



**IMPROVING STABILITY AND TOLERANCE TO P-GLUCURONIDASE BY-PRODUCTS
BASED ON MAGNETICALLY CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES**

Gaibnazarov S.B.

Head of research Doctor of Chemical Sciences

Bazarov B.Kh.

Responsible Executor Director of Liquorige Engineering Llc

Zou Dongsheng

Technologist of Liquorige Engineering Llc

Zhang Yingguo

Technologist of Liquorice Engineering Llc

Annotation

β -glucuronidase is an important catalyst that is very specific for β -glucuronides. Here, we engineered β -glucuronidase magnetic cross-linking aggregates (MCLEA) for the production of glycyrrhetic acid (GA). Before crosslinking through glutaraldehyde, we used carbodiimide to enhance the interaction between enzymes and Fe₃O₄ with carboxyl functional groups, effectively improving activity recovery. Compared to free enzymes, both k_{cat} and k_{cat}/K_m increased, indicating that crosslinking and aggregation increase enzyme catalytic efficiency. MCLEA improved pH and thermal stability and retained 63.3% catalytic activity after 6 cycles. More importantly, it was found for the first time that glucuronic acid tolerance of β -glucuronidase after the formation of MCLEAs was increased by 221.5% in 10 mM glucuronic acid. According to Raman spectroscopy, the ordered structure of β -glucuronidase increased from 43.9% to 50.6% after immobilization, which explains the increase in stability and tolerance of c. In summary, MCLEA provided an effective enzyme immobilization strategy that increased enzyme stability and resistance to glucuronic acid. This can be an effective solution to the problem of severe inhibition caused by by-products in the production of aglycone from natural glycosides, which has significant prospects for industrial applications.

Keywords: P-glucuronidase Magnetic crosslinking enzyme aggregates tolerance to glucuronic acid

1. Введение

Являясь высокоэффективным катализатором, природные ферменты обладают отличной - субстратной специфичностью, селективностью и экологически чистыми условиями реакции, оказывая важное влияние на аспекты биосовместимости, биоразлагаемости и обновления. Ферментативный катализ для получения ценных соединений привлекает все большее внимание в связи с его экологичностью. Хотя чувствительность ферментов была улучшена за счет белковой инженерии, промышленное применение ферментов часто затруднено из-за



отсутствия долговременной операционной стабильности и сложного восстановления. [1,2] . Стратегия иммобилизации обычно является наиболее эффективным средством преодоления этих недостатков. [3] . Помимо более удобного обращения, иммобилизация обеспечивает легкое отделение от продукта, тем самым сводя к минимуму или исключая белковое загрязнение продукта. [4-6] , что является необходимым условием экономической целесообразности во многих промышленных приложениях. [7-9] . Отличается от обычной технологии иммобилизации, считая агрегаты ферментов (CLEA) [10-12] считаются простой и эффективной стратегией, демонстрирующей огромный потенциал в промышленном катализе . Как изобретатель CLEA, Шелтон впервые сообщил об этом простом методе фиксации ферментов. [13] . Сшивающие агенты для CLEA включают соли, органические растворители или неионогенные полимеры и другие вещества. [14-17] . Из-за образования агрегатов ферментов локальные молекулы ферментов поддерживаются в диапазоне высоких концентраций, что указывает на то, что CLEA могут достигать большей каталитической эффективности. Кроме того, с помощью эффекта конфайнмента [18] , CLEA также значительно улучшают температурную - стабильность ферментов. Тем не менее, некоторые проблемы все еще возникают, когда дело доходит до перекрестных ссылок. Если ферменты были бедны Lys на поверхности, часто требовалось аминирование фермента или введение аминированного фидера (белка или полимера) для усиления сшивки. [19-21] . В некоторых случаях CLEA будут чрезвычайно хрупкими при извлечении фильтрацией или центрифугированием. Их низкая механическая прочность или образование мелких частиц могут разрушить любой пористый фильтр. Во-вторых, размер пор может быть меньше, что может привести к большим ограничениям диффузии.[19] . Учитывая вышеуказанные дефекты, магнитно-сшитые агрегаты ферментов - (MCLEA) стали предметом текущих исследований. [22,23] . Из-за их суперпарамагнитных характеристик, обеспечиваемых Fe 3 O 4 , MCLEA легче отделить, и они имеют меньше ограничений по массопереносу. [10, 24,25] . Широко сообщалось об иммобилизации ферментов с помощью MCLEA с использованием аминофункционализированных МНЧ, что свидетельствует о том, что их применение обеспечивает механическую стабильность и эффективное магнитное разделение. [26-28].

Р-глюкуронидаза рассматривается как многообещающая альтернатива получению глицирретиновой кислоты (ГК) из глицирризина (ГЛ). GA представляет собой активный агликон с отличной физиологической и фармакологической активностью . [29-32] , имеющие широкий спектр использования и перспективы применения. Однако, как и другие важные агликоны, GA также является водонерастворимым соединением, которое очень трудно отделить от матрицы иммобилизации в промышленном производстве. Чтобы устранить вышеуказанные ограничения, мы ввели наночастицы Fe 3 O 4 в качестве ядра для соосаждения с п-глюкуронидазой для образования MCLEA (схема 1). Чтобы усилить восстановление каталитической активности, глутаровый альдегид и карбодиимид использовали для поперечного связывания самого белка и карбоксил-функционализированного Fe 3 O 4 . Осадитель, содержание сшивающего агента и масса Fe 3 O 4 были оптимизированы для



улучшения восстановления активности MCLEA. Также было подтверждено повышение стабильности в экстремальных условиях, таких как кислота, щелочь и высокая температура. Затем мы оценили устойчивость свободных ферментов и MCLEA к глюкуроновой кислоте при различных концентрациях глюкуроновой кислоты. Наконец, спектроскопия комбинационного рассеяния была адаптирована для анализа изменений молекул ферментов вторичной структуры для понимания механизма стабильности после образования MCLEA.

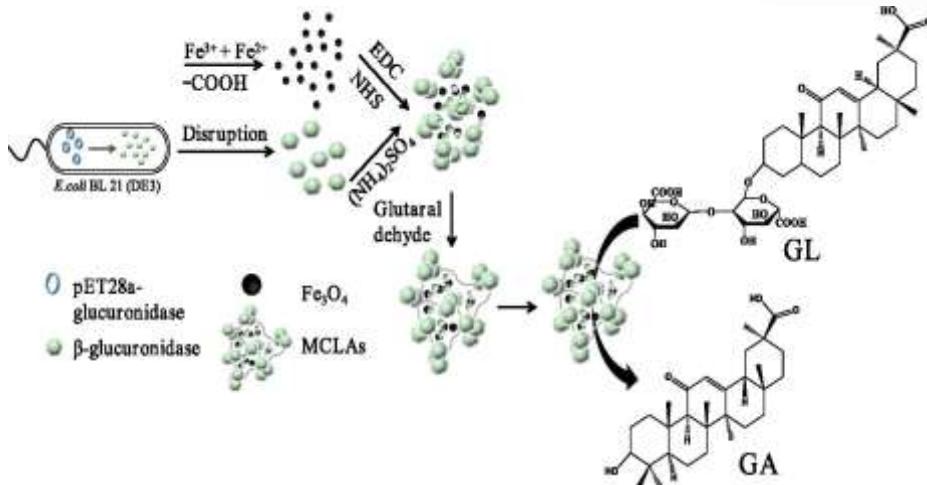
2. Материалы и Методы

2.1. Реагенты и материалы.

Гены р-глюкуронидазы и праймеры, используемые в этом эксперименте, были приобретены у Sangon Biotech (Шанхай). *E. coli* trans5a и BL21 (DE3) были получены от TransGene Biotech (Пекин). FeCl₃ -6H₂O, FeCl₂ -4H₂O и GL были получены от Macklin (Шанхай). Стандарты GA (99%), глюкуронида глицирретиновой кислоты (GAMG 99%) и GL (99%) были получены от Shanghai yuan ye Bio-Technology Co. Ltd. Все остальные реагенты, использованные в этом эксперименте, являются аналитически чистыми.

2.2. Экспрессия и очистка fl-глюкуронидазы.

