

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*

Холявка Марина Геннадьевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ, СТРУКТУРНО-  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ИНУЛИНАЗ И ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ  
ФОРМИРОВАНИЯ ИМИ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В  
УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

Специальность 03.01.02. – Биофизика

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант –  
доктор биологических наук,  
профессор В.Г. Артюхов

Воронеж 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Структурно-функциональные свойства инулиназ	14
1.2. Механизм ферментативного гидролиза полифруктанов инулиназами	26
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1. Объект исследования	32
2.2. Методы исследования	36
2.2.1. Электрофорез белков по модифицированному методу Дэвиса	36
2.2.2. Метод Лоури	37
2.2.3. Метод определения каталитической активности инулиназы	38
2.2.4. Методика подготовки к работе ионообменных смол	38
2.2.5. Подготовка к иммобилизации ионообменных волокон	39
2.2.6. Методика сорбционной иммобилизации	39
2.2.7. Дифференциальная сканирующая калориметрия	40
2.2.8. Визуализация молекул методом атомно-силовой микроскопии	40
2.2.9. Определение доли агрегированных молекул	41
2.2.10. Определение доли инактивированных молекул	41
2.2.11. Подготовка и анализ образцов методом инфракрасной спектроскопии	41
2.2.12. Определение размеров молекул методом динамического светорассеяния	42
2.2.13. Молекулярный докинг	43
2.2.14. Тесты на гено- и цитотоксичность	44
2.2.15. Методика УФ-облучения образцов	46
2.2.16. Статистическая обработка результатов экспериментов	46

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИНУЛИНАЗ	47
3.1. Структурные особенности инулиназ из различных продуцентов	47
3.2. Исследование закономерностей образования надмолекулярных комплексов инулиназой из <i>Kluuveromyces marxianus</i>	63
Глава 4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНУЛИНАЗ	71
4.1. Некоторые физико-химические свойства инулиназ	71
4.1.1. Процессы ассоциации-диссоциации молекул инулиназ при различных значениях температуры	76
4.1.2. Процессы ассоциации-диссоциации молекул инулиназ при различных значениях рН среды	80
4.2. Кинетические свойства инулиназ	89
4.3. Анализ степени корреляции между аминокислотными последовательностями инулиназ из различных продуцентов и их физико-химическими свойствами	92
4.4. Сравнительный анализ первичных структур инулиназ из <i>Aspergillus ficuum</i> и <i>Kluuveromyces marxianus</i>	98
4.5. Компьютерный анализ вторичных структур инулиназ из различных продуцентов	104
4.6. Исследование закономерностей процесса термической инактивации инулиназ из <i>Kluuveromyces marxianus</i> Y-303 и <i>Helianthus tuberosus</i>	109
4.7. Процессы ассоциации-диссоциации молекул инулиназы при различных условиях ее термической инактивации	119
4.8. Исследование УФ-индуцированных изменений структурно-функциональных свойств инулиназ	120
Глава 5. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ИНУЛИНАЗ. ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРОЦЕССОВ АДСОРБЦИИ ФЕРМЕНТА НА МАТРИЦЕ НЕРАСТВОРИМЫХ НОСИТЕЛЕЙ	127
5.1. Методы иммобилизации инулиназ и их применение	127
5.2. Поиск и тестирование методами компьютерного моделирования высокоаффинных лигандов для связывания с инулиназой	136

5.3. Последовательный докинг для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы из <i>Aspergillus ficuum</i> на полимерных матрицах	148
5.4. Последовательный докинг для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы из <i>Kluyveromyces marxianus</i> на полимерных матрицах	187
5.5. Поиск сшивающего агента для сополимеризации инулиназы	253
5.6. Поиск перспективного носителя для иммобилизации инулиназы	259
5.7. Механизм адсорбционной иммобилизации инулиназы на ионитах и хитозане	243
5.8. Оптимизация условий сорбции инулиназы на матрице ионообменной смолы КУ-2	245
Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ИНУЛИНАЗ	255
6.1. Оптимумы функционирования инулиназ, иммобилизованных на различных носителях	255
6.2. Аппроксимация каталитической активности свободной и иммобилизованной инулиназы из <i>Kluyveromyces marxianus</i> как функции концентрации субстрата, pH и температуры	256
6.2.1. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной инулиназы из <i>Kluyveromyces marxianus</i> от концентрации субстрата $A(S)$	260
6.2.2. Зависимость активности свободной и иммобилизованной инулиназы из <i>Helianthus tuberosus</i> от концентрации субстрата	289
6.2.3. Зависимость активности свободной и иммобилизованной инулиназы от pH среды	295
6.2.4. Зависимость активности свободной и иммобилизованной инулиназы от температуры	299
6.3. Исследование закономерностей процесса термической инактивации иммобилизованной инулиназы	306
6.4. Взаимодействие молекул инулиназы с матрицей хитозана, УФ-индуцированные изменения функциональных свойств иммобилизованной инулиназы	311
6.4.1. Механизм сорбции инулиназы на матрице хитозанов	312

