

УДК 66.094.3.098  
AGRIS P33

<https://doi.org/10.33619/2414-2948/60/01>

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ  
И АКТИВНОСТИ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ  
КОМПЛЕКСА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ**

©**Лакина Н. В.**, ORCID: 0000-0002-7293-8781, SPIN-код: 3871-7341, канд. хим. наук, Тверской государственной технической университет, г. Тверь, Россия, [lakina@yandex.ru](mailto:lakina@yandex.ru)

©**Долуда В. Ю.**, ORCID: 0000-0002-2865-9945, SPIN-код: 8836-6137, канд. хим. наук, Тверской государственной технической университет г. Тверь, Россия, [doludav@yandex.ru](mailto:doludav@yandex.ru)

©**Рабинович Г. Ю.**, ORCID: 0000-0002-5060-6241, SPIN-код: 1437-3617, д-р биол. наук, Всероссийский НИИ мелиорированных земель, п. Эммаусс, Россия, [vniimz@list.ru](mailto:vniimz@list.ru)

©**Лакина М. Е.**, Тверской государственной технической университет, г. Тверь, Россия, [marusalew15@yandex.ru](mailto:marusalew15@yandex.ru)

©**Сивенок А. М.**, Тверской государственной технической университет, г. Тверь, Россия, [webbok1997@gmail.com](mailto:webbok1997@gmail.com)

**PHYSICAL AND CHEMICAL STUDY OF THE STRUCTURE AND ACTIVITY  
OF BIOPOLYMER MATRICES BASED ON A COMPLEX OF REDOX ENZYMES**

©**Lakina N.**, ORCID: 0000-0002-7293-8781, SPIN-code: 3871-7341, Ph.D., Tver State Technical University, Tver, Russia, [lakina@yandex.ru](mailto:lakina@yandex.ru)

©**Doluda V.**, ORCID: 0000-0002-2865-9945, SPIN-code: 8836-6137, Ph.D., Tver State Technical University, Tver, Russia, [doludav@yandex.ru](mailto:doludav@yandex.ru)

©**Rabinovich G.**, ORCID: 0000-0002-5060-6241, SPIN-code: 1437-3617, Dr. habil., All-Russian Research Institute of Reclaimed Lands, Emmaus, Russia, [vniimz@list.ru](mailto:vniimz@list.ru)

©**Lakina M.**, Tver State Technical University, Tver, Russia, [marusalew15@yandex.ru](mailto:marusalew15@yandex.ru)

©**Sivenok A.**, Tver State Technical University, Tver, Russia, [webbok1997@gmail.com](mailto:webbok1997@gmail.com)

*Аннотация.* В работе представлены экспериментальные результаты по эффективному способу применения комплекса окислительно-восстановительных ферментов класса оксидоредуктаз: глюкооксидазы (КФ 1.1.3.4) и пероксидазы (КФ 1.11.1.7). Приведены литературные данные, подтверждающие увеличение потенциала окислительно-восстановительной реакции при дополнительном введении пероксидазы, разлагающей пероксид водорода в ходе реакции, используемой при получении биотопливных элементов. Комплекс ферментов был включен в полимерные матрицы поливинилпирролидона и ацетилцеллюлозы, обладающие большим количеством функциональных групп, таких как амидные, гидроксильные, карбоксильные, способные образовывать прочные ковалентные связи с ферментами, а также высокой сорбционной емкостью к белкам. В работе приведена сравнительная характеристика активностей биополимерных комплексов. Данные ИК-Фурье спектроскопии доказывают образование прочных ковалентных связей между функциональными группами ферментов и применяемой матрицей.

*Abstract.* The paper presents experimental results on an effective method of using a complex of redox enzymes of the oxidoreductase class: glucooxidase (CF 1.1.3.4) and peroxidase

(CF 1.11.1.7). Literature data confirming an increase in the potential of the redox reaction with the additional introduction of peroxidase, which decomposes hydrogen peroxide during the reaction used in the production of biofuel elements, are presented. The enzyme complex was included in polymer matrices of polyvinylpyrrolidone and acetylcellulose, which have a large number of functional groups, such as amide, hydroxyl, and carboxyl, capable of forming strong covalent bonds with enzymes, as well as a high sorption capacity to proteins. The paper presents a comparative characteristic of the activities of biopolymer complexes. The data of the Fourier-IR spectroscopy prove the formation of strong covalent bonds between the functional groups of enzymes and the matrix used.