Мы провели скрининг р-глюкуронидазы из *Aspergillus bertholletiae* с помощью NCBI (KAЕ8374379.1, pI=5,42, мономерная, 80 кДа) и назвали ее AbGUS. Для конструирования рекомбинантной плазмида была выбрана рET28a(+), и рекомбиназа экспрессировалась в *E.coli* BL21 (DE3). Культуры клеток инкубировали в течение 12 ч в среде Луриа-Бертани (LB), содержащей 50 мкл. 1 г/мл канамицина при 37 °C. Когда OD₆₀ ° составляла около 0,6, к нему добавляли 100 мкл IPTG (0,5 М). После этого культуры выдерживали при 16°C в течение 20 ч (220 об/мин) для индукции экспрессии белка. Затем культуры клеток центрифугировали при 4 °C и 5500 об/мин в течение 15 мин. После многократной промывки фосфатным буфером (ФБ, pH 7,4, 20 mM) полученные клетки суспендировали в 20 мл лизирующего буфера (pH 8,0, - содержащего 10 mM имидазола, 30 mM Трис-HCl и 150 mM NaCl). Затем клетки фрагментировали путем гомогенизации под высоким давлением. Супернатант после центрифугирования (5500 об/мин, 15 мин) собирали и добавляли в хроматографическую колонку с металл-хелатированием Ni-NTA от Union-Biotech (Шанхай, Китай) и элюировали буфером (с 30 mM, 50 mM, 300 mM имидазола), содержащий 30 mM Трис-HCl и 150 mM NaCl) при pH 8,0. Собранные ферменты дополнительно обессоливали ультрафильтрацией при 4 °C и 4500 об/мин. Очистку AbGUS подтверждали электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Концентрацию рассчитывали по методу Брэдфорда. [33]. Полученные ферменты хранили при 4 °C с содержанием глицерина 40% для дальнейшего использования.



2.3. Получение карбоксилфункционализированных магнитных наночастиц Fe_3O_4

Карбоксилфункционализированные магнитные наночастицы Fe_3O_4 были приготовлены на основании отчета с некоторыми изменениями. [34]. В частности, 3,25 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 1,195 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяли в 50 мл воды Milli-Q, а затем раствор переносили в 100 мл трехгорлой круглой колбы с донным дном и нагревают до 50 °C при интенсивном перемешивании. Через 30 мин температуру повысили до 75 °C. Затем в систему добавили 6,25 мл $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и продолжали перемешивание смесей в течение 60 мин. Затем к реакционной системе добавляли 6,25 мл тринатрийцитрата (1,5 М) и повышали температуру до 85 °C. Затем смеси перемешивали в течение 90 мин. По окончании реакции магнитные наночастицы собирали магнитом, несколько раз промывали насыщенным раствором хлорида натрия, водой Milli-Q и этанолом и суспендировали в дедионизированной воде для дальнейшего использования.

2.4. Подготовка MCLEA

Во-первых, 4 мг карбоксилфункционализованного Fe_3O_4 , 200 мкл EDC (12,5 mM) и NHS (12,5 mM) инкубировали вместе для активации наночастиц Fe_3O_4 при 13 °C в течение 1 часа. Затем 200 мкл AbGUS (0,8 мг/мл) и 200 мкл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ смешивали с 4 мг Fe_3O_4 . Смеси инкубировали в течение 1,5 ч при 13 °C. Наконец, добавляли 0,25% глутаральдегида (об./об.) для сшивания ферментов и Fe_3O_4 на 3 часа. Осадок собирали и трижды промывали фосфатным буферным раствором (pH 7,5, 20 mM) для удаления незафиксированной р-глюкуронидазы и хранили при 4 °C. количество $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и глутарового альдегида.

2.5. Анализ активности свободных и иммобилизованных AbGUS

Определенное количество (50 мкл 0,8 мг/мл) свободных AbGUS и MCLEA добавляли в 1 мл реакционной системы, содержащей 1 мг/мл GL (pH 5,0, 50 mM уксусно-кислотно-ацетатного буфера), соответственно. После реакции при 40 °C в течение 10 мин добавляли 800 мкл метанола для остановки реакции. После пропускания смесей через микропористую мембрану толщиной 0,22 мкм продукт обнаруживали методом ВЭЖХ с использованием УФ-детектора при 250 нм. Система Shimadzu LC-15 C оснащена колонкой Diamonsil C 18 (4,6 x 250 мм, 5 мкм).



Подвижной фазой служили метанол (95 %) и 0,2 % водный раствор фосфорной кислоты (5 %) при скорости потока 0,8 мл/мин.

Было упомянуто понятие относительной активности, чтобы показать каталитическую активность ферментов более простым методом. Он был рассчитан по следующему уравнению:
Относительная активность =

о — это наивысшая активность одной группы. дх являются таковыми у других.

Кинетические параметры свободных и иммобилизационных ферментов

Кинетические параметры для свободного и иммобилизованного AbGUS (0,25 мкМ) определяли путем измерения начальной скорости реакции при концентрациях субстрата GL от 0,6 до 4,8 мМ при инкубации системы в оптимальных условиях. К т и k_{cat} были получены по нелинейной аппроксимации кривых.

Одну единицу (Е) каталитической активности AbGUS определяли как количество фермента, которое в оптимальных условиях продуцировало 1 мкмоль ГК в минуту.

Оценка стабильности свободных и иммобилизованных ферментов

Для оценки рН и термостабильности свободные и иммобилизованные АбГУС хранили в фосфатном буфере от 3,5 до 9,0 (20 мМ, pH 7,0) растворе или в диапазоне температур от 30 °C до 75 °C и определяли остаточную активность свободных а иммобилизованный AbGUS измеряли через 2 часа. Стабильность при хранении исследовали путем инкубации свободных ферментов и MCLEA в растворе фосфатного буфера (20 мМ, pH 7,0) при 25 °C в течение 8 дней. Возможность повторного использования CLEA и MCLEA изучали путем расчета относительной активности после переработки для гидролиза GL. После каждого использования CLEA и MCLEA извлекали центрифугированием или магнитом и очищали буфером уксусной кислоты и ацетата натрия (pH 5,0, 50 мМ).

Характеристики

Морфологию и размеры синтезированных адсорбентов исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ, Hitachi H-800) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, JSM-5600LV) (Токио, Япония). Конфокальный микроскопический рамановский спектрометр (Ram, InVia Reflex) использовали для измерения изменений вторичной структуры AbGUS. Вибрационный магнитометр образцов (VSM, Quantum Design, США) использовали для определения магнитных свойств образцов при 25 °C с магнитным полем в диапазоне от -15 до 15 кЭ.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Экспрессия и гидролитическая активность рекомбинантной -глюкуронидазы

ГК — продукт гидролиза ГЛ, удаляющий две молекулы глюкуроновой кислоты. В случае неполного гидролиза ГЛ может быть превращен в смесь ГК и ГАМГ, содержащую одну глюкуроновую кислоту. Таким образом, выделение р-глюкуронидазы с высокой активностью и селективностью является ключом к получению ГА. В этом эксперименте мы впервые проверили новую Р-глюкуронидазу от NCBI. AbGUS, укоренившийся в *Aspergillus bertholletiae*, состоял из



646 а.о. После амплификации гена с помощью ПЦР рекомбинантная плазмида pet28a (+) была сконструирована в *E. coli* (DE3) (фиг. S1A). Экспрессированный His-меченный AbGUS очищали с помощью хроматографии с металл-хелатированием Ni-NTA. Целевая полоса очищенного AbGUS составляла около 80 кДа на дорожке 2 на фиг. S1B . Для подтверждения режима гидролиза AbGUS мы дополнительно проанализировали изменение типа продукта при разном времени реакции. Для определения модели гидролиза AbGUS 50 мкл AbGUS (1 мг/мл) добавляли к 1 мл 1 мг/мл GL (рН 5,0, 50 мМ уксусно-ацетатно-натриевого буфера). Как показано на рис. 1А, с увеличением времени содержание ЗЛ постоянно снижалось, в то время как ГА вырабатывалась быстро и достигала своего пика. С 5 по 40 мин содержание ГАМГ оставалось неизменным, и только около 6,8% ГЛ гидролизовалось с образованием ГАМГ. Ферменты могут эффективно гидролизовать GL с образованием GA в течение 40 минут. При концентрации субстрата 1 мг/мл с-конверсия GL достигала 91,4% (рис. 1Б). Мы установили режим гидролиза полученного AbGUS по результатам ВЭЖХ. AbGUS в основном действовал на внутреннюю глюкуронидную связь, чтобы получить GA напрямую, и только небольшая часть внешней группы глюкуроновой кислоты была гидролизована, чтобы получить GAMG (рис. 1С). ESI-MS использовали для дальнейшего доказательства того, что продукт представляет собой GA. Значение m/z 469,33 было характерным пиком GA на -ESI (рис. S2), что было таким же, как и в предыдущих отчетах .^[35]. Основываясь на результатах ВЭЖХ и ESI-MS, мы получили глюкуронидазу, которая могла эффективно гидролизовать GL с образованием GA, который генерировал лишь небольшое количество GAMG.

