

УДК 577.152.321; 620.3

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-2-119-136>

EDN LWMGXO



ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

Новые наноструктурированные носители для иммобилизации целлюлаз

А.М. Сульман[✉], В.П. Молчанов[✉], Д.В. Балакшина, О.В. Гребенникова, В.Г. Матвеева

Тверской государственный технический университет, Тверь, 170026 Россия

[✉] Автор для переписки, e-mail: А.М. Сульман, alexsulman@mail.ru; В.П. Молчанов, molchanov@science.tver.ru

Аннотация

Цели. Целлюлаза — мультиферментный комплекс, расщепляющий целлюлозу, содержащуюся в клеточных стенках растений. В состав целлюлазы входят ферменты трех видов: эндоглюканызы, экзоглюканызы и β -глюкозидазы, каждый из которых участвует в процессах разрушения определенных химических связей в целлюлозе. Нанобиокатализаторы на основе целлюлазы, иммобилизованной на наноструктурированных носителях, используются для каталитического гидролиза отходов биомассы, а также в пищевой промышленности и для защиты окружающей среды. Цель настоящего исследования — представить обзор научных разработок по иммобилизации целлюлазы на наноструктурированных носителях.

Методы. Проанализированы опубликованные за последние пять лет научные работы, касающиеся основных аспектов иммобилизации целлюлазы — фермента для переработки отходов целлюлозной биомассы — на наноструктурированных носителях. Рассмотрены методы иммобилизации целлюлазы, морфология наноструктурированных носителей, а также факторы, влияющие на активность ферментов и позволяющие достичь максимальной конверсии целлюлозосодержащих отходов растительного происхождения.

Результаты. Наноструктурированные носители обладают большой площадью поверхности, обеспечивая высокую эффективность иммобилизации, а также создают благоприятную среду для активизации целлюлазы и увеличения ее стабильности. Это позволяет создавать нанобиокатализаторы для эффективного превращения целлюлозного субстрата. Проведенный анализ последних тенденций показывает, что за последние пять лет в методах иммобилизации и составах носителей произошли положительные изменения. Описаны такие наноструктурированные носители, как слои графена, полимерные наночастицы, наногидрогели, нановолокна, кремнеземные наночастицы, иерархические пористые материалы и магнитные наночастицы.

Выводы. Магниторазделяемые носители повышают надежность биокатализатора и облегчают биокаталитические процессы. Использование магнитных наночастиц особенно выгодно ввиду их легкого отделения и возможности извлечения нанобиокатализатора для повторного использования.

Ключевые слова

целлюлаза, методы иммобилизации, наноструктурированные носители, переработка лигноцеллюлозной биомассы

Поступила: 24.10.2024
Доработана: 17.12.2024
Принята в печать: 18.02.2025

Для цитирования

Сульман А.М., Молчанов В.П., Балакшина Д.В., Гребенникова О.В., Матвеева В.Г. Новые наноструктурированные носители для иммобилизации целлюлаз. *Тонкие химические технологии*. 2025;20(2):119–136. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-2-119-136>

REVIEW ARTICLE

New nanostructured carriers for cellulase immobilization

Alexandrina M. Sulman✉, Vladimir P. Molchanov✉, Daria V. Balakshina, Olga V. Grebennikova, Valentina G. Matveeva

Tver State Technical University, Tver, 170026 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: A.M. Sulman, alexsulman@mail.ru; V.P. Molchanov, molchanov@science.tver.ru

Abstract

Objectives. Cellulase is a multienzyme complex that breaks down cellulose contained in plant cell walls. Cellulase consists of three types of enzymes: endoglucanase, exoglucanase, and β -glucosidase, each of which is involved in the destruction of certain chemical bonds in cellulose. Nanobiocatalysts based on cellulase immobilized on nanostructured carriers are used for catalytic hydrolysis of biomass waste, as well as in the food industry and for environmental protection. This article reviews scientific developments in the immobilization of cellulase on nanostructured carriers.

Methods. The article analyzes scientific papers published over the past five years that concerned the main aspects of immobilization of cellulase, an enzyme for processing cellulose biomass waste, on nanostructured carriers. The article examines methods of cellulase immobilization, the morphology of nanostructured carriers, and the factors affecting the enzyme activity and allowing one to achieve maximum conversion of cellulose-containing waste of plant origin.

Results. Nanostructured carriers have a large surface area, providing high immobilization efficiency, and also create a favorable environment for activating cellulase and increasing its stability. This allows one to create nanobiocatalysts for efficient conversion of cellulose substrate. The conducted analysis of the latest trends shows that positive changes have occurred in immobilization methods and carrier compositions over the past five years. The article describes such nanostructured carriers as graphene layers, polymer nanoparticles, nanohydrogels, nanofibers, silica nanoparticles, hierarchical porous materials, and magnetic nanoparticles.

Conclusions. Magnetically separable carriers increase the reliability of the biocatalyst and facilitate biocatalytic processes. The use of magnetic nanoparticles is especially advantageous due to their easy separation and the possibility of extracting the nanobiocatalyst for reuse.

Keywords

cellulase, immobilization methods, nanostructured carriers, processing of lignocellulosic biomass

Submitted: 24.10.2024

Revised: 17.12.2024

Accepted: 18.02.2025

For citation

Sulman A.M., Molchanov V.P., Balakshina D.V., Grebennikova O.V., Matveeva V.G. New nanostructured carriers for cellulase immobilization. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2025;20(2):119–136. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-2-119-136>

1. ВВЕДЕНИЕ

Дефицит традиционных видов топлива и тренд на постепенный отказ от их использования из-за экологических причин вызывают необходимость развития процессов переработки отходов растительного происхождения в биотопливо. Технология переработки лигноцеллюлозной биомассы в биотопливо включает множество стадий, и разложение целлюлозы до сбраживаемых сахаров (субстрат для производства биоэтанола) является наиболее важной из них [1]. Для обеспечения экологической безопасности при переработке лигноцеллюлозной биомассы следует максимально широко использовать биокаталитические процессы с участием ферментов, разлагающих целлюлозу до глюкозы [2–5]. Однако промышленное использование таких

ферментов ограничено ввиду их низкой термостабильности, наличия большого спектра примесей в ферментативных препаратах, сложности отделения ферментов от продуктов переработки и отсутствия возможности их повторного применения. Данные недостатки можно свести к минимуму или полностью устранить путем иммобилизации ферментов на различных носителях. Носители сохраняют вторичную и третичную структуру фермента и создают благоприятные условия для его взаимодействия с субстратом. Оптимальный носитель выбирают, опираясь на тип фермента и особенности технологического процесса [6–7].

Особое внимание исследователей привлекают процессы иммобилизации ферментов на наноструктурированных носителях с созданием нанобиокатализаторов [8–13]. К группе наноструктурированных

носителей относят материалы, содержащие элементы нанометрового размера (обычно от 1 до 100 нм), в том числе наночастицы (НЧ) различных форм, наностержни и нановолокна. В отличие от традиционных гранулированных носителей, наноструктурированные материалы минимизируют диффузионные ограничения массопереноса субстрата, а также обладают развитой площадью поверхности, что способствует эффективной иммобилизации ферментов, улучшению их расположения на поверхности и, соответственно, росту ферментативной активности [14, 15].

Настоящее исследование представляет собой обзор научных разработок по иммобилизации целлюлазы на наноструктурированных носителях. Целлюлаза — это мультиферментный комплекс, расщепляющий целлюлозу, содержащуюся в клеточных стенках растений. В состав целлюлазы входят ферменты трех видов: эндоглюканазы, экзоглюканазы и β -глюкозидазы, каждый из которых участвует в процессах разрушения определенных химических связей в целлюлозе [10, 16].

Лигноцеллюлозная биомасса содержит полисахариды (целлюлозу и гемицеллюлозу), а также ароматический полимер лигнин, присутствие которого подавляет гидролиз целлюлозы. Иммобилизация целлюлазы на наноструктурированных носителях, помимо стабилизации и возможности повторного использования биокатализатора, изменяет поверхностный заряд фермента, уменьшая его неспецифическое связывание с лигнином и усиливая сродство с целлюлозой [17, 18]. В большинстве случаев отходы лигноцеллюлозной биомассы сначала требуют делигнификации с помощью другого ферментативного катализатора — лакказы из *Trichoderma asperellum*, прежде чем целлюлаза сможет эффективно гидролизовать целлюлозу [19], либо реализуется совместная иммобилизация нескольких ферментов на одном носителе [20–22].

В данном обзоре обсуждаются публикации последних 5 лет, посвященные целлюлазе, иммобилизованной на наноструктурированных носителях. Особое внимание уделено методам иммобилизации целлюлазы, а также типам наноструктурированных носителей, в том числе магнитоотделяемым. Преимущества применения иммобилизованной целлюлазы описаны по данным анализа биокаталитических процессов переработки целлюлозосодержащей биомассы с получением сахаров.

2. СПОСОБЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ

Известные методы иммобилизации целлюлазы на наноструктурированных носителях не отличаются оригинальностью и включают адсорбцию,

инкапсуляцию, захват в полимерную матрицу, ковалентное присоединение и поперечную сшивку [23]. Наиболее распространенным методом является ковалентное связывание за счет образования химических связей между функциональными группами в молекуле целлюлазы и реакционноспособными группами на поверхности носителя. Благодаря прочным ковалентным связям иммобилизованная целлюлаза обладает хорошей стабильностью и возможностью многократного использования при сохранении достаточно высокой активности. Этот метод иммобилизации необходим в таких отраслях, где особенно важна стабильность целлюлазы и возможность ее повторного использования. В то же время, в производствах, где первостепенное значение имеют простота и экономическая эффективность, например, в мелкомасштабном сельском хозяйстве или пищевой промышленности, часто предпочтение отдается методам физической адсорбции, поперечного сшивания или захвата [24].

В конечном счете, при выборе метода иммобилизации целлюлазы следует руководствоваться конкретными требованиями по применению, а также разумным балансом между производительностью, стабильностью и стоимостью.

2.1. Адсорбция

Метод физической адсорбции использовался для иммобилизации целлюлазы на металлоорганических каркасах (metal-organic frameworks, MOFs) [25, 26], композитах на основе оксида железа и кислотно-активированных монтмориллонитов [27], многостенных углеродных нанотрубках (multiwalled carbon nanotubes, MWCNTs) [28]. Важными факторами для адсорбции являются высокая площадь поверхности, подходящий размер пор носителя, противоположные суммарные заряды фермента и носителя [29].

