналитическое агентство: сайт. – 2017. – URL: <https://oleoscope.com/analytics/kvartalnye-uspehi-rossija-narashhivaet-proizvodstvo-rastitelnogo-masla-v-2022-g/> (дата обращения: 12.12.2022). – Текст: электронный.
182. Kukizaki M. Effects of Interfacial Tension and Viscosities of Oil and Water Phases on Monodispersed Droplet Formation Using a Shirasu-porous-glass (SPG) Membrane / M. Kukizaki, M. Goto // *Membrane*. – 2016. – 31(4). – P. 215-220.
183. Nan F. Uniform chitosan-coated alginate particles as emulsifiers for preparation of stable Pickering emulsions with stimulus dependence / F. Nan, J. Wu, F. Qi, Y. Liu, To Ngai, G. Ma // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2014. – 456. – P. 246-252.
184. Mohamed A.I.A. Influence of Surfactant Structure on the Stability of Water-in-Oil Emulsions under High-Temperature High-Salinity Conditions / A. I. A. Mohamed, A. S. Sultan, I. A. Hussein, G. A. Al-Muntasheri // *Journal of Chemistry*. – 2017. – P. 1–11.
185. Márquez A.L. Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleat / A. L.

Márquez, A. Medrano, L. A. Panizzolo, J. R. Wagner // Journal of Colloid and Interface Science. – 2010. – 341. – P. 101–108.

186. Ghiasi Z. Preparation and In Vitro Characterization of Alginate Microspheres Encapsulated with Autoclaved *Leishmania major* (ALM) and CpG -ODN / Z. Ghiasi, S. A. S. Tabasi, M. Tafaghodi // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. - 2017. – 10(2). – P. 90-98.

187. Machado A.H.E. Preparation of Calcium Alginate Nanoparticles Using Water-in-Oil (W/O) Nanoemulsions / A. H. E. Machado, D. Lundberg, A. J. Ribeiro, F. J. Veiga, B. Lindman, M. G. Miguel, U. Olsson // Langmuir. – 2012. – 28. – P. 4131–4141.

188. Alnaief M. Preparation of biodegradable nanoporous microspherical aerogel based on alginate / M. Alnaief, M.A. Alzaitoun, C.A. García-Gonzalez, I. Smirnova // Carbohydrate Polymers. – 2011. – 84. – P. 1011-1018.

189. Shukla S. Formulation and *in vitro* characterization of alginate microspheres loaded with diloxanide furoate for *colon*-specific drug delivery / S. Shukla, D. Jain, K. Verma, S. Verma // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2010. – 4(4). – P. 199–204.

190. Shao F. Microfluidic Encapsulation of Single Cells by Alginate Microgels Using a Trigger-Gellified Strategy / F. Shao, L. Yu, Y. Zhang, C. An, H. Zhang, Y. Zhang, Yi Xiong, H. Wang // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – 8. – P. 1–13.

191. Ertan F. Optimization of  $\alpha$ -Amylase Immobilization in Calcium Alginate Beads / F. Ertan, H. Yagar, B. Balkan // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2017. – 37(3). – P. 195–204.

192. Massoud R. Novel immobilized enzymes methods / R. Massoud, A. H. Hosseini, A. Massoud // The 2<sup>nd</sup> International Conference on Engineering & Information Technology. - 2021. - P. 1-6.

193. Nisha S. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme / S. Nisha, A. Karthick, N. Gobi // Chemical Science Review and Letters. – 2012. - 1(3). – P. 148-155.

194. Elnashar M.M.M. The Art of Immobilization using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology / M. M. M. Elnashar // Biotechnology of Biopolymers. - 2011. - 6. – P. 1-32.