3.2. Оптимизация параметров иммобилизации AbGUS.

Для максимального восстановления каталитической активности CLEA необходимо захватить значительное количество свободного AbGUS. Поэтому пять белковых осадителей, таких как сульфат аммония, ацетон, изопропанол, ацетонитрил и этанол (1 мл осадителя добавляли на 1 мл клеточных лизатов), оценивали на их способность осаждать AbGUS. Как показано на фиг. 2А, среди этих пяти осадителей насыщенный сульфат аммония показал максимальное извлечение белка, до 89,12%. Напротив, содержание белка в супернатанте после преципитации четырьмя другими преципитантами даже превышало 60%. Это означает, что насыщенный сульфат аммония может эффективно извлекать ферментный белок из клеточных лизатов. Затем измеряли каталитическую активность агрегированных ферментов пятью осадителями путем сравнения активности равных количеств свободных ферментов. Агрегированные ферменты, полученные насыщенным сульфатом аммония, проявляли 92% исходной активности. Это указывало на то, что высаливание может эффективно извлекать как можно больше белка из клеточных лизатов и в достаточной степени поддерживать каталитическую эффективность AbGUS. Причинами потери активности при использовании других осадителей может быть проникновение этих растворителей, влияющее на гибкость ферментов и изменение их конформации. [36,37] . Таким образом, в качестве осадителя в следующем эксперименте был выбран насыщенный сульфат аммония. Для оценки влияния содержания сульфата аммония на выход и активность агрегированных AbGUS различные объемы насыщенного сульфата аммония



смешивали с клеточными лизатами. Как показано в Рис. 2В: выход белка увеличивается с 41,3% до 92,4%, когда отношение насыщенного сульфата аммония к ферментам увеличивается с 0,25:1 до 2,5:1 (об./об.), что указывает на то, что низкого содержания сульфата аммония недостаточно для осаждают большую часть белка. После этого, даже если доля -сульфата аммония продолжала увеличиваться, выход белка $\text{-оставался неизменным}$. Однако при самых высоких концентрациях сульфата аммония (1:2,5) более 80% агрегированных AbGUS теряли свою активность. Наиболее вероятным объяснением было то, что высокая концентрация -сульфата аммония делала раствор чрезмерно щелочным, что приводило к изменению третичной структуры белка, в результате чего каталитическая активность AbGUS снижалась. [36,38]. Одним из недостатков традиционных CLEA была необходимость центрифугирования или фильтрации для извлечения иммобилизованных ферментов [39] [39]. Чтобы решить эту проблему, мы ввели магнитные наночастицы Fe_3O_4 в качестве ядра для совместного осаждения с агрегированными ферментами.

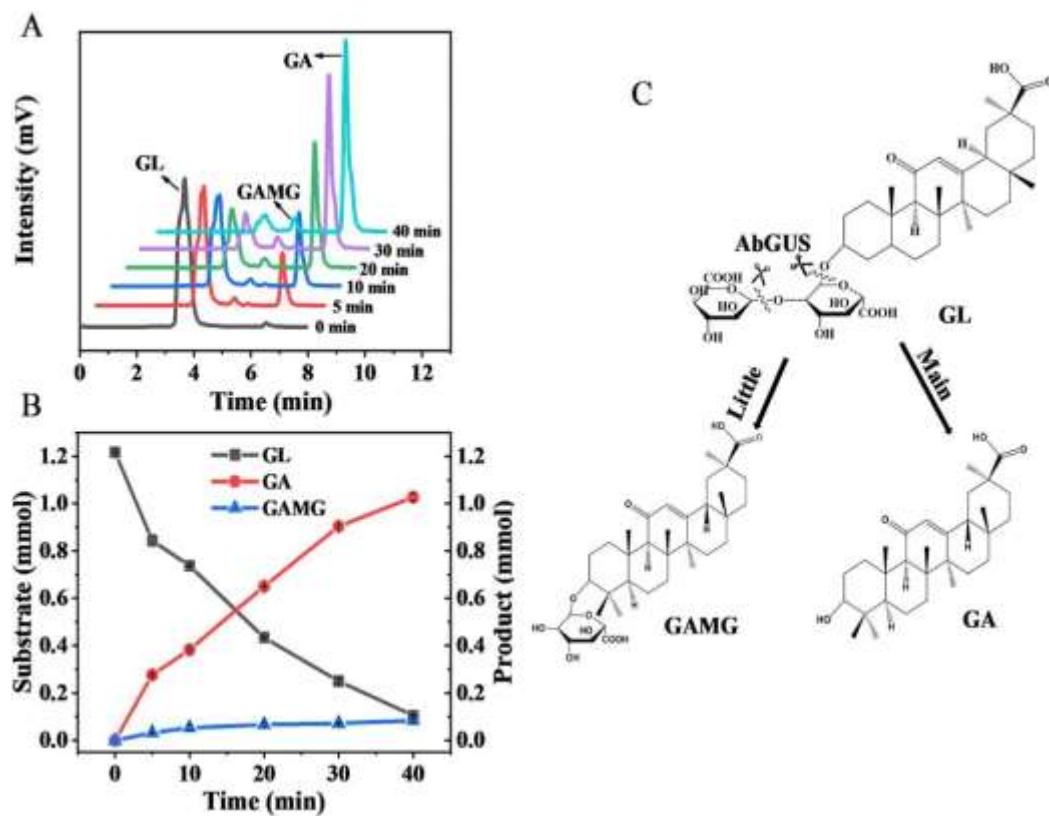


Рис. 1. Гидролиз ЗЛ свободной рекомбинантной (z -глюкуронидазой AbGUS): (А) ВЭЖХ-хроматограммы продуктов гидролиза ЗЛ при различном времени гидролиза (0-40 мин); (Б) Расход ЗЛ (квадрат) и выход ГК (циклон) и GAMG (треугольник) через 40 мин (С) Схематическая диаграмма режима гидролиза AbGUS на GL (Для интерпретации ссылок на цвет в подписи к этому рисунку читатель отсылается к веб-версии этой статьи.)

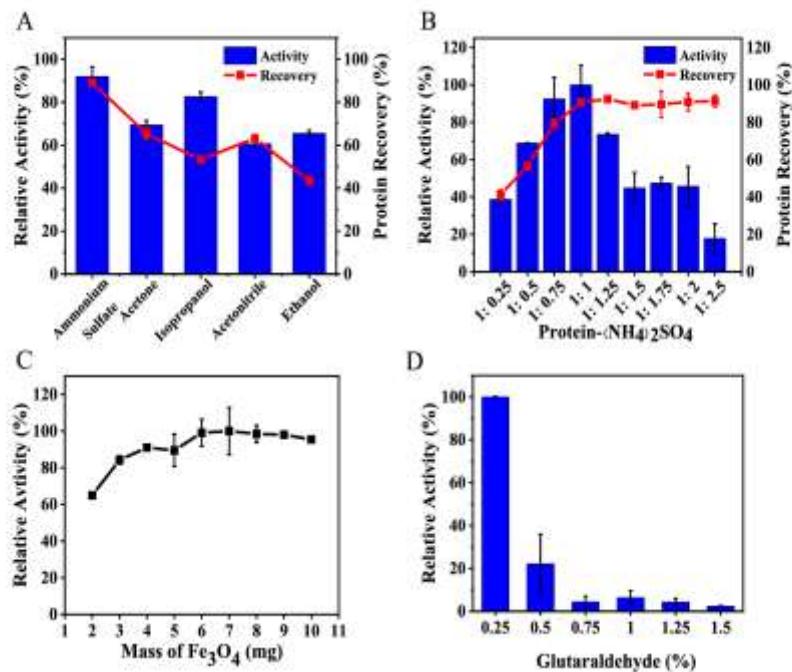


Рис. 2. Оптимизация условий приготовления МКЛЭА. Влияние различного осадителя (А), массы Fe_3O_4 (В), содержания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и глутарового альдегида (С и Д).