В работе [30] показано, что предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы ионными жидкостями облегчает ее гидролиз, однако, ионные жидкости могут разрушать фермент. Чжоу и соавт. [25] изучали устойчивость к ионным жидкостям нанобиокатализаторов на основе нескольких MOF (с различными металлами) и физически адсорбированной целлюлазы. Авторами [26] было обнаружено, что наиболее эффективным способом защиты иммобилизованной целлюлазы от негативного влияния ионных жидкостей на ферментативную активность или способом уменьшения десорбции является модификация поверхности носителя до адсорбции. Обработка поверхности цеолитными имидазолатными каркасными соединениями (zeolitic imidazolate frameworks, ZIF-8, т.е. MOF, которые состоят из Zn^{2+}

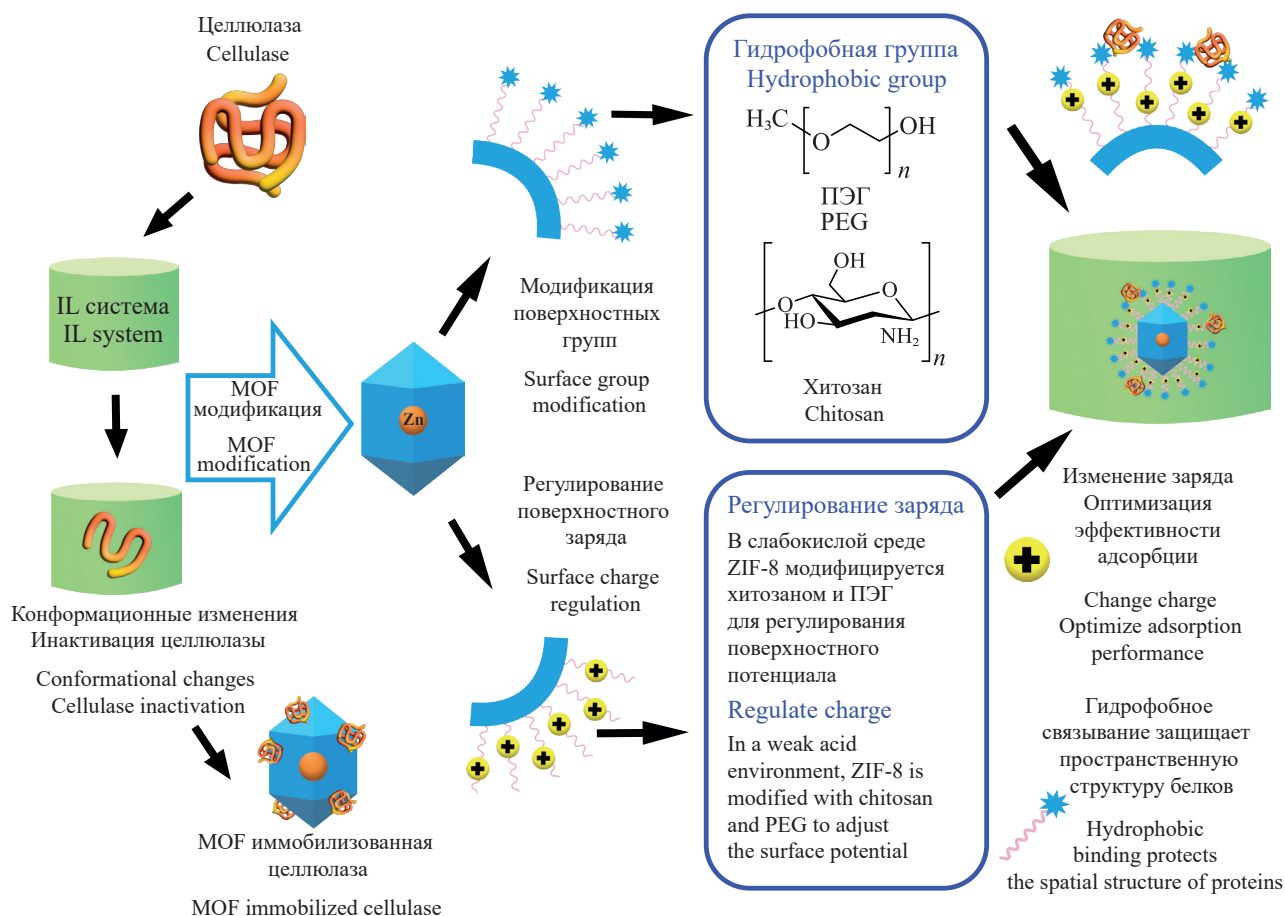


Рис. 1. Функциональная модификация ZIF-8 (модификация поверхностных групп/регулирование поверхностного заряда) и ее влияние на иммобилизованную целлюлазу (защита пространственной структуры фермента) [26]. ПЭГ — полиэтиленгликоль; IL — ionic liquid; MOF — metal-organic frameworks

Fig. 1. Functional modification of ZIF-8 (modification of surface groups/regulation of surface charge) and its effect on immobilized cellulase (protection of the spatial structure of the enzyme) [26]. PEG is polyethylene glycol; IL system is ionic liquid system; MOF are metal-organic frameworks

и 2-метилимидазольных лигандов), изменяющими заряд (например, хитозаном), или макромолекулами, изменяющими гидрофобность (такими как полиэтиленгликоль), позволяет уменьшить десорбцию фермента (рис. 1).

Модификация Zr-содержащих MOF UiO-66¹ аминогруппами увеличивает содержание фермента на носителе (с 220 до 350 мг/г) за счет формирования на поверхности носителя дополнительных «якорей» (NH₂-групп) [31].

В некоторых работах было показано, что возможна модификация биокатализатора и после адсорбции ферментов. Адсорбция целлюлазы на углеродных нанотрубках с последующей обработкой альгинатом натрия обеспечивает повышенную стабильность биокатализатора [28]. При этом постепенное снижение

активности с каждым реакционным циклом (после 7 циклов повторного гидролиза карбоксиметилцеллюлозы активность иммобилизованной целлюлазы остается на уровне 71.5%) вызвано слабыми нековалентными взаимодействиями между целлюлазой и носителем (MWCNTs). После 30-дневного хранения иммобилизованной и растворимой целлюлазы активность фермента остается на уровне 71.2 и 56.8% от первоначальной активности соответственно. Таким образом, стабильность целлюлазы при хранении незначительно повышается после иммобилизации, что считается важным условием для ее промышленного применения. Оригинальный метод иммобилизации целлюлазы был предложен Чжу и соавторами. Они адсорбировали фермент на НЧ Fe₃O₄+C за счет электростатических

¹ UiO – Universitetet i Oslo, норвеж. [UiO is University of Oslo (Norwegian—Universitetet i Oslo).]

взаимодействий, а затем покрывали эти НЧ тонким слоем осажденного кремнезема, который усиливал адсорбцию целлюлазы (содержание фермента на носителе достигало 200 мг/г) и при этом сохранял ее ферментативные функции [32].

Модификация или функционализация носителя часто позволяет получать эффективные биокатализаторы путем адсорбции целлюлазы. В случае модификации после адсорбции нанесенный наружный слой должен быть достаточно пористым или набухшим, чтобы обеспечить контакт целлюлазы с целлюлозным субстратом. Возможные недостатки метода адсорбции — это относительно низкая эффективность иммобилизации и возможность десорбции фермента в ходе реакции, приводящей к загрязнению конечного продукта.

2.2. Захват / инкапсуляция

Захват — это метод необратимой иммобилизации, при котором целлюлаза удерживается в пористой матрице или полимерной сетке без образования прямых связей с материалом носителя. Этот метод дает возможность двигаться в порах только молекулам субстратов и продуктов, предотвращая вымывание фермента из биокатализатора. Следовательно, подходящий размер пор имеет решающее значение для выбора носителя. Захват может повысить стабильность фермента, уменьшить его вымывание и защитить фермент от неблагоприятных воздействий реакционной среды, предотвращая таким образом дезактивацию целлюлазы. В отличие от захвата, при инкапсуляции фермент отделен от реакционной среды проницаемым и пористым органическим/неорганическим полимером. Создание микросреды путем инкапсуляции защищает молекулы фермента от неблагоприятных условий, которые обычно наблюдаются в лигноцеллюлозных гидролизатах из-за ингибирующих агентов [23, 24, 33].

В исследовании [34] для иммобилизации нескольких ферментов, включая целлюлазу, были использованы Zr-содержащие MOF UiO-66 с различными мезопорами (6.46, 7.55, 10.80 нм). Обнаружено, что с использованием UiO-66 с размером пор 6.46 нм достигалась максимальная адсорбция фермента, которая для целлюлазы составила 203.9 мг/г без ущерба для структуры фермента. Авторы отметили, что стабильность иммобилизованного фермента целлюлаза+UiO-66 была значительно повышена благодаря оптимальному соотношению размера пор материала-носителя и размера молекулы фермента. Стоит

отметить, что молекула целлюлазы имеет эллипсоидальную форму с диаметром 4–6.5 нм и длиной 18–21.5 нм², поэтому поры соответствующих размеров обеспечивают более эффективную иммобилизацию. В работе [35] авторы показали, что добавление мезопор размером 4.6 нм в микропористый UiO-66 позволило прочно удерживать целлюлазу на носителе и повысило стабильность иммобилизованной целлюлазы. В частности, результаты показали, что носитель UiO-66 обеспечил высокую эффективность иммобилизации целлюлазы (265 мг/г), а остаточная ферментативная активность составила около 83% после 6 циклов. Анализ уравнения Михаэлиса–Ментен показал, что константа Михаэлиса (13.355 мг/мл) и максимальная скорость (1.311 мг/(мл·мин)) иммобилизованной целлюлазы были выше, чем у растворимого фермента (14.525 мг/мл и 0.732 мг/(мл·мин) соответственно).

Мезопористые MOF на основе Zn также использовались для инкапсуляции целлюлазы путем одновременного осаждения фермента и предшественников MOF [36]. Это способствовало увеличению содержания иммобилизованного фермента до 350 мг/г и улучшению массопереноса за счет возникновения структурных дефектов при образовании крупных пор MOF. Инкапсулированная целлюлаза сохранила 77% первоначальной активности после четырех циклов.

Самосборка хитозана вокруг целлюлазы путем высаливания из смешанного раствора [30] позволила сформировать наногибрид, который был нанесен на альгинатные шарики. Полученный нанобиокатализатор продемонстрировал повышенную стабильность и эффективность при гидролизе жмыха сахарного тростника. Значение константы Михаэлиса увеличилось на 3% для иммобилизованного наногбрида по сравнению с нативной целлюлазой (11.9 и 11.5 мг/мл соответственно). Это могло произойти из-за того, что альгинатная матрица образует барьер, ограничивающий доступ фермента к субстрату. Значение максимальной скорости для иммобилизованного наногбрида снизилось по сравнению с растворимой целлюлазой (1.1 и 1.2 mM/мин соответственно) из-за градиента концентрации, создаваемого наногбридом внутри альгинатных шариков и приводящего к замедлению скорости гидролиза. Небольшое снижение максимальной скорости для иммобилизованного наногбрида показало, что карбоксиметилцеллюлоза способна диффундировать в альгинатные гранулы благодаря своей водорастворимости.

² Worldwide Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/#Category-analyze>. Дата обращения 17.02.2025 г. / Accessed February 17, 2025.

Наиболее важным преимуществом иммобилизации фермента методом захвата/инкапсуляции является его высокая надежность, хотя такие недостатки, как сопутствующая адсорбция и потеря целостности структуры могут свести к минимуму его привлекательность. Кроме того, как и при физической адсорбции, метод захвата/инкапсуляции целлюлазы эффективен только в том случае, если доступ к ферменту в наноматериале не затруднен.

2.3. Ковалентное присоединение

Ковалентное присоединение часто является более предпочтительным, поскольку обеспечивает повышенную стабильность фермента, однако требует функционализации носителя, если он изначально не содержит функциональные группы [37–38]. Кроме того, для сохранения конформации фермента необходим подходящий связывающий агент. Наиболее часто используемым бифункциональным связывающим агентом является глутаровый диальдегид, который взаимодействует с аминокислотными боковыми остатками аминокислот и NH_2 -группами носителя и не требует присутствия какого-либо катализатора [39]. Несмотря на то, что длина молекулы глутарового диальдегида составляет 0.75 нм [40], этого достаточно для предотвращения неспецифической адсорбции фермента. Были исследованы также связывающие агенты с более длинными молекулами, такие как тетрадекандиовая и докозандиовая дикарбоновые кислоты с приблизительной длиной цепи 1.4 и 2.2 нм, соответственно, но взаимодействие концевых карбоксильных групп с аминокислотными группами носителя (с образованием пептидной связи) требует повышенной температуры или/и присутствия катализатора [41, 42]. В случае носителей, таких как оксид графена, с карбоксильными группами на поверхности, связывающие агенты (дикарбоновые кислоты) вначале активируются карбодиимидом с последующим взаимодействием с *N*-гидроксисукцинимидом, создавая таким образом функциональную группу для присоединения фермента [43].