*Ключевые слова:* окислительно-восстановительные ферменты, полимерная матрица, ИК-Фурье спектроскопия, биопроводящие материалы.

*Keywords:* redox enzymes, polymer matrix, Fourier-IR spectroscopy, bio-conducting materials.

### *Введение*

Создание высокоэффективных и стабильных ферментных систем является одним из главных направлений современной биотехнологии, основанной на катализе с применением биопроводящих материалов. К таким материалам относятся синтетические полимерные материалы. Такие материалы получают путем химической полимеризации с использованием различных мономеров. Как своего рода важный носитель, синтетические полимерные материалы проявляют преимущества хорошей механической жесткости, высокой удельной поверхности, легко меняют свои поверхностные характеристики и их потенциал для приведения конкретной функциональной группы в соответствие с реальными потребностями. Таким образом, они были широко исследованы и использованы для иммобилизации ферментов. Носители, которые имеют большую площадь поверхности, всегда помогают провести успешную иммобилизацию фермента. Например, макропористые полиакриламидные (РАМ) микросферы, имеющие большую площадь поверхности, синтезировали методом Lei и Jiang с помощью обратной суспензионной полимеризации [1].

Включение фермента в органическую или неорганическую капсулу, которая представляет собой полупроницаемую мембрану (Рисунок 1).

При иммобилизации ферментов с помощью ковалентного связывания молекула фермента ковалентно связывается с нерастворимым полимером. Полимер может быть в виде порошка или в форме пленки. Иногда молекулы фермента соединяются ковалентными связями друг с другом или с каким-либо инертным белком; при этом образуется нерастворимый, но активный полимерный фермент (Рисунок 2).

Необходимо отметить, что иммобилизацию следует проводить с образованием химической связи в мягких условиях, потому что интенсивные условия реакции могут разрушить активную конформацию фермента. Авторы работ [2] синтезировали ряд мезопористых и гидрофильных бисерных носителей, содержащих эпоксидные группы. Их применяли для иммобилизации глюкоамилазы путем образования ковалентной связи между эпоксидными группами и ферментами. Удельная активность достигала 86%, иммобилизованные глюкоамилазы показали лучшую стабильность и многократность в использовании, чем у свободных. Обездвиживанием энзима методом ковалентного связывания можно прочно соединить фермент с носителем и избежать его потери в процессе

реакции. Однако, недостатком этого метода является нарушение активной конформации фермента во время реакции иммобилизации, многоточечного прикрепления к опорам приводит к стерическим затруднениям фермента при координации с субстратом, а также к перекрестной сшивке функциональных групп фермента.

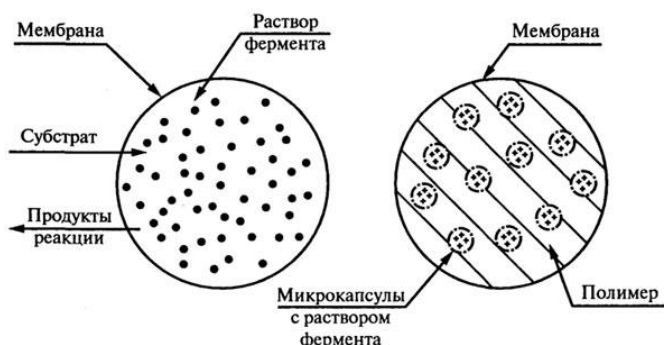


Рисунок 1. Получение микрокапсул.

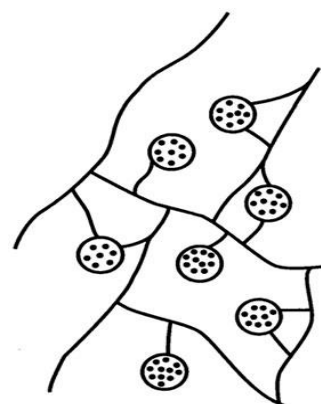


Рисунок 2. Ковалентное связывание.