Обычно выбирают наночастицы Fe_3O_4 , модифицированные APTES (3-аминопропилтриэтоксисиланом) или покрытые хитозаном. Эти способы обычно требовали более сложных реакционных процессов и больших затрат времени. Более того, аминофункционализированные наночастицы Fe_3O_4 были соосаждены с белковыми молекулами посредством электростатического адсорбция, приводящая к десорбции между ферментным белком и наночастицами [40,41]. Здесь мы использовали наночастицы Fe_3O_4 , модифицированные лимонной кислотой, которые было легче подготовить. После активации карбодиимидом EDC/NHS наночастицы Fe_3O_4 , функционализированные карбоксильной группой, могут быть ковалентно связаны с белком, увеличивая взаимодействие между носителем и белком при осаждении [42]. Чтобы проверить влияние стадий активации на восстановление активности фермента, были измерены MCLEA, приготовленные с активацией и без активации, соответственно. Как показано на рис. S3, MCLEA с активацией показали восстановление активности на 82,27%. Однако MCLEA без активации показали только 30,2% восстановления активности. Из-за недостаточного взаимодействия инактивированного Fe_3O_4 с ферментами восстановление катализической активности было значительно ниже, чем у МКЛЭА, приготовленных на активированном Fe_3O_4 . Таким образом, можно сделать вывод о значимости стадии активации при формировании МКЛЭА. Кроме того, восстановление активности CLEA достигло лучшего уровня. Однако из-за того, что CLEA необходимо собирать центрифугированием, необходимо сравнить другие аспекты, такие как стабильность и возможность повторного использования, для измерения этих стратегий иммобилизации. Затем масса наночастиц Fe_3O_4 была изменена для изучения влияния на восстановление активности.



Как показано на рис. 2В, максимальное извлечение AbGUS с помощью MLCEA было получено при добавлении 6 мг Fe₃O₄. Относительная активность оставалась неизменной, даже если масса увеличивалась. Таким образом, массовое отношение белка к Fe₃O₄ было выбрано в пределах 1–37,5 (мг/мг) для следующих экспериментов. В 1960-х годах было обнаружено, что нерастворимые и активные спивающие ферменты могут быть получены путем реакции поверхностных групп NH₂ с функциональными химическими спивающими агентами (такими как глутаровый альдегид) [43,44]. Концентрация глутарового альдегида также была важным фактором, влияющим на восстановление активности MCLEA. При конечном содержании глутарового альдегида 0,25% от общего объема (рис. 2Г) относительная активность МКЛЭА была наибольшей. Однако относительная активность начинала снижаться, когда содержание глутарового альдегида продолжало увеличиваться. Это было связано с тем, что высокие концентрации глутарового альдегида могли изменить конформацию активных центров фермента [45]. Кроме того, при высоких концентрациях глутарового альдегида увеличение жесткости фермента приводило к потере гибкости фермента [40]. 3.3. Морфологические характеристики и физические свойства MCLEA. Чтобы проверить образование MCLEA, SEM и TEM были выполнены на карбоксильных функционализированных наночастицах Fe₃O₄, CLEA и MCLEA. Так как на рис. 3А и С наночастицы Fe₃O₄ представляли собой сферические частицы диаметром 10 нм, равномерно диспергированные и имеющие гладкую поверхность. После образования MCLEA поверхность наночастиц стала шероховатой и неровной (на двух встроенных рисунках рис. 3А и Б), что свидетельствует о присоединении и агрегации белковых молекул к магнитным наночастицам. На ПЭМ-фотографии MCLEAs можно было обнаружить, что наночастицы Fe₃O₄ были инкапсулированы агломерированными белками, что указывает на то, что магнитные наночастицы обеспечивают ядра для роста агрегатов ферментов. Кроме того, по сравнению с CLEA (рис. S4), морфология MCLEA существенно не изменилась, что доказывает, что введение магнитных наночастиц не оказало существенного влияния на структуру иммобилизованных ферментов. BET и BJH использовались для изучения адсорбционных свойств Fe₃O₄, CLEA и MCLEA. Как показано на рис. S5 и в таблице 1, удельная площадь поверхности и объем пор CLEA наименьшие. В то время как удельная поверхность и объем пор MCLEA значительно увеличились. По сравнению с CLEA, меньший размер частиц, большая площадь поверхности и большее количество пор обеспечивают более превосходный эффект массовой диффузии для повышения каталитической активности иммобилизованных ферментов. Результаты FT-IR (рис. S6А) показали, что характерные пики карбоксильных групп были обнаружены вблизи 1700 см⁻¹ и 3500 см⁻¹, что доказывает, что лимонная кислота успешно модифицируется на поверхности Fe₃O₄. Что касается CLEAs и MCLEAs, то на двух спектрограммах не было явных различий, подтверждающих, что введение карбоксильного функционализатора Fe₃O₄ не повлияло на структуру ферментов. Могут ли магнитно-иммобилизованные ферменты поддерживать хорошую

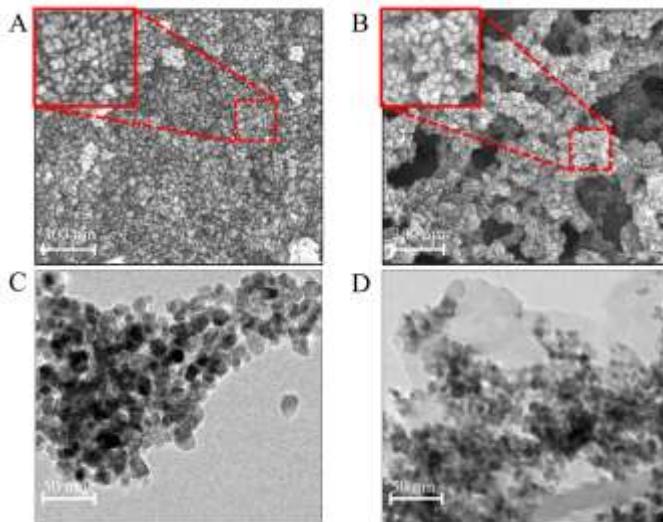


Рис. 3. Морфологические характеристики магнитных наночастиц и иммобилизованных ферментов. SEM карбоксифункционализации Fe_3O_4 (А) и MCLEAs (В). Вставленное изображение является увеличенным частичным изображением SEM Fe_3O_4 и MCLEAs. ПЭМ карбоксифункционализации Fe_3O_4 (С) и MCLEAs (Д).

Таблица 1

Площадь поверхности по БЭТ и объемы пор приготовленных магнитных материалов, CLEA и MCLEA.

Образцы	Площадь поверхности по БЭТ ($\text{м}^2/\text{г}$)	Объем пор ($\text{см}^3/\text{г}$)
Fe ₃ O ₄	72,46	0,258
CLEA		0,006
MCLEA	39,89	0,116

магнитный отклик является важным фактором, влияющим на разделение ферментов. Мы охарактеризовали намагниченность карбоксилфункционированных наночастиц Fe_3O_4 и МКЛЭА в магнитном диапазоне от 15 до 15 кЭ. Как показано на рис. S6B, после того, как наночастицы Fe_3O_4 были сшиты и осаждены ферментными белками, намагниченность магнитных наночастиц снизилась с 61,87 эму/g до 35,1 эму/g. Это также доказывает, что ферментные белки покрывают поверхность Fe_3O_4 , что приводит к снижению способности магнитного отклика. Тем не менее, даже если намагниченность уменьшилась на 43,2%, он все равно имел хороший магнитный отклик. С помощью внешнего магнита MCLEA можно хорошо отделить от смеси (см. вставленную фотографию на рис. S6B).

3.4. Оптимальные pH и температура свободных AbGUS и MCLEA pH и температура играют важную роль в оптимальной каталитической активности ферментов. Как показано на рис. 4A, как свободные, так и иммобилизованные ферменты достигают наибольшей активности при pH 5,0. Однако MCLEA обладали лучшей каталитической активностью при pH от 3,0 до 6,0 по сравнению со свободными ферментами. MCLEA сохраняли относительную активность выше 80% в диапазоне