Целлюлаза, ковалентно иммобилизованная с использованием глутарового диальдегида на аминокислотных магнитных наночастицах (MNCH) Fe_3O_4 , покрытых диоксидом кремния ($\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{SiO}_2$), показала активность, равную 3341 ЕА/г, в гидролизе карбоксиметилцеллюлозы, что составило 83.5% от активности нативного фермента [44]. Константа Михаэлиса и значение максимальной скорости для иммобилизованной и растворимой целлюлазы составили 0.0125 и 0.015 мг/мл, 5.0 и 0.833 ммоль/мин соответственно, что указывает

на незначительное снижение сродства к субстрату и каталитической эффективности иммобилизованной целлюлазы. Исследование стабильности иммобилизованного фермента в пяти повторных циклах показало сохранение 44% первоначальной активности. Иммобилизованную целлюлазу использовали для ферментативного осахаривания предварительно обработанной древесины тополя [44], при этом максимальная конверсия ферментативного осахаривания (при 50°C и pH 4.5) составляла 38.4% в течение 72 ч.

Направленная функционализация носителя может иметь решающее значение для эффективного ковалентного присоединения фермента. В работе [45] авторы приготовили оксид графена в качестве носителя для иммобилизации целлюлазы путем ковалентного связывания. Оксид графена активировали путем этерификации эфиром этилсульфонанилина *p*- β -серной кислоты в качестве гидрофобного спейсера. Полученный комплекс был модифицирован путем диазотирования кислоты, а затем на нем была ковалентно иммобилизована целлюлаза. По сравнению с растворимой целлюлазой термическая и эксплуатационная стабильность иммобилизованной целлюлазы была значительно улучшена. При 50°C период полуинактивации иммобилизованной целлюлазы (533 мин) был в шесть раз выше, чем у растворимой целлюлазы (89 мин). Кроме того, сродство между иммобилизованной целлюлазой и субстратом (2.19 г/л) было более благоприятным, чем у растворимой целлюлазы (3.84 г/л). Это позволяет предположить, что иммобилизованная целлюлаза обладает более высокой каталитической эффективностью.

Следует отметить, что надежности ковалентного присоединения целлюлазы препятствует сложная процедура функционализации, что существенно снижает привлекательность данного метода.

Ковалентно иммобилизованные и каталитически активные ферменты на частицах микрогелей могут быть получены с помощью реакционноспособных групп остатков аминокислот (например, аминокислот из остатков лизина, тирозина, серина, цистеина и карбоновой группы из аспарагиновой или глутаминовой кислот) и реакционноспособных групп в микрогелях (например, эпоксида, сложных эфиров *N*-гидроксисукцинимидов и малеимидов). Основной проблемой иммобилизации является наличие идентичных реакционноспособных групп в составе целевого фермента (например, несколько доступных растворителю остатков лизина на поверхности целлюлазы). В этом случае происходит многоточечная иммобилизация, которая может снизить гибкость структуры фермента и, возможно,

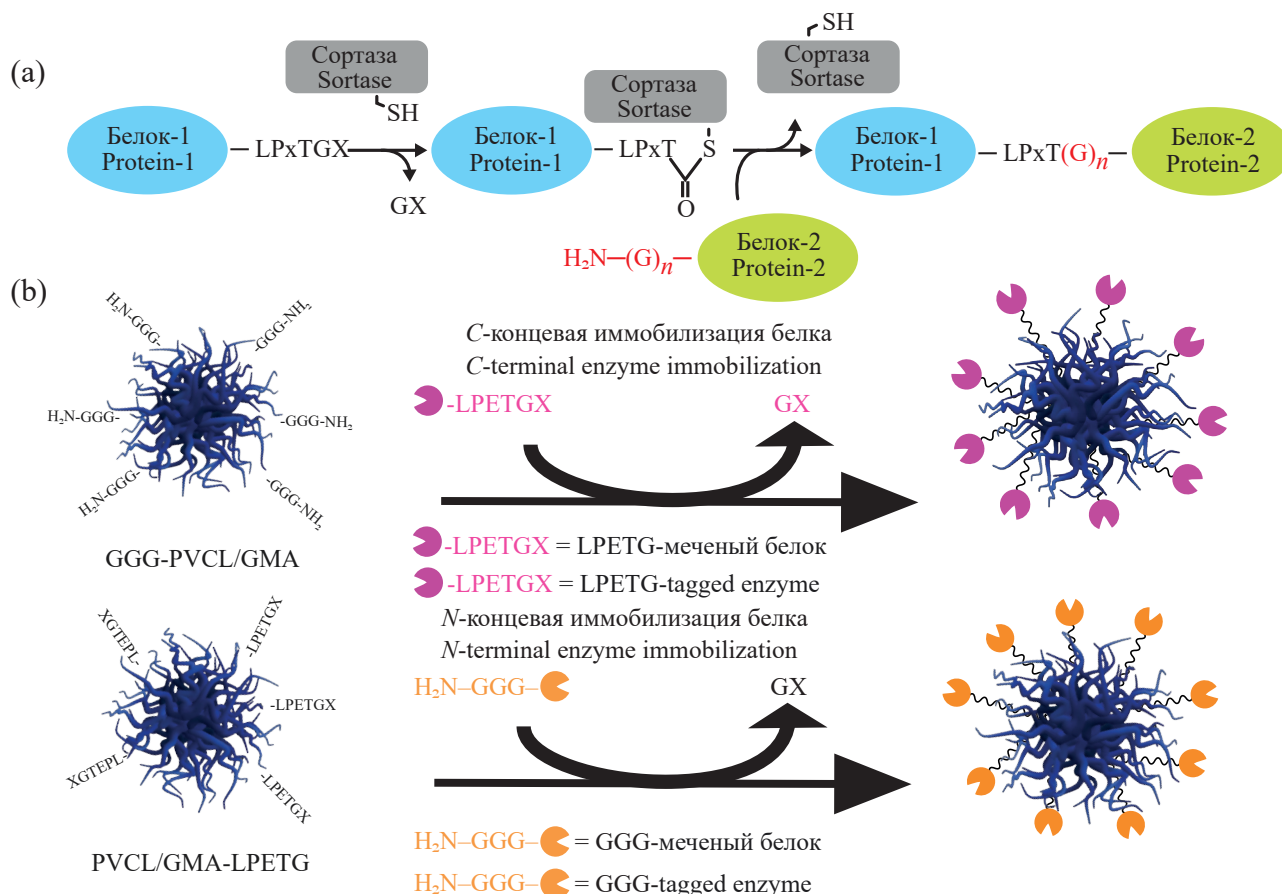


Рис. 2. (а) Катализируемая сортазой конъюгация белок-белок с использованием LPETG-меченых и GGG-меченых белков в качестве субстратов. (б) Показаны оба варианта конъюгации (*N*- и *C*-концевая) для подтверждения эффективности носителя на основе микрогеля для иммобилизации ферментов: *C*-концевая иммобилизация (сверху); *N*-концевая иммобилизация (снизу) [46]

Fig. 2. (a) Sortase-catalyzed protein-protein conjugation using LPETG-labeled and GGG-labeled proteins as substrates. (b) Both conjugation variants (*N*- and *C*-terminal) are shown to confirm the effectiveness of a microgel-based carrier for enzyme immobilization: *C*-terminal immobilization (top); *N*-terminal immobilization (bottom) [46]

его каталитическую активность. Авторы [46] предлагают стратегию ориентированной односточной сайт-специфичной ковалентной иммобилизации фермента в микрогеле. Легирование с помощью сортазы (транспептидазы) является, по мнению авторов, высокоселективным инструментом для конъюгации пептидов или белков [47]. Сортаза А из стафилококка золотистого *Staphylococcus aureus* распознает аминокислотную последовательность LPETG в белке и образует реакционноспособный тиоэфирный промежуточный продукт «сортаза А – белок» (рис. 2а), который впоследствии расщепляется нуклеофилом (например, аминогруппой *N*-концевой олигоглициновой метки в другом белке). В результате образуется стабильная амидная связь и высвобождается сортаза А [46]. В рамках данной работы авторы усовершенствовали принцип синтеза пептидов в каталитических микрогелях и, таким образом, создали универсальную платформу для иммобилизации

ферментов на микрогелях из поли(*N*-винилкапролактама)/глицидилметакрилата (poly(*N*-vinylcaprolactam)/glycidyl methacrylate, PVCL/GMA).

Для обеспечения возможности конъюгации ферментов с использованием обоих вариантов (*N*- или *C*-концевая иммобилизация) используются два подхода к иммобилизации. *C*-концевые ферменты, меченные LPETG, иммобилизуются путем связывания с $\text{H}_2\text{N-GGG-PVCL/GMA}$, в то время как *N*-концевые ферменты, меченные GGG, легируют микрогелями PVCL/GMA-LPETG-COOH (рис. 2б). Для тестирования ковалентной иммобилизации были выбраны биотехнологически значимые ферменты, в числе которых была и целлюлаза А2М2 (*N*-концевой фермент).

Из представленных примеров видно, что возможным недостатком ковалентного присоединения целлюлазы является сложность химической модификации носителя и/или фермента.

2.4. Поперечная «сшивка»

Поперечная «сшивка» ферментов в агрегаты (CLEA) дает возможность осуществлять их иммобилизацию без использования носителей. Такое сшивание может быть достигнуто взаимодействием с глутаровым альдегидом [48]. Было обнаружено, что активность сшитых ферментных агрегатов зависит от типа сшивающего агента, который может влиять на плотность CLEA [49].

Если сшитые агрегаты целлюлаз, полученные путем осаждения, объединяются с МНЧ, то появляется дополнительное преимущество, заключающееся в простоте манипулирования магнитным нанобиокатализатором [50].

Оригинальный способ получения мультиферментных гибридных наноагрегатов (ECG-NFs) был реализован Ханом и соавторами [51] путем поперечной «сшивки» трех ферментов целлюлазного комплекса — целлобиогидролазы (cellobiohydrolase, CBH), эндоглюканазы (endoglucanase, EG) и β -глюкозидазы (β -glucosidase, BG). Для «сшивки» использовались рекомбинантные ферменты EG-Linker-ELP (elastin-like polypeptide)-His₆ (EGLEH), CBH-Linker-ELP-His₆ (CBHLEH) и Glu-Linker-ELP-His₆ (GLEH).

Процессы поперечной «сшивки» ферментов и катализируемой ими реакции гидролиза целлюлозы до глюкозы показаны на рис. 3. Предполагается, что образование гибридных наноагрегатов в основном состоит из двух основных этапов [52]. На первом этапе («зарождения») GLEH, CBHLEH и EGLEH связываются с Cu²⁺, образуя комплексное соединение, и начинают появляться кристаллы фосфата меди. На втором этапе («роста») аминокислоты GLEH, CBHLEH и EGLEH объединяются с Cu²⁺ посредством координационной реакции ионов белка и Cu²⁺ с образованием нанокристаллов, которые могут обеспечивать центры связывания для GLEH, CBHLEH и EGLEH в процессе роста. Непрерывный рост НЧ приводит к получению полноценных наноагрегатов. В этом случае пространственная структура ферментных агрегатов является ключом к успешному катализу. Созданная система мультиферментных гибридных наноагрегатов использовалась для однократного каскадного превращения целлюлозы в глюкозу. По сравнению с нативной мультиферментной системой наноагрегаты ECG-NFs показали лучшую физическую стабильность, термостабильность и стабильность при хранении. Более того,