Иммобилизация фермента на носителях с помощью поперечной сшивки функциональных групп, является хорошим способом избежать стерических затруднений и повысить активность фермента. Этот тип иммобилизации образует промежуточный фрагмент между ферментом и носителем с помощью бифункционального реагента, такого как глутаровый диальдегид или изоцианат. С введением гибкой распорной рукоятки на опорах, энзим может растягиваться и улавливать субстрат более легко. Авторы работы [3] сообщили, что  $\beta$ -глюкозидаза и трипсин, иммобилизованные на носителях через полиэтиленимин, которые действуют в качестве распорного рычага, проявляют повышенную активность по сравнению с соответствующими носителями без поперечной сшивки. В этом способе необходимо избегать взаимодействия реагента с активным центром фермента и ингибирования последнего (Рисунок 3).

Многие исследования показали, что промежуточный фрагмент между ферментом и носителем помогает удалять фермент с поверхности носителя и предотвращать нежелательное боковое прикрепление между молекулами фермента и модифицирующим агентом. Этот метод иммобилизации способствует сохранению активности иммобилизованного фермента и улучшает его производительность.

Авторы работ [4–5] представляют результаты исследований по иммобилизации фермента путем включения в полимер. В этом способе фермент не прикреплен к полимеру, но удерживается внутри него, поскольку последний образует вокруг фермента сетчатую матрицу (Рисунок 4).

Ячейки этой матрицы настолько малы, что молекула фермента не может освободиться из сети, но в то же время достаточно велики для проникновения низкомолекулярных субстратов. Иммобилизация ферментов в полимерных гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя. Все гели обладают высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью, благодаря чему обеспечивается возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру [6].

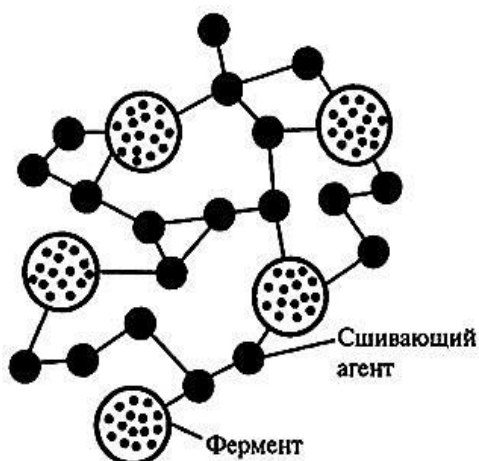


Рисунок 3. Поперечное сшивание молекул фермента.

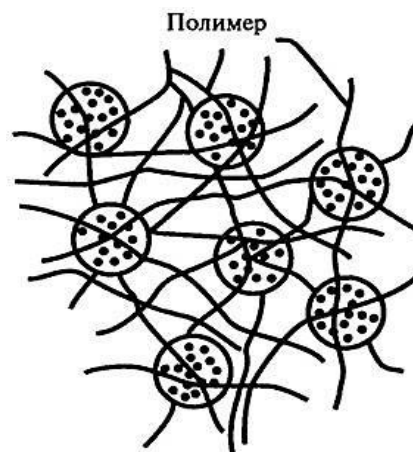


Рисунок 4. Включение в полимер.

Амперометрическая детекция широко применяется на практике благодаря своей простоте, высокой чувствительности и широкому линейному диапазону определения. Принцип работы первых амперометрических биосенсоров был основан на детекции снижения концентрации субстратов или увеличения концентрации продуктов ферментативной реакции («биосенсоры первого поколения»). Примером для данного типа биосенсоров может служить сенсор на основе глюкозооксидазы. В этом случае субстратом является  $O_2$ , а продуктом реакции —  $H_2O_2$ . Детекция при этом проводится по току восстановления на электроде образующегося  $H_2O_2$ . Существенными недостатками данного биосенсора являются:

- низкая растворимость  $O_2$ ,
- связанные с этим диффузионные ограничения,
- плохая воспроизводимость,
- необходимость прикладывать большой потенциал (это приводит к протеканию различных побочных окислительно-восстановительных процессов) [4].

Введение в анализируемую смесь различных молекул-медиаторов, которые участвуют в переносе электронов между активным центром фермента и электродом, позволяет существенно снизить значение рабочего потенциала. Биосенсоры, в работе которых используется медиаторный перенос электронов, получили название «биосенсоров второго поколения». Соединения, выполняющие роль медиаторов, должны удовлетворять ряду условий: их окисление и восстановление должно быть обратимым, окисленная и восстановленная формы должны быть стабильны, окислительно-восстановительный потенциал должен быть сопоставим с ферментативной реакцией. Кроме того, медиатор не должен быть токсичным.