pH от 3,5 до 6,0, в то время как свободные AbGUS теряли более 80% исходной активности при pH 3,5 и 6,0. Это может быть связано с ковалентным связыванием AbGUS, которое может иметь ограниченные конформационные изменения, что приводит к более высокой относительной активности в широком диапазоне pH [46]. После формирования МКЛЭА оптимальная температура иммобилизованной АБГУС повышалась с 40 ° С до 55 ° С (рис. 4Б). Более того, он также проявлял более высокую активность в высокотемпературной среде, чем свободные ферменты. При 65 ° С МКЛЭА все еще сохраняли 73,8% каталитической активности, но активность свободных AbGUS теряла более 75%. Сетчатая структура, образованная сшиванием, также увеличивала жесткость белка, что позволяло ферменту осуществлять гидролиз при более высоких температурах [47–49]. Большинство соединений гликозидов, таких как GL, плохо растворяются в холодной воде. Таким образом, более высокая растворимость субстратов может быть получена за счет повышения температуры реакции, что способствует конверсии реакции и значительно снижает потери агликона в процессе производства. Константа Михаэлиса-Ментона является очень важным показателем для измерения связывающей способности между ферментами и субстратом и каталитической эффективности при различных концентрациях субстрата. Мы измерили кинетические кривые равных количеств свободных AbGUS и MCLEA в оптимальных условиях реакции. По сравнению со свободными ферментами ($K_m = 2,453$ мМ [50]), K_m MCLEA (2,413 мМ) практически не изменились, что указывает на отсутствие влияния на средство между ферментами и субстратами. Мы получили ферментативную активность свободного фермента и MCLEAs, которая составила 1,25 ед/мг и 1,74 ед/мг соответственно. Сшивание и агрегация не ограничивали контакт между ЗС и активным центром AbGUS [51]. Напротив, k_{cat} для MCLEAs был почти на 40% выше, чем для свободного AbGUS. Образование агрегатов увеличивало локальную концентрацию молекул фермента, что улучшило каталитическую эффективность AbGUS [52]. В частности, k_{cat}/K_m (мМ⁻¹ • с⁻¹) увеличилось почти на 167,8%, что свидетельствует о значительном улучшении каталитической эффективности MCLEA по сравнению со свободным AbGUS. (Таблица 2). 3.5. MCLEA повысили стабильность, возможность повторного использования и устойчивость к глюкуроновой кислоте. Инактивация ферментов в экстремальных условиях является критическим ограничением при крупномасштабном применении в промышленности. Мы исследовали стабильность свободных ферментов, CLEA и MCLEA при различных pH и температурных условиях. На рис. 5 А и В активность CLEA и MCLEA значительно не снизилась после инкубации в течение 2 часов. После помещения в условия pH 3,5 и 9,0 на 2 часа относительная активность как MCLEA, так и CLEA все еще сохранялась на уровне более 80%. Свободный AbGUS снижался на 66,4% и 63,3% от исходной активности после 2-часового хранения в среде с таким же pH. Что касается термостабильности, то оба иммобилизованных фермента показали более высокую стабильность при низких температурах. Однако после инкубации при 75 ° С в течение 2 ч активность свободного AbGUS терялась почти на 90%. CLEA и MCLEA по-прежнему сохраняли 30,58% и 33,1% каталитической активности при той же тепловой обработке. Сшивание и агрегация повышают стабильность фермента при более высоких температурах и экстремальных значениях



pH. Именно за счет поперечного связывания усиливалась жесткость фермента, что приводило к значительному повышению толерантности белка к окружающей среде. Стабильность при длительном хранении также доказала преимущество более высокой стабильности MCLEA (рис. 5 C). Свободные AbGUS и MCLEA хранили при 25 °C в течение 8 сут. Активность свободного AbGUS потеряла 96,6%, что было близко к полной инактивации. Относительная активность MCLEA оставалась более 70%. Сетчатая структура, образованная агломерацией и шивкой между ферментами, увеличивала жесткость фермента и делала третичную структуру более стабильной [53,54]. Это повышало толерантность фермента в экстремальных условиях и имело важное значение в долговременном катализе гликозидных соединений [55] в высокотемпературных системах. Возможность повторного использования — важный показатель для оценки качества иммобилизованных ферментов. Таким образом, мы дополнительно оценили возможность повторного использования CLEA и MCLEA (рис. 5 D). После 6-кратного повторения остаточная активность MCLEA все еще сохранялась на уровне 63,3%, тогда как активность CLEA снижалась на 82,2%. После введения магнитных наночастиц Fe₃O₄ в качестве ядра

Таблица 2

Кинетические параметры свободных и иммобилизованных ферментов.

	K _m (ММ)	ккат Л ⁻¹	K _{кат} /K _m (ММ ⁻¹ ■ с ⁻¹)
Бесплатный	2,453 ± 0,171	8,361 ± 0,052	3.408
MCLEA	2,413 ± 0,814	11,668 ± 0,118	5.719

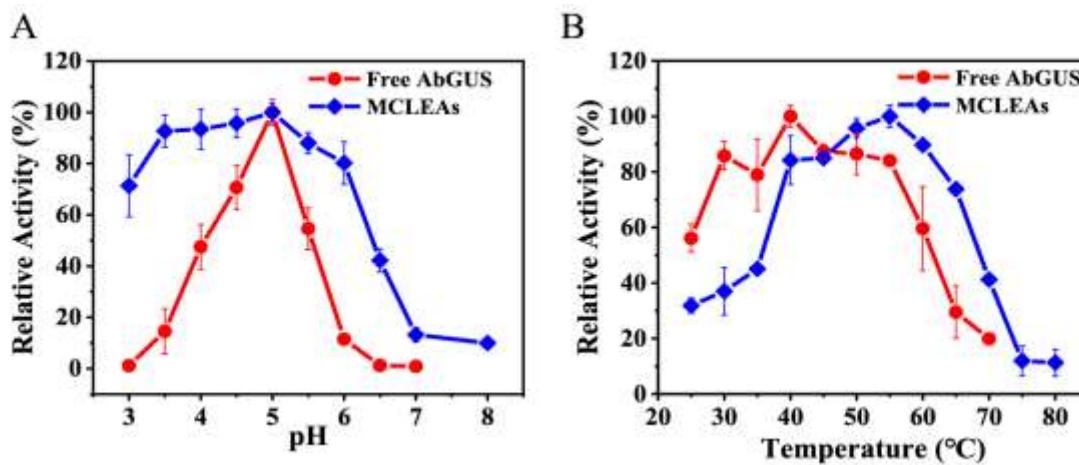


Рис. 4. Влияние различных значений pH (А) и температуры (Б) на относительную активность свободных AbGUS и MCLEA.

иммобилизованных ферментов, MCLEA можно было легко восстановить с помощью внешнего магнитного поля, что позволило избежать инактивации ферментов из-за механической силы в процессе центрифугирования [56]. Кроме того, было трудно повторно диспергировать CLEA после центрифугирования. Принимая во внимание восстановление каталитической активности,



стабильность и время рецикла, был сделан вывод, что MCLEA, приготовленные активированным карбоксилом Fe_3O_4 , являются лучшим методом иммобилизации. Кроме того, при получении нерастворимых агликонов с помощью CLEA невозможно было эффективно отделить продукт от иммобилизованного фермента. Однако MCLEA могли хорошо решить эти проблемы (рис. 5). При гидролизе гликозидов постоянное накопление побочных продуктов, таких как глюкоза, рамноза, ксилоза и глюкуроновая кислота, приводит к торможению реакции [57–60]. Чтобы измерить толерантность AbGUS к глюкуроновой кислоте, мы гидролизовали GL с использованием свободного AbGUS (1 ед.) и MCLEA (1 ед.) при различных концентрациях глюкуроновой кислоты (рис. 6). Даже при наличии 1 мМ глюкуроновой кислоты каталитическая активность свободных AbGUS снижалась почти на 40%, в то время как активность MCLEA почти не менялась. Когда концентрация глюкуроновой кислоты увеличивалась, каталитическая активность свободных AbGUS и MCLEA уменьшалась, но толерантность ферментов к глюкуроновой кислоте после агрегации и спшивки значительно увеличивалась. При 10 мМ глюкуроновой кислоты MCLEA сохраняли 43,2% каталитической активности, тогда как свободные AbGUS теряли 80,5% исходной активности. Побочные продукты глюкозы не ингибируют конкурентно субстрат, занимая активный центр, но ингибируют активность ферментов за счет взаимодействия водородных связей между побочными продуктами глюкозы и поверхностью белка [61–63]. Взаимодействие будет выше при увеличении концентрации глюкуроновой кислоты. MCLEA позволили ферментам агрегировать и образовывать кластеры, уменьшая взаимодействие ферментов и глюкуроновой кислоты. Таким образом, MCLEA приобрели более высокую толерантность к глюкуроновой кислоте, чем свободные AbGUS. Чтобы исследовать механизм повышения стабильности и устойчивости к побочным продуктам иммобилизованных ферментов, мы проанализировали вторичную структуру свободных и иммобилизованных ферментов с помощью рamanовской спектроскопии. Как показано на рис. S8, каждый подпик был получен подбором кривой после деконволюции и получения второго порядка амида.