195. Zhang D.-H. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme / D.-H. Zhang, Li-X. Yuwen, Li-J. Peng // *Journal of Chemistry*. - 2013. – P. 1-8.
196. Bezerra C.S. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends / C. S. Bezerra, C. M. G. de F. Lemos, M. de Sousa, L. R. B. Gonçalves // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2015. – 132(16). – 42125.
197. Kasoju N. 8 - Techniques for modifying biomaterials to improve hemocompatibility / N. Kasoju, L.T.B. Nguyen, A.R. Padalhin, J.F. Dye, Z. Cui, H. Ye // *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications. Blood-Biomaterials Interactions* / Edited by C. A. Siedlecki. – Woodhead Publishing, 2018. – P. 191-220.
198. Srinivasan B. A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond / B. Srinivasan // *FEBS Journal*. – 2021. – 289(20). – P. 1-13
199. Renneberg R. Chapter 2 - Enzymes: Molecular Supercatalysts for Use at Home and in Industry / R. Renneberg, V. Berkling, V. Loroeh // *Biotechnology for Beginners (Second Edition)* / Edited by R. Renneberg, V. Berkling, V. Loroeh. – Academic Press, 2016. – P. 35-63.
200. Правила организации и ведения технологического процесса на хлебопекарных предприятиях: официальное издание: утверждены Минсельхозпродом РФ от 12.07.99. – Москва, 1999. — 130 с.
201. Soares J. P. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt / J. P. Soares, J. E. Santos, G. O. Chierice, E. T. G. Cavaleiro // *Eclet. Quim.* – 2014. – 29(2). – P. 57—63.
202. Белоусова О. С. Изучение термодинамических и реологических свойств природных полимеров, перспективных для получения капсул фармацевтического назначения / О.С. Белоусова, Л.С. Дышлюк, А.Н. Австриевских, М.П. Щетинин // *Техника и технология пищевых производств*. – 2014. – 4. – P. 13—18.
203. Homaei A. 9 Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry / A. Homaei // *Advances in Food Biotechnology, First Edition* / Edited by Ravishankar Rai V. – John Wiley & Sons, Ltd. 2016. – P. 145-164.

204. Hassan M.E. Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications / M. E. Hassan, Q. Yang, Z. Xiao, Lu Liu, Na Wang, X. Cui, L. Yang // *3 Biotech.* – 2019. –9(12). – 440.
205. Tavernini L. Encapsulation of combi-CLEAs of glycosidases in alginate beads and polyvinyl alcohol for wine aroma enhancement / L. Tavernini, C. Aburto, O. Romero, A. Illanes, L. Wilson // *Catalysts.* – 2021. – 11(7). – 866.
206. Tang L. Preparation of immobilized glucose oxidase and its application in improving breadmaking quality of commercial wheat flour / L. Tang, R. Yang, X. Hua, C. Yu, W. Zhang, W. Zhao // *Food Chemistry.* – 2014. –161. – P. 1-7.
207. Caballero P.A. Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour / P.A. Caballero, M. Gómez, C.M. Rosell // *European Food Research and Technology.* – 2017. – 224(5). – P. 525-534.
208. Dagdelen A.F. Effects of glucose oxidase, hemicellulase and ascorbic acid on dough and bread quality / A. F. Dagdelen, D. Gocmen // *Journal of Food Quality.* – 2017. – 30(6). – P. 1009-1022.
209. Miguel Â.S.M. Chapter: 14. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends / Â. S. M. Miguel, T. S. Martins-Meyer, É. V. da C. Figueiredo, B. W. P. Lobo, G. M. Dellamora-Ortiz // *Food Industry* / Edited by I. Muzzalupo. – 2013. – P. 287-321.
210. Bonet A. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level / A. Bonet, C.M. Rosell, P.A. Caballero, M. Gómez, I. Pérez-Munuera, M.A. Lluch // *Food Chemistry.* – 2016. – 99(2). – P. 408-415.
211. Meerts M. Enhancing the rheological performance of wheat flour dough with glucose oxidase, transglutaminase or supplementary gluten / M. Meerts, H.V. Ammel, Y. Meeus, S.V. Engeland, R. Cardinaels, F. Oosterlinck, C.M. Courtin, P. Moldenaers // *Food and Bioprocess Technology.* – 2017. – 10(12). – P. 2188-2198.
212. Whitney K. Addition of Glucose Oxidase for the Improvement of Refrigerated Dough Quality / K. Whitney, Jae-Bom Ohm, S. Simsek // *Cereal Chemistry.* – 2014. – 91(6). – P. 548-553.
213. El-Rashidy, L.A. Improving Quality of Pan Bread by Using Glucose Oxidase and Lipase Enzymes / L.A. El-Rashidy, H. E. M. Bahlol, A. A. El-Desoky // *Middle East Journal of Applied Sciences.* – 2014. – 5(4). – P. 1035-1043.

214. Steffolani M.E. Combinations of glucose oxidase,  $\alpha$ -amylase and xylanase affect dough properties and bread quality / M. E. Steffolani, P. D. Ribotta, G. T. Pérez, A. E. León // International Journal of Food Science and Technology. – 2012. – 47(3). – P. 525-534.

215. Kouassi-Koffi J.D. Effects of Wheat Flour Dough's Viscoelastic Level by Adding Glucose Oxidase on its Dynamic Shear Properties whatever the Strain Modes / J.D. Kouassi-Koffi, V. Muresan, S.N. Gnangui, E. Mudura, L.P. Kouame // Food Science and Technology. – 2014. – 71(1). – P. 32-37.