6.4.2. УФ-индуцированные изменения функциональных свойств иммобилизованной инулиназы	319
6.5. Исследование каталитических характеристик гетерогенного биокатализатора на основе иммобилизованной инулиназы в реакторах периодического и непрерывного действия	323
6.6. Использование растительных экстрактов в качестве субстратов для гетерогенного биокатализатора на основе иммобилизованной инулиназы	333
6.7. Характеристика гено- и цитотоксичности иммобилизованных на полимерных матрицах препаратов инулиназ	336
6.8. Иммобилизация как один из перспективных путей регулирования активности молекул инулиназ	343
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	347
ВЫВОДЫ	352
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	355
БЛАГОДАРНОСТИ	392

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Разработка и исследование гетерогенных биокатализаторов с заданными свойствами путем иммобилизации ферментов на матрице нерастворимых носителей особенно актуальны при создании новых материалов для медицины, биотехнологии, экологии и других областей знаний.

Карбогидразы (или гликозидазы, КФ 3.2.1) катализируют гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов. Эти ферменты встречаются в клетках почти всех живых организмов. Гликозидазы выполняют множество разнообразных функций: деградация биомассы (целлюлазы), участие в антибактериальной защите организма (лизоцим), развитие патогенеза (вирусные нейраминидазы), клеточный биосинтез (маннозидазы, вовлечённые в созревание N-гликозилированных гликопротеинов). Гликозидазы вместе с гликозилтрансферазами образуют основу биологического аппарата синтеза и разрушения гликозидных связей.

Изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств инулиназ в нативном и иммобилизованном состояниях имеет высокое теоретическое и прикладное значение. Эти ферменты участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития органов. Инулиназы могут быть использованы в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, в частности, фруктозы и фруктоолигосахаридов – неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения.

Многие гликозидазы способны образовывать надмолекулярные комплексы при изменении их микроокружения, что обязательно необходимо учитывать при подборе условий и методов их иммобилизации, причем у

некоторых из карбогидраз процессы ассоциации-диссоциации являются одним из механизмов регулирования их каталитической активности.

Механизмы стабилизации иммобилизованных ферментов под действием экстремальных значений pH, температуры, а также других денатурирующих агентов в главных чертах совпадают и обусловлены, прежде всего, изменением степени мобильности третичной структуры, ответственной за образование фермент-субстратного комплекса. При этом предотвращаются такие процессы, как агрегация молекул фермента, автолиз и диссоциация олигомерных белков на субъединицы.

Высокое значение имеют исследования особенностей процессов иммобилизации гликозидаз, которые могут применяться в производстве углеводных продуктов диетического назначения, а также при переработке отходов. Большое внимание ученые уделяют проблемам подбора и модификации носителей, разработке методов иммобилизации, изучению кинетических аспектов катализа гетерогенными ферментными препаратами. Актуальным вопросом является исследование механизма образования комплекса фермент-носитель. Отдельно следует выделить проблему ассоциации-диссоциации молекул фермента в ходе иммобилизации при переходе белка из раствора в фазу носителя.