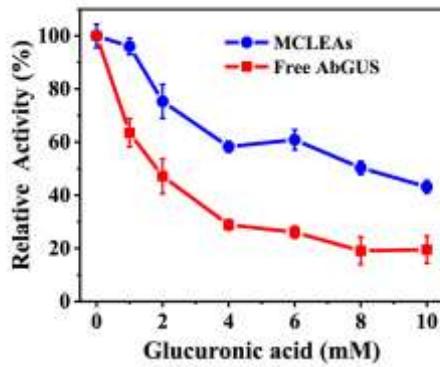


Рис. 6. Толерантность к глюкуроновой кислоте MCLEAs (круг) и Free AbGUS (квадрат). (Для интерпретации ссылок на цвет в легенде к этому рисунку читатель отсылается к веб-версии этой статьи.)



пик полосы пропускания от 1600 см⁻¹ до 1700 см⁻¹. Согласно аппроксимирующей кривой была идентифицирована полоса амида I свободных AbGUS и MCLEA. Из таблицы 3 видно, что содержание α-спиралей в свободном AbGUS составляло около 13,24%, содержание β-листа составляло около 31,75%, а β-виток и случайный завиток составляли 34,37% и 18,24% соответственно. После образования MCLEAs содержание α-спиралей и β-листа AbGUS увеличилось до 15,28% и 35,32%, в то время как случайный завиток AbGUS уменьшился на 6,36% [64,65]. За счет агрегации и спшивания упорядоченная структура белка увеличилась с 43,9% до 50,6%. Большее количество водородных связей в этих двух упорядоченных структурах увеличивает жесткость β-глюкуронидазы, обеспечивая превосходную стабильность фермента после образования MCLEA [66,67]. Более того, при наличии глюкуроновой кислоты у него будет индуцированное конформационное изменение ферментов [61–63,68]. Таким образом, повышение жесткости помогает ферментам сопротивляться конформационному переходу, индуцированному глюкуроновой кислотой. Это также объясняет повышенную толерантность MCLEA к глюкуроновой кислоте по сравнению со свободным AbGUS.

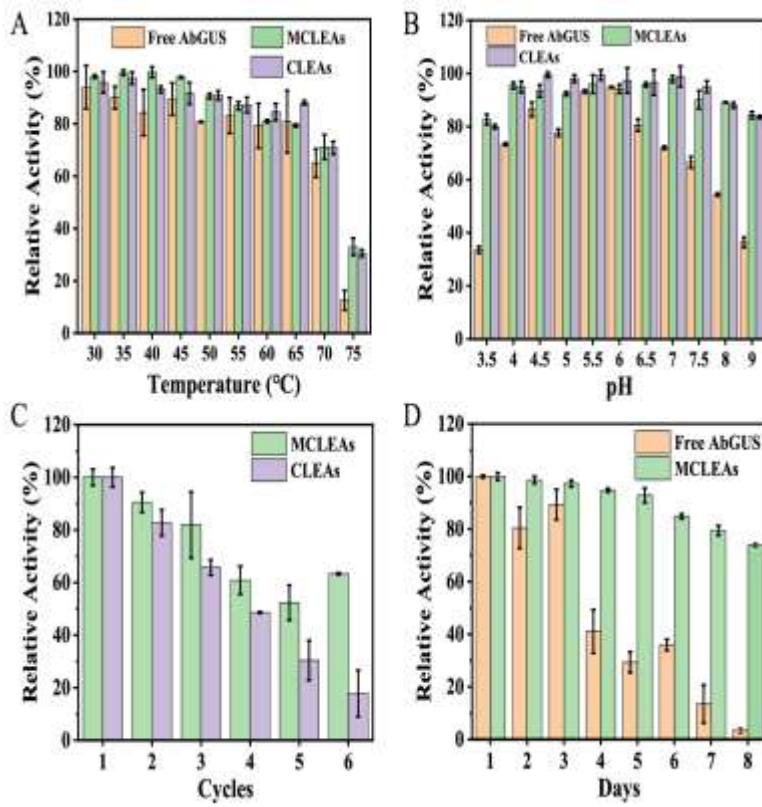


Рис. 5. Оценка стабильности ферментов в различных условиях: Стабильность после инкубации в течение 2 ч при pH от 3,5 до 9,0 (А) и температуре от 30 до 75 °C (Б). (С) Стабильность при длительном хранении при 25 °C в фосфатном буфере (pH 5,0, 20 мМ) в течение 8 дней. (Д) Относительная активность CLEA и MCLEA после 8 циклов.



Table 3 Infrared band positions, band areas fitting via Raman spectroscopy using Peakfit and band assignments in the amidelspectral region of AbGUS and MCLEAs.

Peak	AbGUS				Peak of MCLAs	MCLAs			
	Center/c m ⁻¹	Area	Band identify	content (%)		Center/c m ⁻¹	Area	Band identify	content (%)
1	1606.79	273.0	Side chain	2.4	1	1606.69	82.565	Side chain	4.72
2	1618.168	759.33	P-sheet	31.75	2	1611.481	112.09	P-sheet	35.32
3	1622.916	372.12	P-sheet		3	1618.06	222.11	P-sheet	
4	1627.333	570.39	P-sheet		4	1626.96	124.28	P-sheet	
5	1635.48	1136.4	P-sheet		5	1636.94	159.31	P-sheet	
6	1639.58	772.34	P-sheet		6	1642.85	207.8	Random	11.88
7	1644.154	1164.8	Random	18.24	7	1652.89	186.26	a-spiral	15.28
8	1649.35	909.3	Random		8	1656.74	80.92	a-spiral	
9	1654.98	700.01	a-spiral	13.24	9	1660.03	100.0	P-turn	32.78
10	1659.39	805.3	a-spiral		10	1670.95	140.76	P-turn	
11	1664.36	526.51	b-turn	34.37	11	1674.83	103.16	P-turn	
12	1670.26	774.50	b-turn		12	1683.23	123.03	P-turn	
13	1676.02	561.44	b-turn		13	1691.12	60.911	P-turn	
14	1681.412	656.52	b-turn		14	1695.44	45.50	P-turn	
15	1686.68	382.61	b-turn						
16	1691.751	421.39	b-turn						
17	1696.32	584.8	b-turn						

4. Заключение

В этой статье был разработан вид новых MCLEA на основе карбоксилфункционализированного Fe3O4 для эффективного гидролиза GL с помощью иммобилизованного GUS, отобранного из *Aspergillus bertholletiae*. После формирования MCLEA оптимальная температура иммобилизованного AbGUS увеличилась с 40 °C до 55 °C, и он имел лучшую термическую стабильность, pH и стабильность при хранении. Кроме того, у MCLEA также была отличная возможность повторного использования. Каталитическая активность МКЛЭА оставалась на уровне 63,3%, что в 3,55 раза выше, чем у ХЭЭА. Кроме того, толерантность MCLEA к глюкуроновой кислоте повысилась на 221,5% по сравнению со свободным AbGUS. Анализы рамановской спектроскопии показали, что агрегация и перекрестное связывание увеличили упорядоченную структуру белка, что объясняет значительное повышение стабильности фермента после образования MCLEA и толерантности к глюкуроновой кислоте. Таким образом, сконструированные MCLEA обеспечивают эффективную стратегию иммобилизации ферментов, которая, очевидно, может повысить стабильность и переносимость ферментов. Эти преимущества также могут быть эффективным решением проблемы серьезного ингибирования побочных продуктов при получении ценных агликонов из природных гликозидов.



Вспомогательная Информация

Карта плазмиды, оптимизация иммобилизации, восстановление ферментативной активности, оптимизация концентрации десорбции, другие детали эксперимента.

Заявление об авторском вкладе CRediT

Бин Вэй: Экспериментальный дизайн, Курирование данных, Формальный анализ, Методология, Написание - первоначальный проект. Фанг Лю: сбор данных, методология, написание – обзор и редактирование. Сяоцзе Лю: Формальный анализ, Письмо – обзор и редактирование. Лейю Ченг: методология, написание - обзор и редактирование. Qipeng Yuan: исследование, управление проектом, надзор, проверка, написание - обзор и редактирование. Хуилин Гао: надзор, методология, написание - обзор и редактирование. Хао Лян: Концептуализация, Надзор, Визуализация, Исследование, Управление проектом, Валидация, Написание – обзор и редактирование. Декларация о конкурирующих интересах Авторы заявляют, что у них нет известных конкурирующих финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Благодарность

Авторы выразили признательность за финансовую поддержку Национальной ключевой программы исследований и разработок Китая (2021YFE0103500), Национального фонда естественных наук Китая (21878014 и 22078014) и Хэбэйского ключевого научно-исследовательского проекта (20372508D).

Приложение А. Вспомогательная Информация

Дополнительные данные, связанные с этой статьей, можно найти в онлайн-версии по адресу doi:10.1016/j.colsurfb.2021.112241.

