

УДК 577.15  
DOI 10.26456/vtchem2025.4.17

## ПОЛУЧЕНИЕ ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КАСКАДНЫХ РЕАКЦИЙ

О.В. Гребенникова, А.М. Сульман

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь

В последнее время возрастает актуальность более экологичного и устойчивого альтернативного способа производства химических веществ и биопродуктов. Поэтому, каскадные реакции могут быть весьма многообещающим подходом в этом направлении, устранив традиционный пошаговый синтез. При использовании мультиферментных систем в каскадных реакциях происходит локальное концентрирование субстрата вокруг второго и всех последующих ферментов, которые входят в систему. Такие системы особенно привлекательны, поскольку многие коммерчески доступные ферменты работают в относительно схожих условиях окружающей среды (например, pH и температура). Это позволяет работать с несколькими ферментами в одном реакторе. В данной работе описываются некоторые виды мультиферментных систем с использованием различных ферментов, таких как, например, целлюлаза, пероксидаза, глюкозооксидаза и др. Описаны различные способы иммобилизации нескольких ферментов на одном носителе для получения глюконовой кислоты и ее производных. Приведены примеры переработки целлюлозосодержащего сырья с использованием мультиферментных систем.

**Ключевые слова:** каскадные реакции, иммобилизация, мультиферментные системы, глюконовая кислота.

В настоящее время ферменты используются в целлюлозно-бумажном производстве, химической, косметической, фармацевтической, биотехнологической и пищевой промышленностях. Биокаталитический синтез различных важнейших химических соединений является устойчивой альтернативой традиционному химическому катализу, включая органо- или металлокатализ [1]. Для получения некоторых сложных соединений ученые часто применяют ферментные каскадные реакции, представляющие собой последовательность нескольких химических превращений, в результате которых синтезируются новые химические связи. Биокаталитические каскады работают в относительно схожих условиях окружающей среды (например, pH и температура) и не требуют добавления других реагентов

или катализаторов [2]. Преимущества такого подхода заключаются в преодолении проблем, связанных с появлением промежуточных ингибирующих продуктов, смещения неблагоприятных равновесий реакции и уменьшения количества этапов реакции и единичных операций, поскольку не требуется извлечение промежуточных продуктов [3]. Таким образом, можно достичь гораздо более высоких выходов и, следовательно, более низких затрат и отходов по сравнению с классическим пошаговым синтезом [4].

Приготовление ферментных комплексов может быть осуществлено с помощью совместной иммобилизации нескольких ферментов на одном носителе или с помощью генетического слияния двух или более генов, которые изначально кодировали независимые белковые ферментные молекулы. Совместная иммобилизация нескольких ферментов, пожалуй, является самым популярным методом. Такой тип иммобилизации может быть осуществлен путем связывания ферментов с носителем, заключения в полимерную сеть или с помощью сшивания ферментов с бифункциональным реагентом, таким как, например, гутаровый альдегид [5].

Однако совместная иммобилизация имеет определенные преимущества и некоторые серьезные недостатки, которые во многих случаях не принимаются во внимание. Среди наиболее явных преимуществ можно отметить: (1) упрощение очистки и выделения продуктов реакции; (2) снижение накопления промежуточных продуктов, в следствии чего токсичность, вызванная чрезмерной локальной концентрацией промежуточных продуктов, может быть снижена; (3) увеличение общего выхода продуктов реакции и эффективности для сложных реакций [6]. С отрицательной стороны, можно отметить то, что в совместно иммобилизованном биокатализаторе все ферменты должны быть иммобилизованы с использованием одной и той же поверхности, и стабильность наименее стабильного фермента будет определять стабильность всего совместно иммобилизованного ферментного биокатализатора. Поэтому совместная иммобилизация ферментов должна проводиться только после тщательной оценки плюсов и минусов индивидуальной иммобилизации по сравнению с совместной иммобилизацией ферментов [7].