Главным недостатком использования медиаторов является их «вымывание» из реакционной смеси при многократном использовании биосенсора или при хранении, что приводит к ухудшению характеристик биосенсора [5].

#### *Методика проведения эксперимента*

Синтез полимерных матриц поливинилпирролидона и ацетилцеллюлозы, а также дальнейшую иммобилизацию комплекса ферментов проводили по методике, представленной в работе [7].

Реакционная смесь содержала 0,36 мМ ABTS и 5 мМ D-глюкозы в случае изучения

ферментного комплекса) в 0,1 М Na-ацетатном буфере. Скорость реакции определяли по изменению поглощения при 405 нм, используя коэффициент экстинкции окисленного ABTS  $36,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Измерения проводили спектрофотометрическим методом с помощью спектрофотометра UV/VIS Excellence.

Для определения активности полученного ферментативного комплекса по ABTS при варьировании pH от 3,05 до 8,45 проводили разбавление ABTS в пределах концентраций  $0,87\text{--}3,47 \times 10^{-3}$  моль/л. Для этого отбирали 1 мл раствора ABTS и добавляют 2 мл ацетатного буфера. Затем методом последовательного разбавления готовили разведения. После этого в каждую пробирку добавляли 1 мл раствора комплекса ферментов GOX:HRP. Непосредственно перед началом измерения оптической плотности вносили в кювету (толщина кюветы 1 см) 1 мл раствора D-глюкозы 0,026 моль/л.

Для измерения оптической плотности исследуемых растворов использовался спектрофотометр UV/VIS Excellence — универсальный прибор с превосходными характеристиками. Он предназначен для измерения поглощения и пропускания в ультрафиолетовом (UV) и видимом (VIS) диапазонах (от 190 до 1100 нм). В спектрофотометре применяется технология FastTrack на основе современных компонентов, таких как диодно-матричный детектор.

Для исследования активности (выраженную через константу Михаэлиса (Km) иммобилизованных пероксидазы и глюкооксидазы были исследованы образцы:

- 1) нативного комплекса пероксидазы и глюкооксидазы (HRP/GOx),
- 2) ферментативный комплекс, иммобилизованный на модифицированную хитозаном полимерную матрицу поливинилпирролидона с помощью глутарового диальдегида (ПВП/Хит/Glu/HRP/GOx),
- 3) комплекс пероксидазы и глюкооксидазы, иммобилизованной на модифицированную хитозаном полимерную матрицу ацетилцеллюлозы с помощью глутарового диальдегида (АЦТ/Хит/Glu/HRP/GOx).

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

### *Результаты и их обсуждение*

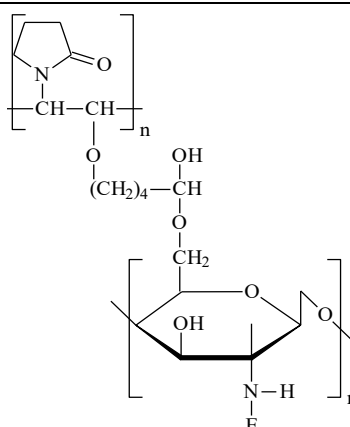
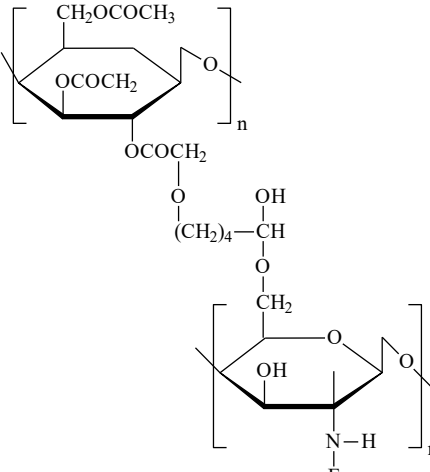
Огромное разнообразие доступных синтетических полимеров обеспечило их широкое использование в качестве носителей для иммобилизации ферментов. Вводя в полимерные молекулы различные функциональные группы, можно в широких пределах варьировать физические свойства носителя и создаваемое им микроокружение для иммобилизованных молекул фермента. Синтетические полимеры применяются как для ковалентной иммобилизации ферментов, так и для сорбционной, для получения гелей, микрокапсул. В настоящей работе были исследованы два типа полимерных носителей: гидрогеля поливинилпирролидона, растворенной в ацетоне ацетилцеллюлозы. Оба носителя модифицировались раствором хитозана, для получения в структуре полимерной сетке носителей аминогрупп. Последовательная обработка полимерных носителей с различными характеристиками размеров пор, доступной площади поверхности, для иммобилизации