Использованная Литература

1. J. Shi, Y. Wu, S. Zhang, Y. Tian, D. Yang, Z. Jiang, Биоинспирированная конструкция полиферментных катализических систем, Chem. соц. Ред. 47 (2018) 4295–4313.
2. М. Монаджати, С. Борандех, А. Хесами, Д. Мансури, А.М. Тамаддон, Иммобилизация l-аспарагиназы на нанолисте оксида графена, функционализированном аспарагиновой кислотой: исследования кинетики ферментов и стабильности, Chem. англ. Журнал 354 (2018) 1153–1163.
3. Л. Цао, Л.В. Ланген, Р.А. Шелдон, Иммобилизованные ферменты: связанные или свободные от переносчика? Курс. мнение Биотехнолог. 14 (2003) 387–394.
4. С. Захиринежад, Р. Хеммати, А. Хомаи, А. Динари, С. Хоссейнхани, С. Мохаммади, Ф. Вианелло, Наноорганические носители для иммобилизации ферментов: возможности и перспективы, Colloids Surf. B: Biointerfaces 204 (2021), 111774.
5. Y. Lu, J. Zhu, J. Shi, Y. Liu, D. Shao, C. Jiang, Иммобилизованные ферменты из Geotrichum spp. улучшить качество вина, Appl. микробиол. Биотехнолог. 101 (2017) 6637–6649.



6. К. Меллер, М. Шумски, Б. Бушевски, Микроцидостные реакторы с иммобилизованными ферментами — характеристика, разделение, перспективы, Сенсорные актуаторы В: Chem. 244 (2017) 84–106.
- A. Liese, L. Hilterhaus, Оценка иммобилизованных ферментов для промышленного применения, Chem. соц. Rev. 42 (2013) 6236.
7. Е.Д. Юшкова, Е.А. Назарова, А.В. Матюхина, А.О. Носкова, Д.О. Шавронская, В.В. Виноградов, Н.Н. Скворцова, Е.Ф. Кривошапкина, Применение иммобилизованных ферментов в пищевой промышленности, Журн. Пищевая хим. 67 (2019) 11553–11567.
8. А. Бассо, С. Сербан, Промышленное применение иммобилизованных ферментов — обзор, Мол. Катал. 479 (2019), 110607.
9. Д.К. Бедаде, А.Б. Мулей, Р.С. Сингхал, Магнитно-сшитые ферментные агрегаты акриламида из Cupriavidus oxalaticus ICTDB921 для биодеградации акриламида из промышленных сточных вод, Биоресурс. Технол. 272 (2019) 137–145.
10. С. Садехзаде, З. Гобади Неджад, С. Гасеми, М. Хафаджи, С.М. Borghei, Удаление бисфенола А в водном растворе с использованием магнитно-сшитых агрегатов лакказы из Trametes hirsuta, Bioresour. Технол. 306 (2020), 123169.
11. Р.А. Шелдон, Зеленые растворители для устойчивого органического синтеза: современное состояние, Green Chem. 7 (2005) 267–278. Л. Цао, Л. М. ван Ланген, Ф. ван Рантвийк, Р.А. Шелдон, Сшитые агрегаты пенициллинацилазы: надежные катализаторы для синтеза бета-лактамных антибиотиков, J. Mol. Катал. В-энзим. 11 (2001) 665–670.
12. Н.Н. Навави, З. Хашим, Н.Н.А. Манас, Н.И.В. Азели, Р.М. Илиас, Пористые сшитые ферментные агрегаты мальтогенной амилазы из Bacillus lehensis G1: надежный биокатализатор с улучшенной стабильностью и диффузией субстрата, Int. Дж. Биол. макромол. 148 (2020) 1222–1231.
13. H. Li, R. Wang, A. Wang, J. Zhang, Y. Yin, X. Pei, P. Zhang, Быстро и точно сшитые ферменты с использованием биоортогональной химии из клеточного лизата для синтеза (S)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этанол, ACS Sustain. хим. англ. 8 (2020) 6466–6478.
14. Н.Н. Навави, З. Хашим, Р.А. Рахман, А.М.А. Мурад, FDA Бакар, Р.М. Илиас, Захват пористых сшитых ферментных агрегатов мальтогенной амилазы из Bacillus lehensis G1 в альгинат кальция для синтеза мальтоолигосахаридов, Int. Дж. Биол. макромол. 150 (2020) 80–89.
15. Х. Улла, С. Первезд, С. Ахмед, К.С. Haleem, S. Qayyum, Z. Niaz, M.A. Nawaz, F. Nawaz, F. Subhan, I. Tauseef, Получение, характеристика и исследования стабильности сшитых агрегатов а-амилазы (CLAA) для непрерывного разжижения крахмала, Int. Дж. Биол. макромол. 173 (2021) 267–276.
16. Р.А. Шелдон, Р. Шоеваарт, Л. М. Ван Ланген, Сшитые агрегаты ферментов (CLEA): новый и универсальный метод иммобилизации ферментов (обзор), Biocatal. Биотрансформ. 23 (2005) 141–147.



17. К. Гарсия-Галан, А. Беренгер-Мурсия, Р. Фернандес-Лафуэнте, Р.К. Rodrigues, Потенциал различных стратегий иммобилизации ферментов для улучшения производительности ферментов, *Adv. Синтез. Катал.* 353 (2011) 2885–2904.
18. Дж. Боливар, Дж. Рока Мартин, К. Матео, Ф. Кава, Дж. Беренгер, Р. Фернандес-Лафуэнте, Дж. Гисан, Покрытие растворимых и иммобилизованных ферментов ионными полимерами: полная стабилизация четвертичной структуры мультимерных ферментов, *Biomacromolecules* 10 (2009) 742–747.
19. Л. Бетанкор, А. Идальго, Г. Фернандес-Лоренте, К. Матео, В. Родригес, М. Фуэнтес, Ф. Лопес-Гальего, Р. Фернандес-Лафуэнте, Дж. М. Гисан, Использование физико-химических инструментов для определения выбор оптимального ферmenta: стабилизация оксидазы D-аминокислот, *Биотехнолог. прогр.* 19 (2003) 784–788.
20. Л.О. Фархан, В.А. Мехди, Э.М. Таха, А.М. Фархан, А.А. Mehde, М. Ozacar, Различные типы иммобилизации ферmenta изоцитратдегидрогеназы на модифицированных гиалуроновой кислотой магнитных наночастицах в качестве стабильных биокатализаторов, *Int. Дж. Биол. макромол.* 182 (2021) 217–227.
21. К. Мургиондо, А. Местре, Дж.А. Мендес-Литер, М. Нието-Домингес, Л.И. de Eugenio, М. Molina-Gutiérrez, M.J. Martínez, A. Prieto, Ферментативное гликозилирование биоактивных акцепторов, катализируемое иммобилизованной грибковой β -ксилозидазой и ее мультигликолигазным вариантом, *Int. Дж. Биол. макромол.* 167 (2021) 245–254.
22. М. Амарал-Фонсека, В. Копп, Р. Д. Джордано, Р. Фернандес-Лафуэнте, П. В. Тардиоли, Получение магнитно-сшитых агрегатов амилоглюкозидазы: решение некоторых проблем активности, *Катализаторы* 8 (2018).
23. Р.А. Шелдон, CLEA, Combi-CLEA и «умные» магнитные CLEA: биокатализ в биологической экономике, *Catalysts* 9 (2019).
24. С.С. Надар, В.К. Rathod, Магнитные макромолекулярные сшитые ферментные агрегаты (CLEA) глюкоамилазы, *Enzyme Microb. Технол.* 83 (2016) 78–87.
25. К. Гупта, А.К. Яна, С. Кумар, М. Майти, Иммобилизация амилоглюкозидазы из SSF *Aspergillus niger* с помощью сшитого агрегата ферmenta на магнитные наночастицы с использованием минимального количества носителя и характеристик, *J. Mol. Кatal. Б: фермент.* 98 (2013) 30–36.
26. Дж. Дель Арко, А.Р. Алькантара, Р. Фернандес-Лафуэнте, Х. Фернандес-Лукас, Магнитные микро-макробиокатализаторы, применяемые в промышленных биопроцессах, *Биоресурс. Технол.* 322 (2021), 124547.
27. Д.Р. Long, J. Mead, J.M. Hendricks, M.E. Hardy, J.M. Voyich, 18 бета-глицерретиновая кислота ингибирует выживание метициллин-резистентного золотистого стафилококка и ослабляет экспрессию гена вирулентности, *Antimicrob. Агенты Чемотер.* 57 (2013) 241–247.
28. Т.-К. Kao, М.-Х. Шью, Г.-К. Yen, Нейропротекторные эффекты глицерризиновой кислоты и 18 β -глицерретиновой кислоты в клетках PC12 посредством модуляции пути PI3K/Akt, *J. Agr. Пищевая хим.* 57 (2009) 754–761.