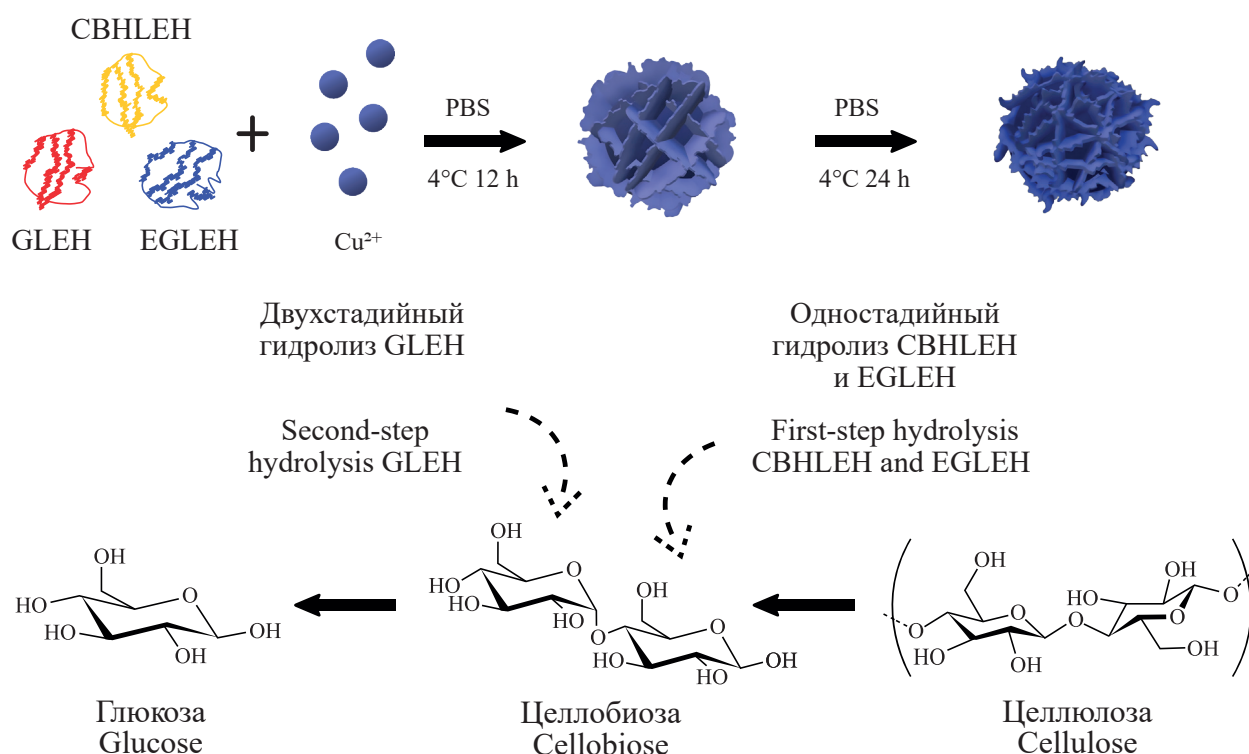


Рис. 3. Схема механизма образования ECG-NFs и функционального механизма действия целлюлазы. PBS — полибутилен сукцинат [51]

Fig. 3. Diagram of the ECG-NF formation and the functional cellulase action mechanisms. PBS is polybutylene succinate [51]

ферментативная активность ECG-NFs сохранилась на уровне 61.59% после восьми повторных реакционных циклов. Значения кинетических констант иммобилизованного и нативного ферментов (константа Михаэлиса 9.33 и 9.54 г/л, максимальная скорость 0.0056 и 0.0048 г/(л·мин) соответственно) также указывают на то, что родство и активность целлюлазы возросли после совместной иммобилизации. Общая ферментативная активность ECG-NFs увеличилась в 1.12 раза по сравнению с нативным ферментом в процессе превращения микрокристаллической целлюлозы в глюкозу. Таким образом, ожидается, что эффект совместной иммобилизации нескольких ферментов будет успешно использован и в условиях промышленного производства.

Возможный недостаток этого метода иммобилизации заключается в снижении активности из-за ограничения доступа к активному центру в том случае, если поперечно сшитые агрегаты окажутся слишком плотными.

3. ТИПЫ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Основными наноструктурированными носителями, используемыми для иммобилизации целлюлазы, являются нанопористые материалы (MOF, биоугли, пористый диоксид кремния), наногидрогели, полимерные НЧ и МНЧ [10]. Большая часть этих носителей в течение многих лет использовалась для иммобилизации ферментов, но за последние пять лет произошли существенные технологические изменения в производстве или модификации этих наноматериалов для повышения эффективности процессов иммобилизации и улучшения характеристик нанобиокатализаторов, создаваемых на их основе.

3.1. Наноразмерные пористые материалы

В работе [53] авторы предложили совместную иммобилизацию β -глюкозидазы и целлюлазы путем адсорбции на складчатых мезопористых НЧ кремнезема с иерархической структурой открытых пор, имеющих меньшее (wrinkled silica nanoparticles, WSN) и большее (WSN synthesized by using pentanol, WSN-p) расстояние между складками. Полученные результаты показали, что лучшим биокатализатором является тот, который получают путем одновременной иммобилизации β -глюкозидазы и целлюлазы на WSN-p расстоянии. В этом случае доля адсорбированных ферментов достигает 20%, что соответствует их содержанию на уровне 100 мг/г носителя. В ходе проведенного тестирования в реакции гидролиза

целлюлозы, выделенной из листьев эриobotрии японской (*Eriobotrya japonica*), биокатализатор продемонстрировал конверсию 82% и активность 72 мкмоль/(мин·г). При этом биокатализатор сохранил 83% первоначальной активности после 9 циклов повторного использования. Кроме того, он обладал лучшей, чем смесь растворимых ферментов, стабильностью в широком диапазоне температур, сохраняя 72% от значения максимальной конверсии при температуре до 90°C.

Сравнение мезопористых кремнеземов (mesoporous silica, MS) со средними размерами пор 17.6 и 3.8 нм (MS-17.6 и MS-3.8 соответственно) показало, что более крупные поры, размеры которых сходны с размером длинной оси молекулы целлюлазы, обеспечивают более высокую эффективность иммобилизации: величина адсорбции для MS-17.6 составила 410 мг/г, а для MS-3.8 — 315 мг/г [54]. С другой стороны, поры носителя диаметром 3.8 нм, близкие к размеру короткой оси молекулы целлюлазы, обеспечивают более высокую активность (до 67% от активности нативного фермента при 60°C) по сравнению с целлюлазой на MS-17.6, которая после иммобилизации сохранила только 26.6% от активности нативного фермента при тех же условиях. Авторы высказали предположение, что в случае, когда средний размер пор носителя соответствует коротким осям молекул фермента, иммобилизованная целлюлаза сохраняет активные участки и демонстрирует наивысшую активность. А в случае носителя MS-17.6 молекулы фермента проникают внутрь пор, создавая плотную и упорядоченную структуру, которая, вероятно, препятствует конформационной гибкости целлюлазы, необходимой в процессе взаимодействия между целлюлазой и субстратом.

3.2. Наногели

Зарей с соавт. [55] предложил простой двухэтапный подход к изготовлению проводящего наногидрогеля, состоящего из поли- ϵ -капролактона и катионной макромолекулы оксида фосфина. Для этого методом электропрядения синтезируется катионный наногидрогель в виде волокон диаметром около 469 нм с последующей *in situ* полимеризацией полианилиновых наностержней. Полученный наногидрогель использовали для иммобилизации целлюлазы, активность которой исследовалась в реакции гидролиза карбоксиметилцеллюлозы. Высокая эффективность иммобилизации (96%) наблюдалась после оптимизации таких параметров, как pH, температура, продолжительность обработки и концентрация фермента в смеси. Иммобилизованный фермент сохранил почти 90%

своей первоначальной активности после четырех недель хранения и 73% от первоначальной активности после 9 циклов повторного использования. Кинетические параметры (константа Михаэлиса и максимальная скорость) показали значения 2.9 г/л и 7.6 г/(л·мин) для иммобилизованной целлюлазы и 1.5 г/л и 6.8 г/(л·мин) для нативного фермента соответственно. Увеличение значения константы Михаэлиса после иммобилизации указывает на то, что реакция достигает максимальной каталитической эффективности при несколько более высоких концентрациях субстрата. Это может быть связано с ограничением доступа субстрата к активному центру фермента и/или изменением конформации фермента и снижением возможности образования фермент-субстратного комплекса. Увеличение значения максимальной скорости для иммобилизованной целлюлазы по сравнению с нативным ферментом может быть обусловлено повышенной стабильностью фермента после иммобилизации.

В исследовании [56] созданы эффективные наногидрогель-ферментные системы с превосходной стабильностью и активностью для практического использования целлюлазы в гидролизе лигноцеллюлозной биомассы, а также представлена стратегия синтеза новых трехмерных гидрогелей из карбоксиметилцеллюлозных сополимеров 2-акриламида-2-метилпропансульфоната и акриламида. Нанолиты оксида графена использовались в качестве наполнителя и сшивающего вещества, создающего водородные связи между полимерными цепями для получения трехмерных сетей. Было изучено влияние содержания оксида графена на эффективность синтезированных структур при конъюгации с модельным ферментом — целлюлазой. Иммобилизация целлюлазы в гидрогелях, армированных оксидом графена, привела к заметному сохранению (на уровне 60%) его максимальной активности при температуре 90°C, а также к значительному повышению его удельной активности и стабильности при хранении. По сравнению с растворимой целлюлазой, иммобилизованный фермент, содержащий гидрогели с оксидом графена, показал заметное (на 154.8%) увеличение конверсии жома сахарной свеклы, обработанного щелочью, в то время как исходный гидрогель с целлюлазой показал увеличение только на 66.7% при тех же условиях.

В работе [22] был получен эффективный иммобилизованный бифункциональный ферментативный комплекс целлюлаза/ксилаза на гидрогелевом носителе с повышенной стабильностью и активностью, который в дальнейшем был использован для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы. Исходный гидрогель (SA-CH) синтезирован методом радикальной полимеризации растворов хитозана (chitosan, CH)

и альгината натрия (sodium alginate, SA) в присутствии сшивающего агента и акриловых мономеров. Гидрогелевый наноноситель (SA-CH/NCs) синтезировали добавлением наноцеллюлозы (nanocellulose, NCs) к SA-CH. Активность и стабильность нативных целлюлазы и ксиланазы и иммобилизованных биферментных комплексов (PersiCelXyn1+SA-CH и PersiCelXyn1+SA-CH/NCs) была исследована в гидролизе свекловичного жома с получением гидролизата, содержащего сбраживаемый сахар и являющегося субстратом для производства молочной кислоты. Установлено, что значение константы Михаэлиса для нативных ферментов и комплексов PersiCelXyn1+SA-CH и PersiCelXyn1+SA-CH/NCs составляет 2.84, 0.89 и 0.58 мг/мл соответственно. Различные значения продемонстрировали различное сродство ферментов к субстрату. Во время процесса иммобилизации конформация фермента может измениться, а различные диффузионные эффекты и пространственные препятствия могут изменить микроокружение фермента, что влияет на его сродство к субстрату после иммобилизации. Снижение константы Михаэлиса для иммобилизованных ферментов по сравнению с их растворимой формой свидетельствует об увеличении сродства к субстрату после иммобилизации. Такое снижение было более выраженным в случае гидрогеля PersiCelXyn1+SA-CH/NCs по сравнению с PersiCelXyn1+SA-CH. Возможно, присутствие наноцеллюлозы в матрице этого гидрогеля вызвало более интенсивное взаимодействие субстрата с ферментом, что в свою очередь привело к увеличению сродства фермента к его субстрату. Значения максимальной скорости для PersiCelXyn1+SA-CH и PersiCelXyn1+SA-CH/NCs составили 74.19 и 103.79 мкмоль/(мг·мин) соответственно, в то время как для нативной формы это значение находилось на уровне 58.70 мкмоль/(мг·мин). Поскольку параметр максимальной скорости представляет собой скорость ферментативной реакции при насыщающих концентрациях субстрата, его более высокие значения для иммобилизованных ферментов указывают на то, что при насыщении субстратом они достигают более высокой скорости, чем растворимый фермент. Таким образом, добавление NCs к гидрогелевой сетке позволило получить модифицированный гибридный наноноситель для иммобилизации биферментных комплексов с повышенной удельной активностью по сравнению с исходным гидрогелем и, в конечном итоге, повысить каталитическую активность иммобилизованного фермента.

3.3. Полимерные частицы

Полимерные НЧ могут быть полезны для поверхностного ковалентного присоединения ферментов

при наличии в полимерной структуре необходимых функциональных групп. В работе [57] полимерные НЧ были получены из сшитого сополимера стирола и малеинового ангидрида методом осаждающей полимеризации без стабилизатора с последующим ковалентным присоединением целлюлазы через ангидридные группы.