В целом вопросам стабилизации гликозидаз путем иммобилизации, а также разработке условий получения и применения гетерогенных биокатализаторов на их основе посвящено относительно небольшое число работ, большинство из которых носит эмпирический характер. При этом дополнение экспериментальных техник современными методами компьютерного и математического моделирования позволяет не только экономить материальные ресурсы на проверке иммобилизационных агентов и выявлять механизмы процесса иммобилизации, но и создавать принципиально новые комплексы препаратов на основе использования направленного конструирования материалов (лигандов, подложек, сшивок). Для получения иммобилизованного биообъекта, востребованного на

современном рынке, ученый должен хорошо разбираться не только в области классической и физико-химической биологии, но и в вопросах моделирования и анализа структурно-функциональных особенностей широкого круга биомолекул, уметь выявлять фундаментальные механизмы, управляющие конформационными перестройками в белках, определять наиболее вероятные пути образования комплексов различной природы и протекания химических реакций. Таким образом, необходимо уметь активно манипулировать теоретическими подходами – современнейшими методами квантовой химии: методами молекулярной динамики в полноатомном приближении, гибкого молекулярного докинга, методами прогнозирования спектров биологической активности и высокопроизводительным виртуальным скринингом соединений.

Исследования иммобилизованных карбогидраз в ближайшие годы несомненно позволят расширить наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов и усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы и фруктоолигосахаридов.

***Цель и задачи исследования.*** Целью данной работы является изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы, закономерностей формирования ферментом надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения, определение типов взаимодействий между белковой глобулой и матрицами ряда синтетических ионитов и хитозана. В связи с вышесказанным перед нами были поставлены следующие задачи:

1. разработка корректного подхода к изучению надмолекулярной организации инулиназ в условиях различного микроокружения;
2. выявление закономерности образования ферментом надмолекулярных комплексов и исследование их функциональной активности при различных



концентрациях энзима в системе, действии УФ-облучения, варьировании величин рН, температуры;

3. скрининг лигандов для иммобилизации инулиназы, визуализация вероятных сайтов связывания полимерных матриц с молекулой фермента при адсорбционной иммобилизации;

4. разработка алгоритма для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы;

5. создание математических моделей зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназ от значений температуры, рН среды, концентрации инулина;

6. оценка генотоксических и цитотоксических свойств препаратов иммобилизованной инулиназы;

7. сравнительный анализ их каталитической способности при гидролизе инулинсодержащих растительных экстрактов.

**Научная новизна.** Для изучения надмолекулярной организации инулиназ в условиях различного микроокружения предложен комплексный подход, заключающийся в сочетании современных биофизических методов (атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния) с классическими методами (инфракрасной спектроскопией, гель-хроматографией и электрофорезом). Впервые выявлены закономерности образования надмолекулярных комплексов ферментом инулиназой при ее различных концентрациях в системе (от  $10^{-8}$  до  $5 \times 10^{-4}$  М), действии УФ-облучения в дозах 151-6040 Дж/м<sup>2</sup>, варьировании величин рН (3,0-8,5), температуры (20-95 °С). Разработан алгоритм для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик молекул инулиназ. Предложены схемы отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие высоких температур, высоких и низких значений рН среды, УФ-излучения (240-390 нм). Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием

методов последовательного (каскадного) докинга и ИК-спектроскопии. Созданы математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназы от значений температуры, рН, концентрации инулина (до 1,2 мМ), а также модель учета кинетики реакции как инструменты для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде. Впервые оценены генотоксические и цитотоксические свойства препаратов инулиназы, иммобилизованной на синтетических носителях АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1.

***Практическая значимость.*** Изучение закономерностей образования надмолекулярных комплексов инулиназой и изменения их функциональной активности в условиях различного микроокружения, а также выявление молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы позволили нам оптимизировать методику сорбционной иммобилизации фермента, которая позволяет сохранить до 80 % первоначальной каталитической активности энзима.

Математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназы от значений температуры, концентрации ионов водорода, концентрации инулина могут служить для прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде при варьировании значений температуры (от 20 до 95 °С), рН среды (от 3,0 до 8,5), концентрации инулина (до 1,2 мМ).

В отечественной пищевой промышленности, в том числе в производстве сахаристых веществ (крахмальные патоки, глюкозо-фруктозные и инвертные сиропы), гетерогенные биокаталитические процессы практически не реализованы. В связи с этим разработка отечественных биотехнологических производств и замена устаревших гомогенных катализаторов на передовые гетерогенные является необходимой и своевременной.

Иммобилизация часто является экономически невыгодной для многих энзимов, так как носитель может иметь высокую стоимость. Поэтому

перспективными являются исследования условий иммобилизации гидролитических ферментов на товарных ионитах и хитозанах отечественного производства. Показано, что сорбенты АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их к использованию в качестве катализаторов для промышленного получения фруктозы из растительного сырья. Установлено, что иммобилизованные препараты инулиназы проявляют максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, луковиц георгина, которые являются перспективными для промышленного применения с целью получения фруктозы ферментативным путем.