Глюконовая кислота и ее производные (например, глюконат натрия, глюконат кальция и *d*-лактон) находят применение в химической, пищевой и фармацевтической промышленности. Традиционно глюконовую кислоту получали путем ферментации с использованием либо *Aspergillus niger*, либо *Gluconobacter suboxydans*. Однако растущий спрос на глюконовую кислоту с годовым темпом роста около 9% [8]

побудил к изучению альтернативных путей синтеза (химическое, электрохимическое, каталитическое и ферментативное окисление). Ферментативное окисление с использованием глюкозооксидазы позволяет достичь 100 % выхода продукта с высокой селективностью и низким образованием побочных продуктов [9].

Многие ферментативные каскады, описанные в литературе, представляют интерес в получении более дешевых продуктов благодаря недорогому сырью [10]. В этой статье будут обсуждены способы проектирования ферментативных каскадов с использованием мультиферментативного синтеза глюконовой кислоты и ее производных.

### **Биферментные катализаторы на основе глюкозооксидазы и каталазы**

В случае использования каталазы и глюкозооксидазы для получения D-глюконовой кислоты функция каталазы двойная: производить кислород, который должен использоваться глюкозооксидазой (это будет в основном кинетическим преимуществом) и предотвращать инактивацию глюкозооксидазы, вызванную перекисью водорода. Концентрация перекиси водорода увеличивается с активностью глюкозооксидазы и размером частиц биокатализатора. Поэтому, преимущество совместной иммобилизации ферментов для поддержания минимального воздействия пероксида водорода на глюкозооксидазу может быть очень важным для стабильности глюкозооксидазы. Более того, если кислород, образующийся при разрушении пероксида водорода, находится в других частицах, активность глюкозооксидазы не будет затронута.

Преимущества использования совместно иммобилизованной каталазы и глюкозооксидазы по сравнению с одной глюкозооксидазой были продемонстрированы во многих работах [11]. Например, глюкозооксидаза и каталаза были совместно иммобилизованы посредством супрамолекулярного комплекса  $\beta$ -циклоцетрина (прикрепленного к глюкозооксидазе) и адамантана (связанного с каталазой). Эта самоорганизующаяся мультиферментная система была спонтанно сформирована сразу после смешивания двух модифицированных ферментов. Эффективность системы улучшилась по сравнению со свободными ферментами (активность в 3,7 раза,  $k_{cat}/K_m$  в 7 раз). Это было связано с быстрым разрушением перекиси водорода. Преимущества совместно иммобилизованного биокатализатора увеличивались по мере увеличения концентрации глюкозы [12]. В работе [13] была подробно исследована методология совместной иммобилизации глюкозооксидазы и каталазы на модифицированной

глутаральдегидом пористой аминосмоле. Соответствие между размерами ферментов и иерархическими размерами пор носителей имеет решающее значение для успеха процесса иммобилизации. Одновременно совместно иммобилизованные ферменты проявили лучшую катализическую активность, чем ферменты иммобилизованные последовательно. Для совместной иммобилизации глюкозооксидазы и каталазы были использованы полиглицидилметакрилатные сферы [14]. Иммобилизация увеличивает оптимальные значения pH (с 5,5 до 7,5) и температуры (с 25°C до 40 °C). После трех рециклов окисления глюкозы сохранялось 82% начальной активности катализатора. Несмотря на то, что это значение было сочтено авторами хорошим, оно недостаточно высоко для промышленной реализации биокатализатора. В другом исследовании глюкозооксидаза и каталаза были совместно иммобилизованы в гидрогелях кремния, кальция и альгината для разложения глюкозного сусла [15]. Использование такого катализатора позволило снизить потенциальную крепость спиртного сусла примерно на 2,0 % об. Постепенное снижение потребления глюкозы наблюдалось в течение восьми последовательных циклов использования совместно иммобилизованных ферментов. Полученные результаты дают информацию об эффективности совместно иммобилизованных глюкозооксидазы и каталазы для обработки сусла с целью получения вин с пониженным содержанием алкоголя.