Самоорганизующиеся мицеллы полимера поли(стирол)-*b*-поли(стирол-*alt*-малеиновый ангидрид), модифицированного нитрилотриуксусной кислотой (nitrilotriacetic acid, NTA), дальнейшая модификация которых ионами Ni^{2+} дала возможность присоединения бактериальной His₆-целлюлазы, были успешно использованы для получения НЧ типа ядро-оболочка с молекулами целлюлазы во внешнем слое (рис. 4) [58].

Авторами [58] было показано, что целлюлаза, иммобилизованная на полимерных НЧ, после инкубации в течение 24 ч продуцировала примерно в два раза больше редуцирующего сахара (50 мг/л),

чем растворимый фермент (30 мг/л). Была также протестирована стабильность иммобилизованной целлюлазы и установлено, что после двухнедельного хранения при 48°C или хранения в течение 48 ч при комнатной температуре активность иммобилизованной целлюлазы не претерпела существенных изменений. Активность и стабильность иммобилизованного фермента авторы объясняют специфической ориентацией белков на поверхности НЧ и в активных центрах, а также более эффективным воздействием иммобилизованного фермента на субстрат.

3.4. Магнитные наноструктурированные носители

Магниточувствительные наноструктурированные носители обычно основаны на МНЧ. Использование МНЧ для разработки нанобиокатализаторов в последние годы стремительно активизировалось

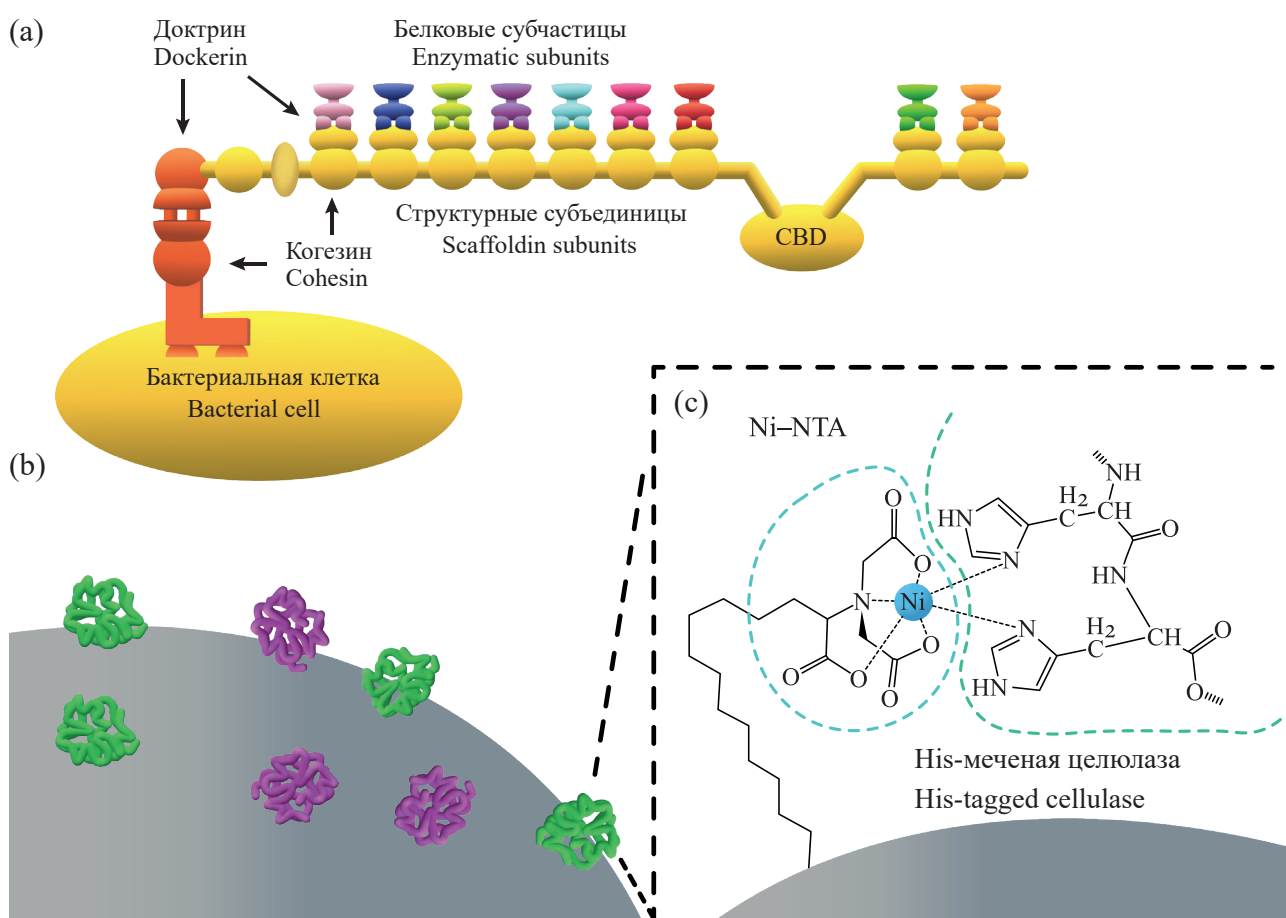


Рис. 4. (а) Структурная организация целлюлосомы в клетках бактерии *Clostridium thermocellum*, (б) функционализированные Ni-NTA мицеллы для иммобилизации целлюлазы и (с) взаимодействие Ni-NTA с молекулами целлюлазы, меченными His₆ [58]

Fig. 4. (a) Structural organization of the cellulosome in *Clostridium thermocellum* cells, (b) functionalized Ni-NTA micelles for cellulase immobilization, and (c) the interaction of Ni-NTA with cellulase molecules tagged with His₆ [58]

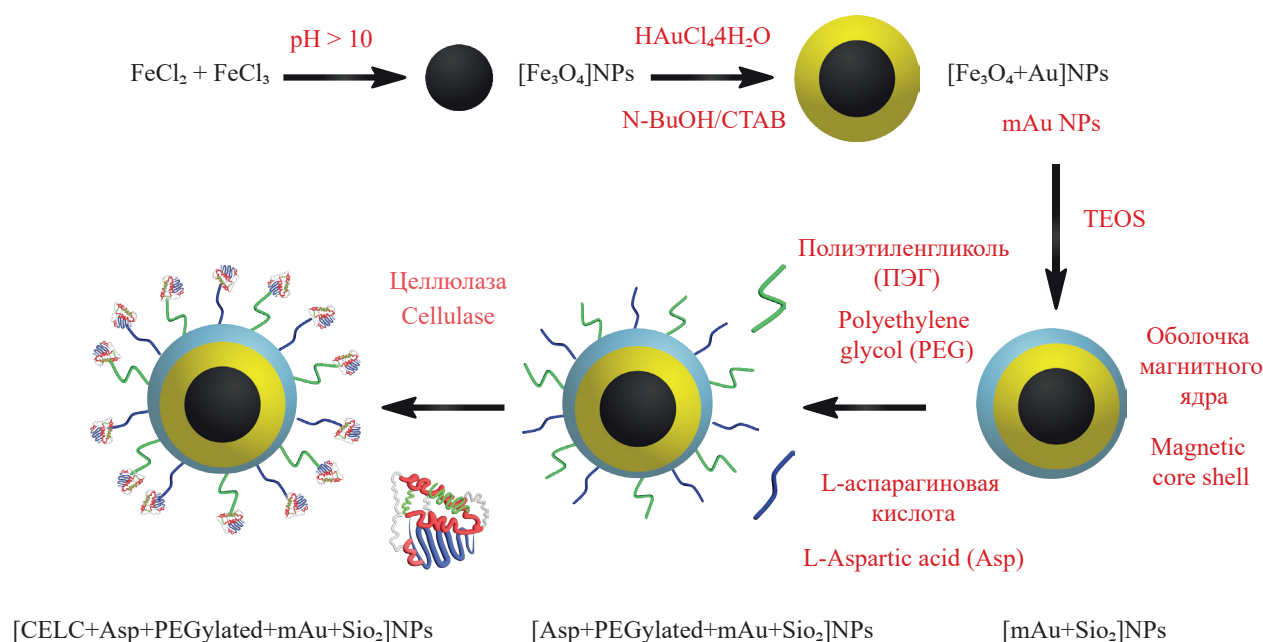


Рис. 5. Синтез МНЧ золота типа ядро-оболочка в качестве нового наноносителя и иммобилизации на ней целлюлазы с получением биокатализаторов [77]

Fig. 5. Synthesis of core-shell gold magnetic nanoparticles (MNP) as a new nanocarrier and the immobilization of cellulase on it to obtain biocatalysts [77]

благодаря простоте магнитного отделения, которое позволяет многократно использовать нанобиокатализаторы и делает процессы с их участием более надежными, а также экономически и экологически выгодными. МНЧ (чаще всего, НЧ оксида железа) обычно предварительно функционализируют для обеспечения возможности присоединения фермента. С этой целью МНЧ покрывают либо диоксидом кремния с последующим присоединением функциональных аминогрупп [44, 59–68], либо полимерами, содержащими реакционноспособные группы, (например, хитозаном или другими функциональными полимерами) [69–75]. Добавление ионов металлов (например, меди) к аминифункционизированным МНЧ позволяет улучшить иммобилизацию целлюлазы благодаря ее сродству к металлу [76]. При оптимальных рабочих условиях (соотношение Cu/МНЧ = 1, соотношение целлюлаза/МНЧ = 0.11, pH 6) относительная активность и содержание иммобилизованного фермента на МНЧ составили 91% и 164 мг/г соответственно. Показано [76], что иммобилизованная целлюлаза, протестированная в реакции гидролиза карбоксиметилцеллюлозы, взятой в концентрации 1%, демонстрирует большую стабильность, чем растворимый фермент. Кроме того, иммобилизованный фермент сохранил 73% от своей первоначальной активности после пяти циклов использования.

Для лучшей защиты МНЧ из оксида железа Пуракбар и соавт. [77] сформировали вокруг МНЧ сначала золотую оболочку, а затем кремнеземную оболочку с последующей функционализацией при помощи полиэтиленгликоля и L-аспарагиновой кислоты для ковалентного присоединения целлюлазы (рис. 5). Ковалентное связывание фермента было подтверждено с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Эффективность связывания составила 84%, что было определено методом Брэдфорда. В процессе гидролиза фильтровальной бумаги иммобилизованная целлюлаза показала 88% от активности нативного фермента и сохранила 73% своей первоначальной каталитической активности через 9 ч (при этом ее активность составляла 0.78 ммоль/мл) [77].

Другой способ синтеза магнитного нанобиокатализатора [78, 79] предусматривает, что МНЧ внедряются в пористые или полимерные материалы. Так, например, в работе [79] в качестве пористого материала использовали мезопористый оксид кремния SBA-15 с диаметром пор 7–9 нм, внутри которых были сформированы МНЧ Fe₃O₄. Иммобилизация целлюлазы проводилась методом адсорбции при pH 4.8, температуре 4°C в течение 24 ч. В гидролизе целлюлозы в присутствии иммобилизованной целлюлазы был достигнут выход глюкозы на уровне 86.2%.