29. Л.Н. Ху, Х.Y. Фанг, Х.Л. Лю, З. Гао, Х.Ф. Ву, Ю. Сун, Х.Д. Wu, Q. Xu, Защитное действие 18-бета-глицирретиновой кислоты на индуцированное LPS повреждение эпителиальных клеток кишечника, *Chin. Дж. Нат. Мед.* 11 (2013) 24–29.
30. S. Wang, Y. Shen, R. Qiu, Z. Chen, Z. Chen, W. Chen, 18 β-глицирретиновая кислота проявляет мощное противоопухолевое действие против колоректального рака посредством ингибирования пролиферации и миграции клеток, *Int. Дж. Онкол.* 51 (2017) 615–624.
31. М.М. Брэдфорд, Быстрый и чувствительный метод количественного определения количества белка в микрограммах, использующий принцип связывания белка с красителем, *Anal. Биохим.* 72 (1976) 248–254.
32. Дж. Хе, С. Сунь, З. Чжоу, К. Юань, Ю. Лю, Х. Лян, Термостабильные металлоорганические каркасные наностержни на основе никеля с иммобилизованными ферментами, магниточувствительные, в качестве перерабатываемых биокатализаторов для эффективного биосинтеза S- аденоизилметионин, *Dalton Trans.* 48 (2019) 2077–2085.
33. Г.С.Р. Субба Рао, П. Кондайя, С.К. Сингх, П. Раванан, М.Б. Спорн, Химические модификации природных тритерпенов — глицирретиновой и босвеллиевой кислот: оценка их биологической активности, *Tetrahedron* 64 (2008) 11541–11548.
34. K. Li, J. Wang, Y. He, G. Cui, M.A. Abdulrazaq, Y. Yan, Повышение активности ферментов.
35. H. Wang, S. Han, J. Wang, S. Yu, X. Li, L. Lu, Получение и способность к обесцвечиванию синтетического красителя магнитно-сшитых ферментных агрегатов лакказы из *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bioproc. Биосист. англ.* 44 (2021) 727–735.
36. D. Panwar, GS Kaira, M. Karoor, Сшитые агрегаты ферментов (CLEA) и магнитные нанокомпозиты, привитые CLEA эндо-β-1,4-маннаназы GH26: улучшенная активность, стабильность и возможность повторного использования, *Int. Дж. Биол. макромол.* 105 (2017) 1289–1299.
37. У.-К. Хуанг, В. Ван, К. Сюэ, С. Мао, Эффективная иммобилизация ферментов на композите магнитных хитиновых нановолокон, *ACS Sustain. хим. англ.* 6 (2018) 8118–8124.
38. Р.А. Шелдон, Иммобилизация ферментов: поиск оптимальной производительности, *Adv. Синтез. Катал.* 349 (2007) 1289–1307.
39. Ф.А. Киочо, Ф.М. Ричардс, Ферментативное поведение карбоксипептидазы-А в твердом состоянии*, *Biochemistry* 5 (1966) 4062–4076. [45] I. Migneault, C. Dartiguenave, MJ Bertrand, K.C. Waldron, Глутаровый альдегид: поведение в водном растворе, реакция с белками и применение для ферментативной сшивки, *Biotechniques* 37 (2004) 790.
40. G. Cheng, Z. Pi, Z. Zheng, S. Liu, Z. Liu, F. Сонг, Микрореактор лактатдегидрогеназы на основе магнитных наночастиц как инструмент для разработки лекарств для быстрого скрининга ингибиторов из натуральных продуктов, *Talanta* 209 (2020), 120554.
41. SV Отари, С.К.С. Патель, В.К. Калия, Дж.К. Ли, Одностадийный гидротермальный синтез магнитной рисовой соломы для эффективной иммобилизации липазы и ее применение в реакции этерификации, *Биоресурс. Технол.* 302 (2020).



42. Б.С. Айтар, У. Бакир, Получение агрегатов сшитой тирозиназы, *Process Biochem.* 43 (2008) 125–131.
43. К. Сангита, Т. Эмилия Абрахам, Получение и характеристика агрегатов поперечно-сшитых ферментов (CLEA) субтилизина для применения с контролируемым высвобождением, *Int. Дж. Биол. макромол.* 43 (2008) 314–319.
44. В. Wei, H. Xu, L. Cheng, Q. Yuan, C. Liu, H. Gao, H. Liang, Высокоселективное улавливание меченых гистами ферментов на суперпарамагнитных MOF на основе циркония с надежной возобновляемостью для повышения pH и термическая стабильность, *ACS Biomater. науч. англ.* 7 (2021) 3727–3736. М. Ройваран, А. Тахери-Кафрани, А. Ландарани Исфахани, С. Мохаммади, Функционализированный суперпарамагнитный нанолист оксида графена в ферментной инженерии: высокодисперсный, стабильный и надежный биокатализатор, *Chem. англ. Журнал* 288 (2016) 414–422.
45. И. Полатогку, Л. Айдин, Новая стратегия проектирования со стохастической оптимизацией при подготовке агрегатов тирозиназы, сшитой магнетитом (MCLTA), *Process Biochem.* 99 (2020) 131–138.
46. Ф. Лопес-Гальего, Л. Бетанкор, А. Идалго, К. Матео, Дж. М. Гисан, Р. Фернандес-Лафуэнте, Оптимизация промышленного биокатализатора глутарилазы: стабилизация фермента многоточечное ковалентное присоединение к новым амино-эпоксидным гранулам Sepabeads, *J. Biotechnol.* 111 (2004) 219–227.
47. К. Матео, Г. Фернандес-Лоренте, О. Абиан, Р. Фернандес-Лафуэнте, Дж. М. Гисан, Многофункциональные эпоксидные носители: новый инструмент для улучшения ковалентной иммобилизации белков. Промотирование физической адсорбции белков на носителях до их ковалентного связывания, *Biomacromolecules* 1 (2000) 739–745.
48. X. Ma, Y. Jiang, J. Wen, Y. Zhao, J. Zeng, Y. Guo, Всесторонний обзор натуральных продуктов для борьбы с фиброзом печени: алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, кумарины и другие соединения, *Eur. . Дж. Фармакол.* 888 (2020), 173578.
49. M. Primožic, G. Kravanja, Z. Knez, A. Crnjac, M. Leitgeb, Иммобилизованная лакказа в форме (магнитных) сшитых агрегатов ферментов для устойчивого диклофенака (био) деградация, *Дж. Клин. Произв.* 275 (2020), 124121.
50. В. Рани, С. Даш, Л. Наин, А. Арора, Экспрессия новой толерантной к глюкозе β -глюкозидазы на клеточной поверхности с помощью изолята *Rhodotorula glutinis*, *Biocatal. Агр. Биотехнолог.* 4 (2015) 380–387.
51. Ю.-Р. Инь, П. Санг, В.-Д. Сиань, С. Ли, Ж.-Ю. Jiao, L. Liu, WN Hozzein, M. Xiao, W.-J. Li, Экспрессия и характеристики двух толерантных к глюкозе бета-глюкозидаз GH1 из *Actinomadura amyloytica* YIM 77502(T) для стимуляции деградации целлюлозы, *Front. микробиол.* 9 (2018) 3149.
52. Н. Борзова, О. Гудзенко, Л. Варбанец, Очистка и характеристика нарингиназы из *Cryptococcus albidus*, *Appl. Биохим. Биотехнолог.* 184 (2018) 953–969.



53. М. Бодрексл, У.Х. Шварц, В.В. Зверлов, В. Либл, Биохимическая характеристика четырех рамнозидаз из термофильных бактерий родов *Thermotoga*, *Caldicellulosiruptor* и *Thermoclostridium*, *Sci. Rep.* 9 (2019) 15924.
54. Б. Манна, А. Гош, Молекулярное понимание индуцированных глюкозой конформационных изменений для исследования неконкурентного ингибирования бета-глюказидазы GH1, *ACS Sustain. хим.* англ. 9 (2021) 1613–1624.
55. С. Госвами, С. Дас, С. Датта, Понимание роли остатков вокруг туннеля активного центра в создании толерантной к глюкозе β -глюказидазы из *Agrobacterium tumefaciens* 5A, *Protein Eng., Des. Sel.* 30 (2017) 523–530.
56. С. Госвами, Н. Гупта, С. Датта, Использование реакции, катализируемой бета-глюказидазой