Совместно иммобилизованные каталаза и глюкозооксидаза могут быть использованы не только для получения глюконовой кислоты. Например, в работе [16] был предложен способ приготовления катализатора с использованием каталазы и глюкозооксидазы для процесса получения глюконата натрия. Были приготовлены пористые хитозановые микросфера с регулируемым размером пор. Грубая пористая структура благоприятна для адсорбции фермента и катализического действия фермента на субстрат. Благодаря совместной иммобилизации каталазы и глюкозооксидазы можно было вовремя устраниить вредный побочный продукт H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и эффективно решить проблему непрерывной дезактивации глюкозооксидазы в процессе реакции. Термическая стабильность и стабильность pH ферментов значительно улучшились после совместной иммобилизации. Относительная активность приготовленного биокатализатора составила 57,27 ± 3,04% при 60°C, тогда как у нативной глюкозооксидазы она составила всего 28,76 ± 4,10%. Относительная активность биокатализатора была выше 63% при pH 5–10, в то время как относительная активность свободной глюкозооксидазы была всего 4,98 ± 0,72% при pH 10. Выход глюконата натрия из 50 мл 250 мг/мл глюкозы,

катализируемой приготовленным биокатализатором составил  $96,19 \pm 0,79\%$  при  $\text{pH} 6,0$  и  $30^\circ\text{C}$ , а реакция длилась 6 ч. При повторном использовании после 10 рециклов относительная активность оставалась  $69,77 \pm 0,78\%$ . После 30 дней хранения биокаталитическая система сохраняла свою начальную активность  $76,52 \pm 1,41\%$ .

### Использование целлюлозосодержащего сырья для получения глюконовой кислоты

При проектировании крупнотоннажного производства важно использовать устойчивое сырье, которое является возобновляемым, легкодоступно и имеет низкую стоимость. Целлюлоза и крахмал, богатые азотом и фосфором, часто используются в качестве субстрата при ферментации [17]. Ферментативный каскад с использованием целлюлозы в качестве субстрата для получения глюконовой кислоты позволяет использовать неочищенное сырье в высоких концентрациях и может применяться для биопереработки. Кроме того, целлюлоза является относительно дешевым и доступным возобновляемым сырьем. Интересным процессом, включающим ферментативную каскадную реакцию, является превращение целлюлозы в D-глюконовую кислоту или ее производные. Предлагаемая ферментативная каскадная реакция использует комбинацию целлюлаз,  $\beta$ -глюкозидазы, глюкозооксидазы и каталазы для получения D-глюконовой кислоты из отходов целлюлозного материала (Рис.1).