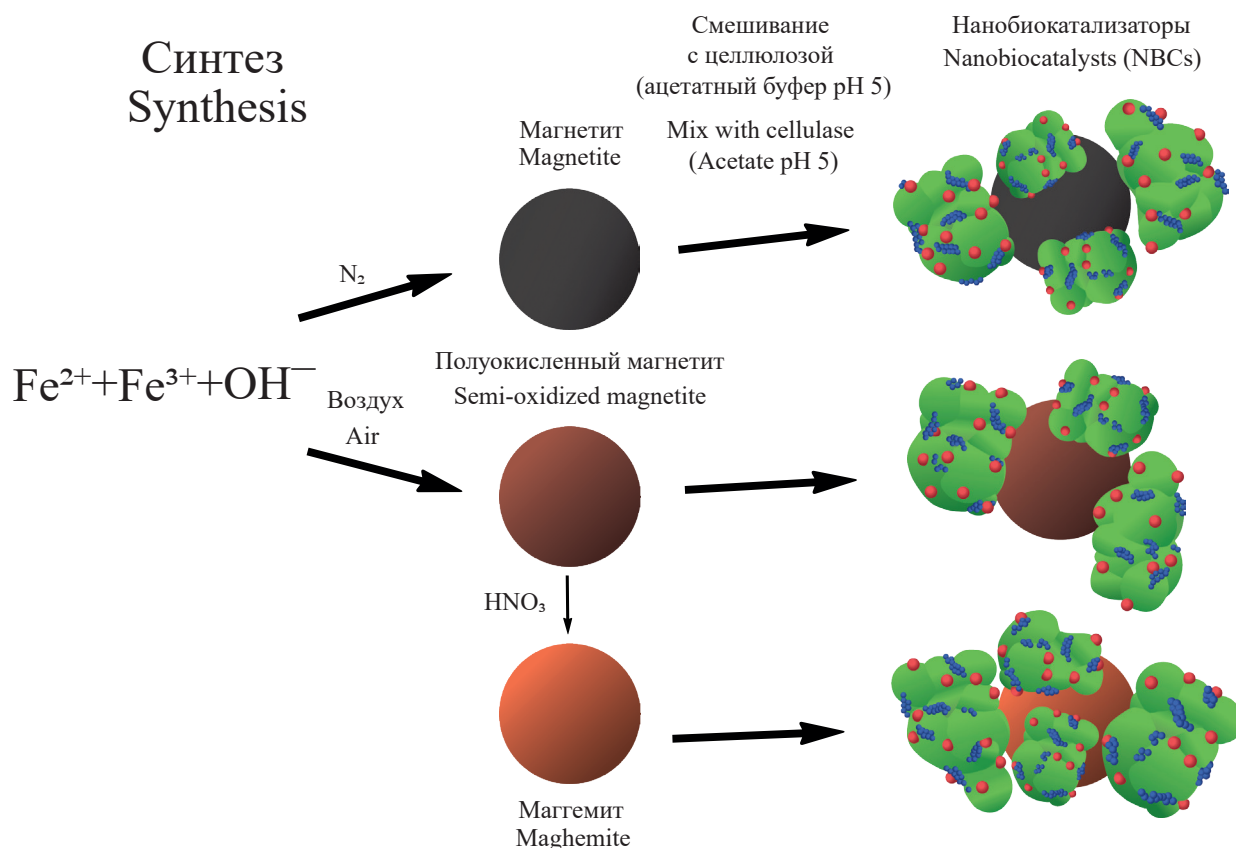


Рис. 6. Синтез МНЧ для иммобилизации целлюлазы [80]

Fig. 6. MNP synthesis for cellulase immobilization [80]

НЧ магнетита без носителя также используют для адсорбции целлюлазы, как это представлено на рис. 6 [80]. Для иммобилизации целлюлазы были синтезированы три типа НЧ оксида железа: синтезированный в атмосфере азота магнетит (MNP- N_2), синтезированный в атмосфере воздуха полуокисленный магнетит (MNP-Air) и окисленные азотной кислотой НЧ магнетита (MNP-Ox).

Каталитическая активность иммобилизованной целлюлазы была исследована в гидролизе карбоксиметилцеллюлозы и фильтровальной бумаги. Во всех случаях полученный нанобиокатализатор с магнетитом в качестве носителя продемонстрировал лучшую абсолютную активность (4.28 и 0.82 ед/(г·ч) для катализатора на магнетите и маггемите соответственно) и относительную ферментативную активность при более низких значениях pH, а также при более высоких и более низких температурах. Это указывает на улучшение термической и механической стабильности нанобиокатализаторов на основе магнетита, что является желательным эффектом при иммобилизации ферментов.

Другим важным эффектом иммобилизации целлюлазы является увеличение долговременной каталитической стабильности. Представленные нанобиокатализаторы демонстрируют долгосрочную стабильность в течение 42 дней без потери каталитической активности, в то время как активность нативного фермента за это время падает до 40%. Однако наиболее важным положительным эффектом является возможность повторного использования нанобиокатализаторов с помощью магнитного отделения. Авторы [80] добились извлечения магнитных нанобиокатализаторов на 95% после использования в шести последовательных реакционных циклах (рис. 7).

Аналогичные НЧ магнетита синтезированы также в работе [81]. Для иммобилизации целлюлазы методом ковалентного связывания авторы использовали глутаровый альдегид. При гидролизе целлюлозного субстрата (порошка из жмыха сахарного тростника) в течение 24 ч была достигнута конверсия целлюлозы на уровне 93% для нативного фермента и 89% — для целлюлазы, иммобилизованной на МНЧ.

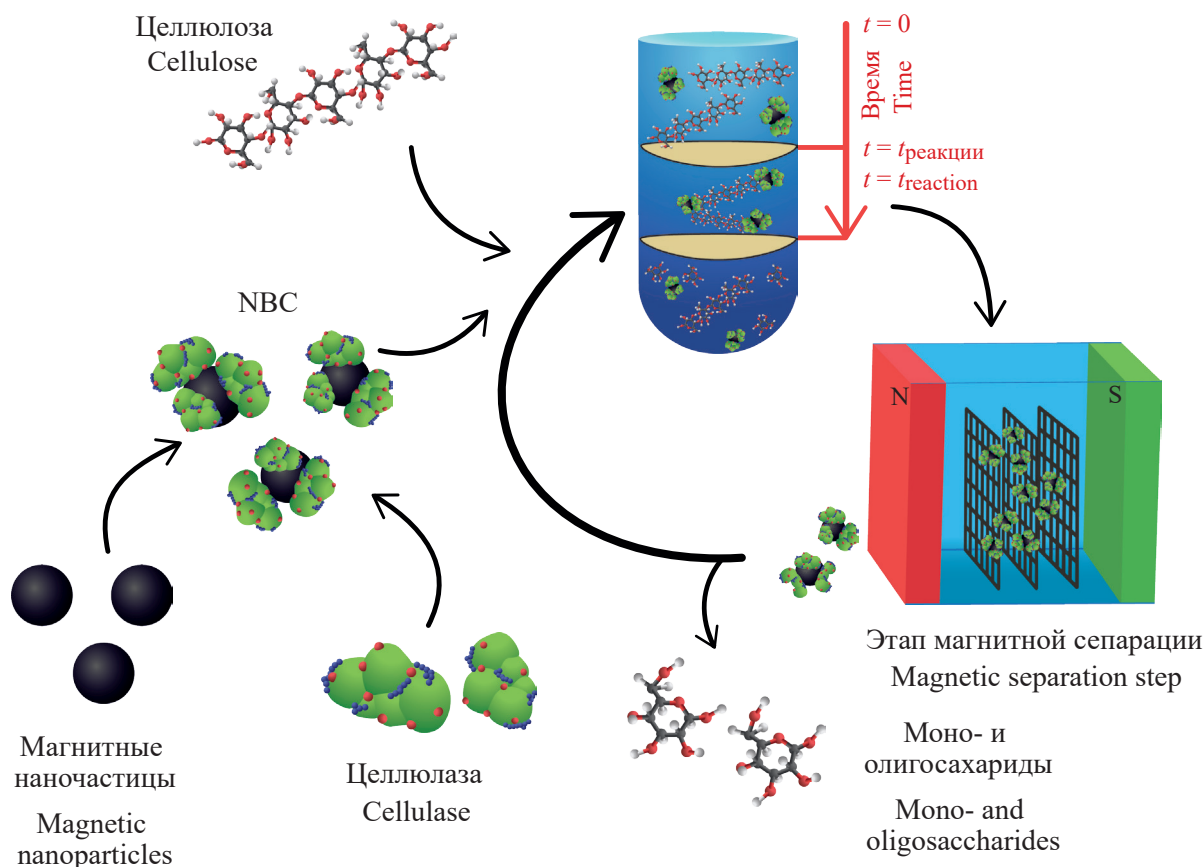


Рис. 7. Конверсия целлюлозы и магнитное отделение нанобиокатализаторов (NBC) [80]

Fig. 7. Cellulose conversion and magnetic separation of nanobiocatalysts (NBC) [80]

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нанобиокатализаторы на основе целлюлазы, иммобилизованной на наноструктурированных носителях, используются для каталитического гидролиза отходов биомассы, а также в пищевой промышленности и для защиты окружающей среды. Анализ последних тенденций, представленных в данном обзоре, показывает, что за последние пять лет в методах иммобилизации и составах носителей произошли положительные изменения.

Один из наиболее ярких примеров предполагает ориентированную одноточечную сайт-специфичную иммобилизацию фермента в микрогеле с помощью катализируемой сортазой белковой конъюгации, которая делает иммобилизацию более целенаправленной и улучшает последующее взаимодействие фермента с целлюлозой.

Другой пример демонстрирует, что необычная структура носителя (складчатые мезопористые наночастицы кремнезема) позволяет получать эффективные и стабильные нанобиокатализаторы

с помощью простой адсорбции целлюлазы благодаря уникальному характеру и морфологии носителя. Адсорбированная таким образом целлюлаза оказалась весьма стабильной и активной за счет предварительной модификации носителя макромолекулами, изменяющими заряд или баланс гидрофобности и гидрофильности.

Не содержащие носителя мультиферментные гибридные наноагрегаты позволили достичь аналогичной цели благодаря образованию комбинированных ферментативных структур с высоким сродством к целлюлозной биомассе.

Использование магниторазделяемых носителей повышает надежность биокатализатора и облегчает биокаталитические процессы, обеспечивая возможность извлечения магнитного нанобиокатализатора.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-79-10042, <https://rscf.ru/project/24-79-10042/>

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-79-10042, <https://rscf.ru/project/24-79-10042/>).

Вклад авторов

А.М. Сулман и В.П. Молчанов — подготовка оригинального текста.

Д.В. Балакшина и О.В. Гребенникова — анализ литературы и подготовка графического материала.

В.Г. Матвеева — разработка концепции, рецензирование и редактирование.

Все авторы ознакомились с опубликованной версией рукописи и согласились с ней.

Authors' contribution

A.M. Sulman and V.P. Molchanov — writing (original draft preparation).

D.V. Balakshina and O.V. Grebennikova — literature analysis and preparation of graphic material.