ферментного комплекса HRP/GOx была необходима для образования прочных ковалентных связей ферментов с носителем. В Таблице представлены полученные расчетные данные  $K_m$ , коррелирующие со степенью фиксации ферментного комплекса на модифицированных поверхностях ПВП и АЦТ.

Таблица.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ АКТИВНОСТЕЙ БИОПОЛИМЕРОВ ОТ ИХ СТРУКТУРЫ И СТЕПЕНИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА

Вид ферментного комплекса	Структурная формула полимерного носителя	$K_m$ , ммоль/л	Степень иммобилизации ферментного комплекса, %
HRP/GOx	—	12,1	—
ПВП/Хит/ HRP/GOx		10,3	64,2
ПВП/Хит/Glu/HRP/GOx		14,4	68,1
АЦТ/Хит/ HRP/GOx		15,2	58,3
АЦТ/Хит/ Glu/HRP/GOx		16,3	62,8

Представленные данные Таблицы показывают, что наибольшая степень иммобилизации наблюдается при использовании в качестве полимерного носителя гидрогеля ПВП, модифицированного аминогруппами хитозана. Этот факт можно объяснить наибольшим количеством доступных аминогрупп для ковалентной связи с карбоксильными группами ферментного комплекса. Необходимо добавить, что и адсорбционная емкость, положительный заряд поверхности гидрогеля являются эффективными характеристиками при использовании такой полимерной матрицы в качестве носителя при иммобилизации ферментов. Однако, подобными характеристиками обладает и матрица ацетилцеллюлозы. Наименьшая степень иммобилизации ферментного комплекса на ацетилцеллюлозе может

быть объяснена количеством доступных мезопор, для эффективной фиксации ферментных глобул. Сшивающий агент глутаровый диальдегид успешно применен в данной работе, так как результаты указывают на увеличении степени иммобилизации при его использовании. Снижение активности может быть объяснено вымыванием фермента с поверхности носителя.

Таким образом, полученные данные показывают, что в результате прочного связывания ферментных глобул с модифицированным полимерным носителем, нативная конформация ферментов не претерпевает сильных изменений и денатурация белковых молекул затрудняется. К достоинствам носителей на основе поливинилового спирта следует отнести, помимо высокого содержания реакционноспособных групп, большую вместимость по отношению к белкам.

Данные Таблицы показывают, что применение глутарового диальдегида приводит к уменьшению ферментного комплекса, но, в тоже время увеличивается степень иммобилизации ферментов. В перспективе, при нанесении такого комплекса ферментов на биоэлектроды, это явление может послужить повышению их эффективности и чувствительности.

Для изучения образования ковалентных связей ферментного комплекса с носителями проводили исследование с помощью метода ИК-Фурье спектроскопии диффузного отражения. Изучение структуры многокомпонентных биополимерных образцов проводилось с использованием ИК-Фурье спектрофотометра IR Prestige 21, снабженного приставкой диффузного отражения, позволяющая анализировать неоднородные образцы с высокой точностью в спектральном диапазоне  $7800\text{--}350\text{ см}^{-1}$ . В качестве фонового спектра применяли спектр образца в виде порошка KBr, измельченного до фракции менее 2 мкм. Программное обеспечение IR Solution автоматически распознает используемые приставки с включением меню параметров измерений и соответствует требованиям GLP/ GMP, FDA 21 САР Part 11 и ISO 9000. При более детальном изучении характера связи ферментов с модифицированным носителем были дополнительно построены сравнительные графики на каждой стадии его модификации (Рисунки 5–6).

ИК-Фурье спектры образца на основе поливинилпирролидона (Рисунок 1) содержат характерные полосы поглощения для индольного кольца NH индола и полосы поглощения сложноэфирных группировок  $-(\text{COO})^-$  в области  $2400\text{ см}^{-1}$  и в области  $1350\text{ см}^{-1}$ . Также отчетливо проявляются валентные колебания C–O–C ацетоксигрупп в области  $1240$  и  $1032\text{ см}^{-1}$ , входящие в состав химической структуры комплекса ПВП и хитозана.