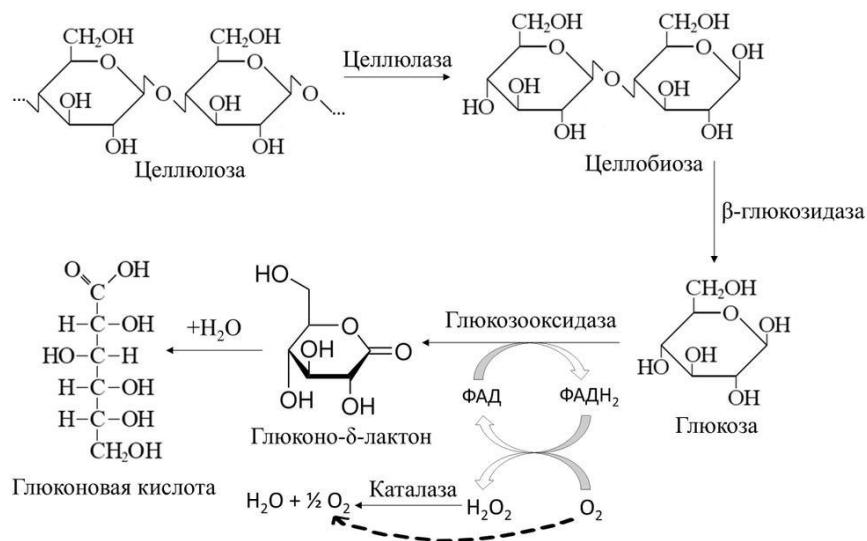


Рис. 1. Синтез глюконовой кислоты из целлюлозы

Предлагаемый каскад реакций начинается с получения целлобиозы из целлюлозы под действием целлюлаз. Затем  $\beta$ -глюкозидаза катализирует гидролиз целлобиозы, и образуется глюкоза. В присутствии глюкозооксидазы глюкоза далее окисляется до d-глюконо- $\delta$ -лактона. Из этого лактона спонтанного образуется глюконовая кислота путем неферментативного гидролиза. Глюкозооксидаза является флавопротеином, которому требуется акцептор конечных электронов для окисления кофактора (FAD), ранее восстановленного во время окисления глюкозы. Поэтому необходимо провести окисление в присутствии молекулярного кислорода (действующего как акцептор конечных электронов), в результате чего образуется  $H_2O_2$ . Поскольку  $H_2O_2$  ингибирует активность глюкозооксидазы при относительно низких концентрациях, его необходимо удалить после образования. Это можно сделать с помощью каталазы, которая преобразует один моль  $H_2O_2$  в моль воды с сопутствующим высвобождением половины моля кислорода. Это означает, что для осуществления реакции глюкоза до d-глюконо- $\delta$ -лактона требуется только половина молекулы кислорода [18].

Во многих случаях, если в каскадной реакции используется несколько ферментов, предполагается, что совместная иммобилизация ферментов на одном носителе является лучшей альтернативой создания мультиферментного катализатора. В работе [19] был предложен магнитный четырехферментный нанобиокатализатор, полученный путем одновременной ковалентной совместной иммобилизации целлюлазы, глюкозидазы, глюкозооксидазы и пероксидазы хрена на поверхности аминофункционализированных магнитных наночастиц для гидролиза целлюлозы посредством четырехступенчатой каскадной реакции. Последний шаг каскадного процесса включает в себя восстановление  $H_2O_2$  до  $H_2O$ , с помощью пероксидазы, в присутствии донора электронов. Процесс совместной иммобилизации дал максимальную ферментативную активность (целлюлаза: 42%, глюкозидаза: 66%, глюкозооксидаза: 94% и пероксидаза: 78%) при концентрации сшивающего агента 10% после 2 ч инкубации и при массовом соотношении магнитных наночастиц к общему содержанию фермента 1:1. Процесс иммобилизации привел к увеличению  $K_m$  и уменьшению значений  $V_{max}$  совместно иммобилизованных ферментов. Исследования термостабильности совместно иммобилизованных ферментов показали увеличение их энергий дезактивации до 1,5 раз по сравнению с нативными ферментами. Улучшенные термодинамические параметры четырехферментных магнитных наночастиц также предполагают увеличение их термостабильности. Кроме того, совместно иммобилизованные ферменты сохранили значительную часть своей

активности (до 50%) после 5 реакционных циклов при 50°C и оставались активными даже после 24 дней инкубации при 5°C. Нанобиокатализатор был успешно применен в четырехступенчатой каскадной реакции, включающей гидролиз целлюлозы и конверсии глюкозы до глюконовой кислоты.