V.G. Matveeva — conceptualization, review, and editing.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Houfani A.A., Anders N., Spiess A.C., Baldrian P., Benallaoua S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars – a review. *Biomass Bioenergy*. 2020;134(20):105481. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>
2. Arumugam A., Malolan V.V., Ponnusami V. Contemporary Pretreatment Strategies for Bioethanol Production from Corn cobs. *Waste Biomass Valor.* 2021;12(4):577–612. <https://doi.org/10.1016/10.1007/s12649-020-00983-w>
3. Behera S.S., Ray R.C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;86:656–669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
4. Cirujano F.G., Dhakshinamoorthy A. Challenges and opportunities for the encapsulation of enzymes over porous solids for Biodiesel production and Cellulose valorization into Glucose. *ChemCatChem*. 2021;13(22):4679–4693. <http://doi.org/10.1002/cctc.202100943>
5. Tabah B., Pulidindi I.N., Chitturi V.R., Varvak A., Foran E., Gedanken A. Solar-energy-driven conversion of biomass to bioethanol: A sustainable approach. *J. Mater. Chem. A*. 2017;5(30):15486–15506. <http://doi.org/10.1039/C7TA03083E>
6. Zanusso E., Gomes D.G., Ruiz H.A., Teixeira J.A., Domingues L. Enzyme immobilization as a strategy towards efficient and sustainable lignocellulosic biomass conversion into chemicals and biofuels: current status and perspectives. *Sustainable Energy Fuels*. 2021;5(17):4233–4247. <http://doi.org/10.1039/D1SE00747E>
7. Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M. Design of biocatalysts for efficient catalytic processes. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2019;26:1–8. <http://doi.org/10.1016/j.coche.2019.06.005>
8. Ramirez N., Serey M., Illanes A., Piumetti M., Ottone C. Immobilization strategies of photolyases: Challenges and perspectives for DNA repairing application. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2021;215:112113. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112113>
9. Zhang S., Bilal M., Zdart J., Cui J., Kumar A., Franco M., Ferreira L.F.R., Iqbal H.M.N. Biopolymers and nanostructured materials to develop pectinases-based immobilized nanobiocatalytic systems for biotechnological applications. *Food Res. Int.* 2021;140:109979. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109979>
10. Gan J., Iqbal H.M.N., Show P.L., et al. Upgrading recalcitrant lignocellulosic biomass hydrolysis by immobilized cellulolytic enzyme-based nanobiocatalytic systems: a review. *Biomass Conv. Bioref.* 2024;14(1):4485–4509. <http://doi.org/10.1007/s13399-022-02642-7>
11. Holyavka M.G., Goncharova S.S., Redko Y.A., et al. Novel biocatalysts based on enzymes in complexes with nano- and micromaterials. *Biophys. Rev.* 2023;15(1):1127–1158. <http://doi.org/10.1007/s12551-023-01146-6>
12. Ahmed Z., Arshad A., Bilal M., et al. Nano-biocatalytic Systems for Cellulose de-polymerization: A Drive from Design to Applications. *Top. Catal.* 2023;66:592–605. <http://doi.org/10.1007/s11244-023-01785-9>
13. Zdart J., Kołodziejczak-Radzimska A., Bachosz K., Rybarczyk A., Bilal M., Iqbal H.M.N., Buszewski B., Jesionowski T. Nanostructured supports for multienzyme co-immobilization for biotechnological applications: Achievements, challenges and prospects. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2023;315:102889. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102889>
14. Cipolatti E.P., Valerio A., Henriques R.O., Moritz D.E., Ninow J.L., Freire D.M.G., Manoel E.A., Fernandez-Lafuente R., de Oliveira D. Nanomaterials for biocatalyst immobilization – State of the art and future trends. *RSC Adv.* 2016;6:104675–104692. <https://doi.org/10.1039/C6RA22047A>
15. Cavalcante F.T.T., de A. Falcão I.R., da S. Souza J.E., Rocha T.G., de Sousa I.G., Cavalcante A.L.G., de Oliveira A.L.B., de Sousa M.C.M., dos Santos J.C.S. Designing of Nanomaterials-Based Enzymatic Biosensors: Synthesis, Properties, and Applications. *Electrochem.* 2021;2(1):149–184. <http://doi.org/10.3390/electrochem2010012>
16. Sudhir Singh A.P., Singhanian R.R., Larroche C., Li Z. (Eds.). *Biomass, Biofuels, Biochemicals; Advances in Enzyme Catalysis and Technologies*. 1st ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2020. 472 p. ISBN 978-044-464114-4
17. Paul M., Mohapatra S., Kumar Das Mohapatra P., Thatoi H. Microbial cellulases – An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresour. Technol.* 2021;340:125710. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710>
18. Zhou Z., Ju X., Chen J., Wang R., Zhong Y., Li L. Charge-oriented strategies of tunable substrate affinity based on cellulase and biomass for improving in situ saccharification: a review. *Bioresour. Technol.* 2020;319:124159. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124159>

19. Shanmugam S., Krishnaswamy S., Chandrababu R., Veerabagu U., Pugazhendhi A., Mathimani T. Optimal immobilization of *Trichoderma asperellum* laccase on polymer coated Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles for enhanced biohydrogen production from delignified lignocellulosic biomass. *Fuel*. 2020;273:117777. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117777>
20. Giannakopoulou A., Patila M., Spyrou K., Chalmes N., Zarafeta D., Skretas G., Gournis D., Stamatis H. Development of a four-enzyme magnetic nanobiocatalyst for multi-step cascade reactions. *Catalysts*. 2019;9(12):995. <https://doi.org/10.3390/catal9120995>
21. Marino M.A., Fulaz S., Tasic L. Magnetic Nanomaterials as Biocatalyst Carriers for Biomass Processing: Immobilization Strategies, Reusability, and Applications. *Magnetochemistry*. 2021;7(10):133. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry7100133>
22. Hedaiaania S., Ariaeenejad S., Kumleh H.H., Mirzaei H.H., Shakeri F., Motamedi E. Lactic acid production enhancement using metagenome-derived bifunctional enzyme immobilized on chitosan-alginate/nanocellulose hydrogel. *Bioresour. Technol. Rep.* 2024;25:101749. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101749>
23. Maghraby Y.R., El-Shabasy R.M., Ibrahim A.H., Azzazy H.M.E. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*. 2023;8(6):5184–5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
24. Xu C., Tong S., Sun L., Gu X. Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: An all-inclusive review. *Carbohydr. Polym.* 2023;321:121319. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121319>
25. Zhou M., Ju X., Zhou Z., Yan L., Chen J., Yao X., Xu X., Li L.-Z. Development of an immobilized cellulase system based on metal-organic frameworks for improving ionic liquid tolerance and in situ saccharification of bagasse. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2019;7(23):19185–19193. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05175>
26. Zhou M., Yan L., Chen H., Ju X., Zhou Z., Li L. Development of functionalized metal-organic frameworks immobilized cellulase with enhanced tolerance of aqueous-ionic liquid media for *in situ* saccharification of bagasse. *Fuel*. 2021;304:121484. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121484>
27. Wu L.M., Zeng Q.H., Ding R., Tu P.P., Xia M.Z. Fe₃O₄/Acid activated montmorillonite/cellulase composites: Preparation, structure, and enzyme activity. *Appl. Clay Sci.* 2019;179(13):105129. <http://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105129>
28. Li L.-J., Xia W.-J., Ma G.-P., Chen Y.-L., Ma Y.-Y. A study on the enzymatic properties and reuse of cellulase immobilized with carbon nanotubes and sodium alginate. *AMB Express*. 2019;9:112. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0835-0>
29. Costantini A., Venezia V., Pota G., Bifulco A., Califano V., Sannino F. Adsorption of cellulase on wrinkled silica nanoparticles with enhanced inter-wrinkle distance. *Nanomaterials*. 2020;10(9):1799. <https://doi.org/10.3390/nano10091799>
30. Saha K., Verma P., Sikder J., Chakraborty S., Curcio S. Synthesis of chitosan-cellulase nanohybrid and immobilization on alginate beads for hydrolysis of ionic liquid pretreated sugarcane bagasse. *Renew. Energy*. 2019;133:66–76. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.014>
31. Ahmed I.N., Yang X.-L., Dubale A.A., Li R.-F., Ma Y.-M., Wang L.-M., Hou G.-H., Guan R.-F., Xie M.-H. Hydrolysis of cellulose using cellulase physically immobilized on highly stable zirconium based metal-organic frameworks. *Bioresour. Technol.* 2018;270:377–382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.077>
32. Zhu Y., Han J., Wu J., Li Y., Wang L., Mao Y., Wang Y. A two-step method for the synthesis of magnetic immobilized cellulase with outstanding thermal stability and reusability. *New J. Chem.* 2021;45(13):6144–6150. <https://doi.org/10.1039/D0NJ06037B>
33. Singh N., Dhanya B.S., Verma M.L. Nano-immobilized biocatalysts and their potential biotechnological applications in bioenergy production. *Mater. Sci. Energy Technol.* 2020;3:808–824. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.006>
34. Wu J., Han J., Mao Y., Wang L., Wang Y., Li Y., Wang Y. Bionic mineralization growth of UiO-66 with bovine serum for facile synthesis of Zr-MOF with adjustable mesopores and its application in enzyme immobilization. *Sep. Purif. Technol.* 2022;297(16):121505. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121505>
35. Wu J., Wang Y., Han J., Wang L., Li C., Mao Y., Wang Y. A method of preparing mesoporous Zr-based MOF and application in enhancing immobilization of cellulase on carrier surface. *Biochem. Eng. J.* 2022;180:108342. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108342>
36. Zhang X., Zheng S., Tao J., Wang X. *In Situ* Encapsulation of Cellulase in a Novel Mesoporous Metal-Organic Framework. *Catal. Lett.* 2022;152(70):699–706. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03672-y>
37. Amaro-Reyes A., Diaz-Hernandez A., Gracida J., Garcia-Almendarez B.E., Escamilla-Garcia M., Arredondo-Ochoa T., Regalado C. Enhanced performance of immobilized xylanase/filter paper-ase on a magnetic chitosan support. *Catalysts*. 2019;9(11):966. <http://doi.org/10.3390/catal9110966>
38. Zheng T., Yang L., Ding M., Huang C., Yao J. Metal-organic framework promoting high-solids enzymatic hydrolysis of untreated corn cob residues. *Bioresour. Technol.* 2022;344(Pt. A):126163. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126163>
39. Mo H., Qiu J., Yang C., Zang L., Sakai E., Chen J. Porous biochar/chitosan composites for high performance cellulase immobilization by glutaraldehyde. *Enzym. Microb. Technol.* 2020;138:109561. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109561>
40. Salem M., Mauguen Y., Prange T. Revisiting glutaraldehyde cross-linking: The case of the Arg-Lys intermolecular doublet. *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2010;66(Pt. 3):225–228. <https://doi.org/10.1107/s1744309109054037>
41. Yamato K., Yoshida Y., Kumamoto Y., Isogai A. Surface modification of TEMPO-oxidized cellulose nanofibers, and properties of their acrylate and epoxy resin composite films. *Cellulose*. 2022;29(5):2839–2853. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04131-y>
42. Handoko, Panigrahi N.R., Arora P.S. Two-component redox organocatalyst for peptide bond formation. *J. Am. Chem. Soc.* 2022;144(8):3637–3643. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c12798>
43. Paz-Cedeno F.R., Carceller J.M., Iborra S., Donato R.K., Godoy A.P., Veloso de Paula A., Monti R., Corma A., Masarin F. Magnetic graphene oxide as a platform for the immobilization of cellulases and xylanases: Ultrastructural characterization and assessment of lignocellulosic biomass hydrolysis. *Renew. Energy*. 2021;164:491–501. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.09.059>
44. Huang YY., Zhan P., Wang F., et al. Cellulase immobilized onto amino-functionalized magnetic Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticle for poplar deconstruction. *Chem. Pap.* 2022;76:5807–5817. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02292-z>