ИК-спектр образца биополимерного комплекса ПВП/Хит/Glu/HRP/GOx содержит полосы поглощения в области  $1600\text{--}1550\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует об образовании азометиновой связи  $\text{C}=\text{N}$  между ферментом и сшивающим агентом — глутаровым диальдегидом. ИК-спектр биополимерного образца до обработки ферментным комплексом HRP/GOx (ПВП/Хит/Glu) содержит колебания в области  $1360\text{--}1260\text{ см}^{-1}$ ,  $1700\text{--}1740\text{ см}^{-1}$  и  $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ . Это свидетельствует о наличии свободной альдегидной группы глутарового диальдегида, а в образце, содержащем иммобилизованные ферменты (ПВП/Хит/Glu/HRP/GOx) такие пики отсутствуют. Также, наблюдается исчезновение дублетного пика в области  $2900\text{--}2860\text{ см}^{-1}$ , характеризующего присутствие альдегидной группы глутарового диальдегида и образование ковалентной связи между альдегидной группой глутарового диальдегида и аминокруппами фермента.

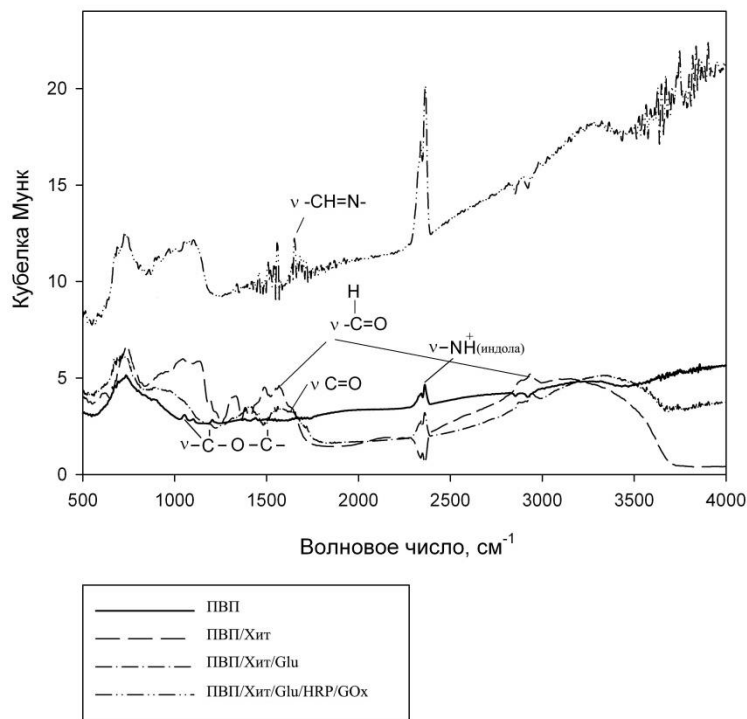


Рисунок 5. ИК-Фурье спектры образцов биоплимерных комплексов на основе поливинилпирролидона.

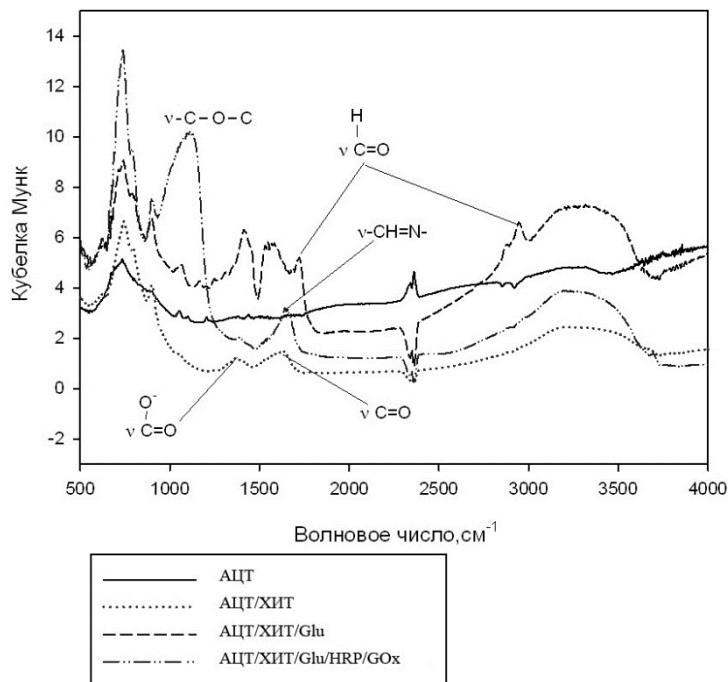


Рисунок 6. ИК-Фурье спектры образцов биоплимерных комплексов на основе ацетилцеллюлозы.