В работе [20] целлюлаза была объединена с  $\beta$ -глюкозидазой и использовалась для гидролиза целлюлозы кукурузной соломы в остатки глюкозы, а затем глюкоза была преобразована в глюконовую кислоту, катализируемую глюкозооксидазой. Для снижения ингибирующего действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, который был получен во время реакции окисления глюкозы, на активность глюкозооксидазы была использована каталаза. Ферменты были совместно иммобилизованы на Eudragit L-100 для создания искусственной реакционной системы для достижения одноступенчатого превращения целлюлозы, полученной из кукурузной соломы, в глюконовую кислоту. В этом исследовании использовался метод ковалентного связывания для совместной иммобилизации целлюлазы, глюкозооксидазы и каталазы с помощью сшивающего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида. Благодаря определению условий приготовления, ферментативных свойств и катализитических условий совместно иммобилизованный фермент был применен к катализитической реакции однореакторной конверсии кукурузной соломы в глюконовую кислоту. Выход глюконовой кислоты достиг 0,28 мг/мг, скорость конверсии целлюлозы в кукурузной соломе в глюконовую кислоту достигла 61,41%. Восстановление ферментной системы из твердого субстрата было достигнуто за счет использования обратимых и растворимых характеристик носителя. После 6 повторных рециклов активность биокатализатора сохранялась на уровне 52,38%, что подтверждает осуществимость стратегии мультиферментной иммобилизации с использованием обратимого растворимого носителя в каскадных реакциях.

Для одноэтапного получения глюконовой кислоты из карбоксиметилцеллюлозы ферменты целлюлазы и глюкозооксидазы были пошагово иммобилизованы на оксид графена, который был приготовлен методом Хаммерса [21]. Мультиферментные системы имели оптимумы температуры и pH 40°C и 5.0, соответственно. После семи рециклов удалось сохранить почти 65 % начальной активности ферментов. В методе пошаговой иммобилизации в полной мере использовались различные функциональные группы оксида графена, что позволило избежать конкуренции между целлюлазой и глюкозооксидазой в процессах иммобилизации.

В работе [22] была изучена возможность биопереработки целлюлозы для получения глюконата натрия. Рекомбинантный штамм z19 был сконструирован из дикого штамма *Penicillium oxalicum* 114-2 для одновременной экспрессии глюкозооксидазы и каталазы из *Aspergillus niger*. Сохраняя целлюлолитическую способность, схожую с таковой у 114-2, z19 секретировал определенное количество глюкозооксидазы и каталазы. Для производства глюконата натрия из целлюлозы использовалась стратегия периодического выращивания и двухступенчатого температурного контроля (0–120 ч, 30°C; 120–192 ч, 45°C), при этом в конце ферментации было получено 13,54 г/л глюконата натрия. Результаты показывают альтернативный путь производства глюконата натрия из целлюлозы в одноступенчатой реакции.

### Заключение

Иммобилизация нескольких ферментов на одном носителе позволяет проводить сложные химические реакции с пониженной стоимостью и улучшенной стабильностью. Кроме того, рациональная стратегия иммобилизации может повысить катализическую активность иммобилизованных ферментов за счет снижения ингибирования продукта или увеличения концентрации локальных субстратов. Производство D-глюконовой кислоты путем окисления глюкозы в присутствии биферментного катализатора на основе глюкозооксидазы и каталазы является одной из наиболее изученных ферментативных каскадных реакций. Критическим моментом данной реакции является избежание воздействия на глюкозооксидазу высоких концентраций перекиси водорода. Данная проблема решается благодаря использованию каталазы, фермента, который в качестве субстрата использует пероксид водорода.

Одновременная ковалентная совместная иммобилизация нескольких ферментов на разных носителях позволяет проводить многоступенчатые каскадные реакции с использованием лигнинцеллюлозного сырья. Так, например, аминофункционализированные магнитные наночастицы оказались эффективной подложкой для четырехферментного биокатализатора, полученного путем совместной иммобилизации целлюлазы, глюкозидазы, глюкозооксидазы и пероксидазы. Подготовленный нанобиокатализатор был способен катализировать гидролиз целлюлозы простым и непрерывным мониторингом хода реакции. Хотя процесс совместной иммобилизации приводит к некоторой потере ферментативной активности, полученный нанобиокатализатор продемонстрировал повышенную термическую стабильность в широком