45. Gao J., Lu C.-L., Wang Y., Wang S.-S., Shen J.-J., Zhang J.-X., Zhang Y.-W. Rapid immobilization of cellulase onto graphene oxide with a hydrophobic spacer. *Catalysts*. 2018;8(5):180. <https://doi.org/10.3390/catal8050180>
46. Zou Z., Gau E., El-Awaad I., Jakob F., Pich A., Schwaneberg U. Selective Functionalization of Microgels with Enzymes by Sortagging. *Bioconj. Chem.* 2019;30(11):2859–2869. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00568>
47. Cambria E., Renggli K., Ahrens C.C., Cook C.D., Kroll C., Krueger A.T., Imperiali B., Griffith L.G. Covalent Modification of Synthetic Hydrogels with Bioactive Proteins via Sortase-Mediated Ligation. *Biomacromolecules*. 2015;16(8):2316–2326. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00549>
48. Hojnik Podrepsek G., Knez Z., Leitgeb M. Activation of cellulase cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in scCO_2 . *J. Supercrit. Fluids*. 2019;154:104629. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104629>
49. Blanco-Llamero C., Garcia-Garcia P., Senorans F.J. Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Application in Enzymatic Pretreatment of Microalgae: Comparison Between CLEAs and Combi-CLEAs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:794672. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794672>
50. Ifko D., Vasic K., Knez Z., Leitgeb M. (Magnetic) cross-linked enzyme aggregates of cellulase from *T. reesei*: A stable and efficient biocatalyst. *Molecules*. 2023;28(3):1305. <https://doi.org/10.3390/molecules28031305>
51. Han J., Feng H., Wu J., Li Y., Zhou Y., Wang L., Luo P., Wang Y. Construction of multienzyme co-immobilized hybrid nanoflowers for an efficient conversion of cellulose into glucose in a cascade reaction. *J. Agric. Food Chem.* 2021;69(28):7910–7921. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02056>
52. Ge J., Lei J., Zare R.N. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nat. Nanotechnol.* 2012;7(7):428–432. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.80>
53. Pota G., Sapienza Salerno A., Costantini A., Silvestri B., Passaro J., Califano V. Co-immobilization of Cellulase and β -Glucosidase into Mesoporous Silica Nanoparticles for the Hydrolysis of Cellulose Extracted from *Eriobotrya japonica* Leaves. *Langmuir*. 2022;38(18):5481–5493. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c00053>
54. Chen B., Qiu J., Mo H., Yu Y., Ito K., Sakai E., Feng H. Synthesis of mesoporous silica with different pore sizes for cellulase immobilization: Pure physical adsorption. *New J. Chem.* 2017;41(17):9338–9345. <https://doi.org/10.1039/C7NJ00441A>
55. Zarei A., Alihosseini F., Parida D., Nazir R., Gaan S. Fabrication of Cellulase Catalysts Immobilized on a Nanoscale Hybrid Polyaniline/Cationic Hydrogel Support for the Highly Efficient Catalytic Conversion of Cellulose. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021;13(42):49816–49827. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c12263>
56. Ariacenejad S., Motamedi E., Hosseini Salekdeh G. Stable cellulase immobilized on graphene oxide@CMC-g-poly(AMPS-co-AAm) hydrogel for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Carbohydr. Polym.* 2020;230:115661. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115661>
57. Wang Y., Chen D., Wang G., Zhao C., Ma Y., Yang W. Immobilization of cellulase on styrene/maleic anhydride copolymer nanoparticles with improved stability against pH changes. *Chem. Eng. J.* 2018;336:152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.030>
58. Lu L., Zhang L., Yuan L., Zhu T., Chen W., Wang G., Wang Q. Artificial Cellulosome Complex from the Self-Assembly of Ni-NTA-Functionalized Polymeric Micelles and Cellulases. *ChemBioChem*. 2019;20(11):1394–1399. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900061>
59. Kaur P., Taggar M.S., Kalia A. Characterization of magnetic nanoparticle-immobilized cellulases for enzymatic saccharification of rice straw. *Biomass Convers. Biorefin.* 2021;11(3):955–969. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00628-x>
60. Kumar S., Morya V., Gadhavi J., Vishnoi A., Singh J., Datta B. Investigation of nanoparticle immobilized cellulase: Nanoparticle identity, linker length and polyphenol hydrolysis. *Heliyon*. 2019;5(5):e01702. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01702>
61. Yu D., Ma X., Huang Y., Jiang L., Wang L., Han C., Yang F. Immobilization of cellulase on magnetic nanoparticles for rice bran oil extraction in a magnetic fluidized bed. *Int. J. Food Eng.* 2022;18(1):15–26. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2021-0111>
62. Marino M.A., Moretti P., Tasic L. Immobilized commercial cellulases onto amino-functionalized magnetic beads for biomass hydrolysis: Enhanced stability by non-polar silanization. *Biomass Convers. Biorefin.* 2022;13(10):1007. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01798-y>
63. Rong G.-X., Lv Z.-X., Pan Z.-J., Zhang S.-L., Deng P. Covalent immobilization of cellulase onto amino and graphene oxide functionalized magnetic $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanocomposites. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2021;21(9):4749–4757. <https://doi.org/10.1166/jnn.2021.19127>
64. Yi J., Qiu M., Zhu Z., Dong X., Andrew Decker E., McClements D.J. Robust and recyclable magnetic nanobiocatalysts for extraction of anthocyanin from black rice. *Food Chem.* 2021;364:130447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130447>
65. Huang W., Pan S., Li Y., Yu L., Liu R. Immobilization and characterization of cellulase on hydroxy and aldehyde functionalized magnetic $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites prepared via a novel rapid combustion process. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020;162:845–852. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.209>
66. Kumar A., Singh S., Nain L. Magnetic nanoparticle immobilized cellulase enzyme for saccharification of paddy straw. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2018;7(05):881–893. <http://dx.doi.org/10.20546/ijemas.2018.704.095>
67. Dal Magro L., Silveira V.C.C., Weber de Menezes E., Benvenuti E.V., Nicolodi S., Hertz P.F., Klein M.P., Rodrigues R.C. Magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase: Synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018;115:35–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.028>
68. Rashid S.S., Mustafa A.H., Rahim M.H.A., Gunes B. Magnetic nickel nanostructure as cellulase immobilization surface for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022;209:1048–1053. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.072>
69. Javid A., Amiri H., Kafrani A.T., Rismani-Yazdi H. Post-hydrolysis of cellulose oligomers by cellulase immobilized on chitosan-grafted magnetic nanoparticles: A key stage of butanol production from waste textile. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022;207:324–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.013>
70. Zanuso E., Ruiz H.A., Domingues L., Teixeira J.A. Magnetic Nanoparticles as Support for Cellulase Immobilization Strategy for Enzymatic Hydrolysis Using Hydrothermally Pretreated Corn Cob Biomass. *BioEnergy Res.* 2022;15(4):1946–1957. <http://doi.org/10.1007/s12155-021-10384-z>
71. Asar M.F., Ahmad N., Husain Q. Chitosan modified Fe_3O_4 /graphene oxide nanocomposite as a support for high yield and stable immobilization of cellulase: Its application in the saccharification of microcrystalline cellulose. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2020;50(5):460–467. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1706562>

72. Diaz-Hernandez A., Gracida J., Garcia-Almendarez B.E., Regalado C., Nunez R., Amaro-Reyes A. Characterization of magnetic nanoparticles coated with chitosan: A potential approach for enzyme immobilization. *J. Nanomater.* 2018;2018:9468574. <https://doi.org/10.1155/2018/9468574>
73. Cui J., Li L., Kou L., Rong H., Li B., Zhang X. Comparing Immobilized Cellulase Activity in a Magnetic Three-Phase Fluidized Bed Reactor under Three Types of Magnetic Field. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2018;57(32):10841–10850. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b02195>
74. Hosseini S.H., Hosseini S.A., Zohreh N., Yaghoubi M., Pourjavadi A. Covalent immobilization of cellulase using magnetic poly(ionic liquid) support: Improvement of the enzyme activity and stability. *J. Agric. Food Chem.* 2018;66(4):789–798. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03922>
75. Sanchez-Ramirez J., Martinez-Hernandez J.L., Lopez-Campos R.G., Segura-Ceniceros E.P., Saade H., Ramos-Gonzalez R., Neira-Velazquez M.G., Medina-Morales M.A., Aguilar C.N., Ilyina A. Laccase Validation as Pretreatment of Agave Waste Prior to Saccharification: Free and Immobilized in Superparamagnetic Nanoparticles Enzyme Preparations. *Waste Biomass Valorization.* 2018;9(2):223–234. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9774-z>
76. Abbaszadeh M., Hejazi P. Metal affinity immobilization of cellulase on Fe₃O₄ nanoparticles with copper as ligand for biocatalytic applications. *Food Chem.* 2019;290:47–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.117>
77. Poorakbar E., Saboury A.A., Laame Rad B., Khoshnevisan K. Immobilization of Cellulase onto Core-Shell Magnetic Gold Nanoparticles Functionalized by Aspartic Acid and Determination of its Activity. *Protein J.* 2020;39(4):328–336. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09906-z>
78. Jannah Sulaiman N., Mansor A.F., Rahman R.A., Illias R.M., Shaarani S.M. Adsorption Kinetics of Cellulase and Xylanase Immobilized on Magnetic Mesoporous Silica. *Chem. Eng. Technol.* 2019;42(9):1825–1833. <https://doi.org/10.1002/ceat.201800657>
79. Zhang Y., Jin P., Liu M., Pan J., Yan Y., Chen Y., Xiong Q. A novel route for green conversion of cellulose to HMF by cascading enzymatic and chemical reactions. *AIChE J.* 2017;63(11):4920–4932. <http://doi.org/10.1002/aic.15841>
80. Schnell F., Kube M., Berensmeier S., Schwaminger S.P. Magnetic Recovery of Cellulase from Cellulose Substrates with Bare Iron Oxide Nanoparticles. *ChemNanoMat.* 2019;5(4):422–426. <http://doi.org/10.1002/cnma.201800658>
81. Ingle A.P., Rathod J., Pandit R., da Silva S.S., Rai M. Comparative evaluation of free and immobilized cellulase for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for sustainable bioethanol production. *Cellulose.* 2017;24(12):5529–5540. <http://doi.org/10.1007/s10570-017-1517-1>

Об авторах

Сулман Александрина Михайловна, к.х.н., доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверь, набережная Афанасия Никитина, д. 22). E-mail: alexsulman@mail.ru. Scopus Author ID 57147926100, ResearcherID ABC-4215-2020, SPIN-код РИНЦ 6520-1380, <https://orcid.org/0000-0002-6845-3431>

Молчанов Владимир Петрович, д.т.н., профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверь, набережная Афанасия Никитина, д. 22). E-mail: molchanov@science.tver.ru. Scopus Author ID 57146992100, ResearcherID U-3736-2019, SPIN-код РИНЦ 7265-3331, <https://orcid.org/0000-0003-3038-0406>

Балакшина Дарья Вадимовна, студент магистратуры, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверь, набережная Афанасия Никитина, д. 22). E-mail: dasha.balakshina.01@bk.ru. <https://orcid.org/0009-0002-0551-8469>

Гребенникова Ольга Валентиновна, к.х.н., доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверь, набережная Афанасия Никитина, д. 22). E-mail: olechkamatveeva@mail.ru. Scopus Author ID 57219406141, ResearcherID A-9397-2014, SPIN-код РИНЦ 2995-9094, <https://orcid.org/0000-0002-8888-1783>

Матвеева Валентина Геннадьевна, д.х.н., профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Россия, Тверь, набережная Афанасия Никитина, д. 22). E-mail: matveeva@science.tver.ru. Scopus Author ID 7004479390, ResearcherID B-1120-2014, SPIN-код РИНЦ 8005-3995, <https://orcid.org/0000-0002-3291-4865>

About the Authors

Alexandrina M. Sulman, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Department of Biotechnology, Chemistry and Standardization, Tver State Technical University (22, Afanasiya Nikitina nab., Tver, 170026, Russia). E-mail: alexsulman@mail.ru. Scopus Author ID 57147926100, ResearcherID ABC-4215-2020, RSCI SPIN-code 6520-1380, <https://orcid.org/0000-0002-6845-3431>

Vladimir P. Molchanov, Dr. Sci. (Eng.), Professor, Department of Biotechnology, Chemistry and Standardization, Tver State Technical University (22, Afanasiya Nikitina nab., Tver, 170026, Russia). E-mail: molchanov@science.tver.ru. Scopus Author ID 57146992100, ResearcherID U-3736-2019, RSCI SPIN-code 7265-3331, <https://orcid.org/0000-0003-3038-0406>

Daria V. Balakshina, Master Student, Tver State Technical University (22, Afanasiya Nikitina nab., Tver, 170026, Russia). E-mail: dasha.balakshina.01@bk.ru. <https://orcid.org/0009-0002-0551-8469>

Olga V. Grebennikova, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Department of Biotechnology, Chemistry and Standardization, Tver State Technical University (22, Afanasiya Nikitina nab., Tver, 170026, Russia). E-mail: olechkamatveeva@mail.ru. Scopus Author ID 57219406141, ResearcherID A-9397-2014, RSCI SPIN-code 2995-9094, <https://orcid.org/0000-0002-8888-1783>

Valentina G. Matveeva, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Department of Biotechnology, Chemistry and Standardization, Tver State Technical University (22, Afanasiya Nikitina nab., Tver, 170026, Russia). E-mail: matveeva@science.tver.ru. Scopus Author ID 7004479390, ResearcherID B-1120-2014, RSCI SPIN-code 8005-3995, <https://orcid.org/0000-0002-3291-4865>