На Рисунке 6 представлены ИК-спектры образцов на основе ацетилцеллюлозы, модифицированной хитозаном и глутаровым альдегидом содержат характерные полосы поглощения для валентных колебаний ацетилцеллюлозного кольца:  $1150-1030\text{ см}^{-1}$



колебания C–O–C, полоса типа 2 проявляется в спектре целлюлозного кольца, имеющего  $\beta$ -1,4 связи. В дальнейшем такие характеристические полосы смещаются в сторону образования полос поглощения характерных для появления ковалентных связей большого числа гидроксильных групп и ацетальдегидной группы сложноэфирных группировок с карбоксильными группами ферментов и модифицирующих агентов.

На наличие свободных OH-групп на поверхности АЦТ свидетельствуют следующие полосы поглощения: полосы поглощения в областях  $3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ ,  $3600\text{--}3500\text{ см}^{-1}$  и  $1200\text{--}1040\text{ см}^{-1}$ , валентные колебания карбоксильной группы  $\text{--C=O}$ , наблюдаемые при  $1650\text{--}1600\text{ см}^{-1}$  и полоса поглощения карбоксилат-иона при  $1450\text{--}1380\text{ см}^{-1}$ , а колебания в области  $1500\text{--}1400\text{ см}^{-1}$  и  $1100\text{--}1045\text{ см}^{-1}$  характерны для групп  $\text{--CH}_2\text{--}$ , для альдегидной группы в областях  $1740\text{--}1720\text{ см}^{-1}$  и  $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ , выше перечисленное доказывает наличие ковалентной связи между альдегидными группами сшивающего агента со свободными OH-группами полимерной подложки, находящимися на поверхности АЦТ.

ИК-спектр образца АЦТ/Хит/Glu/HRP/GOx содержит полосы поглощения в областях  $3500\text{--}3300\text{ см}^{-1}$ ,  $1150\text{--}1050\text{ см}^{-1}$ , вызванные, соответственно, валентными и деформационными колебаниями  $\text{--NH}_2$  групп комплекса ферментов. Полосы поглощения в области  $1670\text{--}1650\text{ см}^{-1}$  и  $3300\text{--}3080\text{ см}^{-1}$  свидетельствуют о пептидных связях  $\text{--NH--CO--}$  фермента липазы, находящейся на поверхности модифицированных магнитных наночастиц. Появление полосы поглощения в области  $1650\text{--}1550\text{ см}^{-1}$  доказывает образование азометиновой связи  $\text{C=N}$  между ферментом и сшивающим агентом — глутаровым диальдегидом. Также наблюдается исчезновение дублетного пика в области  $3000\text{--}2870\text{ см}^{-1}$ , характеризующего присутствие альдегидной группы, что свидетельствует о ковалентной азометиновой связи глутарового диальдегида с аминогруппами фермента.

### Выводы

Активность исследуемых ферментных комплексов, выраженная константой Михаэлиса  $K_m$ , достаточна высока у всех образцов биополимеров. Данный факт свидетельствует о наличии доступных активных центров ферментов, обладающих высоким сродством к молекулам субстратов D-глюкозы и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в реакции окисления.

По сравнению с образцами, содержащими немодифицированные полимерные носители, ПВП/Хит/Glu/HRP/GOx и АЦТ/Хит/Glu/HRP/GOx содержат полосы поглощения в области  $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$  за счет валентных колебаний C–H-связи; пик при  $1092\text{ см}^{-1}$ , обусловленный вибрацией растяжения C–N-связи; колебание вблизи  $1045\text{ см}^{-1}$  отвечает валентным колебаниям Si–O-связи; колебания при  $850\text{--}780\text{ см}^{-1}$ ,  $1600\text{--}1540\text{ см}^{-1}$ ,  $3200\text{--}3000\text{ см}^{-1}$  обусловлены наличием  $\text{--NH}_2$  группы.