диапазоне температур. На основе данного обзора можно сделать вывод о том, что разработка мультиферментных систем с высокой катализитической эффективностью, возможностью повторного использования и практическими применениями является актуальным направлением в области биотехнологии и биоинженерии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 24-79-10042.*

#### **Список литературы:**

1. Bilal M., Iqbal H.M.N., Guo S., Hu H., Wang W., Zhang X. State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point / M. Bilal, H.M.N. Iqbal, S. Guo, H. Hu, W. Wang, X. Zhang // Int J Biol Macromol. - 2018 №108. - P. 893-901.
2. Ruales-Salcedo A.V. Design of enzymatic cascade processes for the production of low-priced chemicals / A.V. Ruales-Salcedo, J.C. Higuina, J. Fontalvo, J.M. Woodley // Z Naturforsch C J Biosci. - 2019. - №74. - P. 77-84.
3. Muschiol J. Cascade catalysis – strategies and challenges en route to preparative synthetic biology / J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, M.D. Mihovilovic, U.T. Bornscheuer, F. Rudroff // Chem Comm. - 2015. - №51. - P. 5798–811.
4. Schrittwieser J.H. Artificial biocatalytic linear cascades for preparation of organic molecules / J.H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil // Chem Rev. - 2018. - №118. - P. 270–348.
5. Sánchez-Moreno I. Multi-Enzyme Reactions. Comprehensive Chirality / I. Sánchez-Moreno, I. Oroz-Guinea, L. Iturraté, E. García-Junceda // 2012. - P. 430–453.
6. Maria L.F. Biocatalyst Immobilization Foundations and Applications // 2022.
7. Jakub F.K. Enzyme production of D-gluconic acid and glucose oxidase: successful tales of cascade reactions / F.K. Jakub, C. Diego, W.T. Paulo, B.-M. Ángel // Catal. Sci. Technol. - 2020. - №10. - P. 5740.
8. Banerjee S. Fermentative production of gluconic acid: a membrane-integrated Green process / S. Banerjee, R. Kumar, P. Pal // J Taiwan Inst Chem. - 2018. - №84. - P. 76–84.
9. Ruales-Salcedo A.V. Design of enzymatic cascade processes for the production of low-priced chemicals. / A.V. Ruales-Salcedo, J.C. Higuina, J. Fontalvo, J.M. Woodley // A Journal of Biosciences. 2019. - №74. - P. 77-84.
10. Jakub F.K. Enzyme production of D-gluconic acid and glucose oxidase: successful tales of cascade reactions / F.K. Jakub, C. Diego, W.T. Paulo, B.-M. Ángel // Catal. Sci. Technol. - 2020. - №10. - P. 5740.

11. Jakub F.K. Enzyme production of D-gluconic acid and glucose oxidase: successful tales of cascade reactions / F.K. Jakub, C. Diego, W.T. Paulo, B.-M. Ángel // Catal. Sci. Technol. -2020. - №10. - P.5740-5771.
12. Cui C. Design and construction of a semi-cycle system of oxygen supplied intensification using hydrogen peroxide for high-performance glucose oxidation / C. Cui, X. Mengyuan, Z. Tingting, M. Chenyan // Molecular Catalysis. 2022. - №519. - P.112119.
13. Wei Z. Co-localization of glucose oxidase and catalase enabled by a self-assembly approach: Matching between molecular dimensions and hierarchical pore sizes / Z. Wei , H. Jinsha, L. Xiaojing, G. Lei, N. Huanqing, W. Zhenfu, W. Jinglan, Y. Pengpeng, Yong, Y. Hanjie // Food Chemistry. - 2019. - №275. - P.197-205.
14. Liao L. Coupling and Regulation of Porous Carriers Using Plasma and Amination to Improve the Catalytic Performance of Glucose Oxidase and Catalase / L. Liao, Y. Meng, R. Wang, B. Jia, P. Li // Front. Bioeng. Biotechnol. - 2019. - №7. - P. 426.
15. del-Bosque D. Entrapment of Glucose Oxidase and Catalase in Silica-Calcium Alginate Hydrogel Reduces the Release of Gluconic Acid in Must / D. del-Bosque, J. Vila-Crespo, V. Ruipérez, E. Fernández Fernández, J.M. Rodríguez-Nogales // Gels. - 2023. - №9. - P.622.
16. Liu Y. Co-immobilization of glucose oxidase and catalase in porous magnetic chitosan microspheres for production of sodium gluconate // International Journal of Chemical Reactor Engineering. - 2022. - №20. - P.989 - 1001.
17. Pal P. Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production / P. Pal, R. Kumar, S. Banerjee // Chem Eng Process. - 2016. - №104. - P.160–71.
18. Ruales-Salcedo A.V. Design of enzymatic cascade processes for the production of low-priced chemicals. / A.V. Ruales-Salcedo, J.C. Higuita, J. Fontalvo, J.M. Woodley // A Journal of Biosciences. 2019. - №74. - P. 77-84.
19. Giannakopoulou A. Development of a Four-Enzyme Magnetic Nanobiocatalyst for Multi-Step Cascade Reactions / A. Giannakopoulou, M. Patila, K. Spyrou, N. Chalmpes, D. Zarafeta, G. Skretas, D. Gournis, H. Stamatis // Catalysts. - 2019. - №9. - P.995.
20. Xiaoxiao Y. Co-immobilization of multi-enzyme on reversibly soluble polymers in cascade catalysis for the one-pot conversion of gluconic acid from corn straw / Y. Xiaoxiao, Z. Zhaoye, L. Jianzhen, S. Yingjie, G. Mingyue, J. Tingwei, C. Guang // Bioresource Technology. - 2021. - №321. - P.124509.
21. Zhang H. Co-immobilization of cellulase and glucose oxidase on graphene oxide by covalent bonds: a biocatalytic system for one-pot conversion of gluconic acid from carboxymethyl cellulose / H. Zhang, Z. Shao-Feng // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. - 2019.
22. Xiaolong H. Consolidated bioprocessing for sodium gluconate production from cellulose using *Penicillium oxalicum* / H. Xiaolong, L. Guodong P.

Yunjun, S. Wenxia, Q. Yinbo // Bioresource Technology. - 2019. - №251. - P.407-410.

*Об авторах:*

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна - кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет, (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: olechkamatveeva@mail.ru

СУЛЬМАН Александрина Михайловна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет, (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: alexsulman@mail.ru

## **PRODUCTION OF GLUCONIC ACID BY MEANS OF MULTI-ENZYME CASCADE REACTIONS**

**O.V. Grebennikova, A.M. Sulman**

*Tver State Technical University, Tver*

Recently, the relevance of a more environmentally friendly and sustainable alternative method for the production of chemicals and biological products has been increasing. Therefore, cascade reactions can be a very promising approach in this direction, eliminating the traditional step-by-step synthesis. When using multi-enzyme systems in cascade reactions, local substrate concentration occurs around the second and all subsequent enzymes that enter the system. Such systems are particularly attractive because many commercially available enzymes operate under relatively similar environmental conditions (e.g., pH and temperature). This allows you to work with multiple enzymes in one reactor. This paper describes some types of multi-enzyme systems using various enzymes, such as, for example, cellulase, peroxidase, glucose oxidase, etc. Various methods of immobilization of several enzymes on a single carrier for the production of gluconic acid and its derivatives are described. Examples of processing of cellulose-containing raw materials using multi-enzyme systems are given.

**Keywords:** cascade reactions, immobilization, multi-enzyme systems, gluconic acid.

Дата поступления в редакцию: 06.10.2025.  
Дата принятия в печать: 09.10.2025.