Таким образом, можно сказать, что фермент был ковалентно иммобилизован на поверхность АЦТ, однако в меньшем количестве по сравнению с носителем на основе ПВП, что подтверждается данными по кинетическим расчетам.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-08-00186).*

### Список литературы:

1. Isgrove F. H., Williams R. J. H., Niven G. W., Andrews A. T. Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support // Enzyme and microbial technology. 2001. V. 28. №2-3. P. 225-232. <https://doi.org/10.1016/S0141->

0229(00)00312-4

2. Busto M. D., Ortega N., Perez-Mateos M. Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal  $\beta$ -d-glucosidase // *Process Biochemistry*. 1997. V. 32. №5. P. 441-449. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00104-5)

3. Scouten W. H. Immobilization techniques of Enzyme Coupling Techniques // Academic, New York. 2017. V. 2. P. 30-65.

4. Toher J., Kelly A. M., Bickerstaff G. F. Stability properties of two supports for immobilization of enzymes // *Biochemical Society transactions*. 1990. V. 18. №2. P. 313-314. <https://doi.org/10.1042/bst0180313>

5. Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015. V. 29. №2. P. 205-220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

6. Severin K. Buchbesprechung: Molecularly Imprinted Polymers. Man-Made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry V. 23). Herausgegeben von Börje Sellergren // *Angewandte Chemie*. 2002. V. 114. №6. P. 1116-1116. [https://doi.org/10.1002/1521-3757\(20020315\)114:6<1116::AID-ANGE1116>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3757(20020315)114:6<1116::AID-ANGE1116>3.0.CO;2-7)

7. Лакина Н. В., Долуда В. Ю., Рабинович Г. Ю., Лыса В. А., Паздерина Д. А. Изучение активности полимерно-ферментных комплексов на основе пероксидазы // *Бюллетень науки и практики*. 2019. Т. 5. №12. С. 54-60. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/06>

#### References:

1. Isgrove, F. H., Williams, R. J. H., Niven, G. W., & Andrews, A. T. (2001). Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. *Enzyme and microbial technology*, 28(2-3), 225-232. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00312-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00312-4)

2. Busto, M. D., Ortega, N., & Perez-Mateos, M. (1997). Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal  $\beta$ -d-glucosidase. *Process Biochemistry*, 32(5), 441-449. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00104-5)

3. Scouten, W. H. (2017). Immobilization techniques of Enzyme Coupling Techniques. *Academic, New York*, 2, 30-65.

4. Toher, J., Kelly, A. M., & Bickerstaff, G. F. (1990). Stability properties of two supports for immobilization of enzymes. *Biochemical Society transactions*, 18(2), 313-314. <https://doi.org/10.1042/bst0180313>

5. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

6. Severin, K. (2002). Buchbesprechung: Molecularly Imprinted Polymers. Man-Made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry. (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry - Vol. 23). Herausgegeben von Börje Sellergren. *Angewandte Chemie*, 114(6), 1116-1116. [https://doi.org/10.1002/1521-3757\(20020315\)114:6<1116::AID-ANGE1116>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3757(20020315)114:6<1116::AID-ANGE1116>3.0.CO;2-7)

7. Lakina, N., Doluda, V., Rabinovich, G., Lisa, V., & Pazderina, D. (2019). To study the Activity of the Polymer-enzyme Complexes on the Basis of Peroxidase. *Bulletin of Science and Practice*, 5(12), 54-60. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/06>

*Работа поступила  
в редакцию 18.10.2020 г.*

*Принята к публикации  
22.10.2020 г.*

*Ссылка для цитирования:*

Лакина Н. В., Долуда В. Ю., Рабинович Г. Ю., Лакина М. Е., Сивенок А. М. Физико-химическое исследование структуры и активности биополимерных матриц на основе комплекса окислительно-восстановительных ферментов // Бюллетень науки и практики. 2020. Т. 6. №11. С. 12-22. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/60/01>

*Cite as (APA):*

Lakina, N., Doluda, V., Rabinovich, G., Lakina, M., & Sivenok, A. (2020). Physical and Chemical Study of the Structure and Activity of Biopolymer Matrices Based on a Complex of Redox Enzymes. *Bulletin of Science and Practice*, 6(11), 12-22. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/60/01>