***Апробация работы.*** Основные результаты исследований по теме диссертации были представлены на Международных научно-технических конференциях «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ» (Севастополь, 2011, 2012, 2013, 2015, 2016, 2017); Международных конференциях «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2011, 2012); Международных школах-конференциях «Анализ сложных биологических систем». Математика. Компьютер. Образование (Дубна, 2012, 2014; Пущино, 2015); IV и V Съездах биофизиков России (Нижний Новгород, 2012; Ростов-на-Дону, 2015); Международных конференциях молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пущино, 2012, 2015); Международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 2012); Международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013); V Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016); Европейском биотехнологическом конгрессе (European Biotechnology Congress) (Дубровник, Хорватия, 2017); 42-ом Конгрессе FEBS (Кушадасы, Турция,

2016). Работа была выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Госзадания 3.1761.2017/4.6.

**Публикации.** По теме диссертационной работы имеется 85 публикаций, из них 1 монография, 1 глава в зарубежной коллективной монографии; в перечень ВАК или МБД входят 27, в Scopus – 15, в Web of Science – 6.

***На защиту выносятся следующие положения:***

1. Для изучения надмолекулярной организации инулиназ в условиях различного микроокружения разработан комплексный подход, заключающийся в сочетании атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния с методами инфракрасной спектроскопии, гель-хроматографии и электрофореза.
2. Выявлены закономерности образования надмолекулярных комплексов ферментом инулиназой: при концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  моль/л фермент на 70-80 % диссоциирован на субъединицы. В диапазоне концентраций  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л преобладают димерные (до ~80 %) и тетрамерные формы фермента. Молекулы инулиназ функционально активны и в мономерной, и в других, преимущественно, димерных, формах.
2. Разработан алгоритм для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик молекул инулиназ и экспресс-оценки их динамического состояния. Выявлены структурно-функциональные особенности инулиназ в условиях различного микроокружения (иммобилизация на полимерных носителях, действие УФ-облучения, варьирование величин pH, температуры, концентрации субстрата).
3. Изучена роль следующих процессов в проявлении функциональной активности инулиназы: а) формирование димеров с измененной пространственной структурой (при 45 и 55 °C / значениях pH 4,5, 5,0-6,5 / УФ-облучении в дозах до 453 Дж/м<sup>2</sup> для дрожжевой и растительной инулиназы и до 4530 Дж/м<sup>2</sup> для грибного фермента), б) образование тетрамеров

и более крупных ассоциатов (при 61 °С и выше / рН 3,5 и 13,0 / УФ-облучении молекул дрожжевой и растительной инулиназы дозой 755 Дж/м<sup>2</sup>), в) диссоциация молекулы фермента на субъединицы (при 60 °С / рН 3,0).

4. Выполнен виртуальный скрининг лигандов для иммобилизации инулиназы. Определены вероятные сайты связывания полимерных матриц с молекулой фермента при адсорбционной иммобилизации. Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием методов последовательного (каскадного) докинга и ИК-спектроскопии.

5. Созданы математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназы от значений температуры (20-95 °С), рН (3,0-8,5), концентрации инулина (до 1,2 мМ), а также модель учета кинетики реакции как инструменты для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде.

6. Оценены генотоксические и цитотоксические свойства препаратов инулиназы, иммобилизованной на различных синтетических носителях (АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1). Показано, что эти сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их к использованию в качестве катализаторов для промышленного получения фруктозы из растительного сырья.

7. Иммобилизованные препараты дрожжевой и растительной инулиназы проявляют максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, луковиц георгина, которые являются перспективными для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа включает 392 страниц машинописного текста; состоит из «Введения», 6 глав, «Заключения», «Выводов». Список литературы содержит 351 источник. Иллюстративный материал включает 166 рисунков и 65 таблиц.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структурно-функциональные свойства инулиназы

Инулиназы участвуют в углеводном метаболизме высших растений и некоторых микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. Существуют экзо- (КФ 3.2.1.80) и эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7). Эндоинулиназы (2,1- $\beta$ -D-фруктанфруктаногидролазы) расщепляют молекулу инулина вдали от концевых остатков фруктозы, продуктами гидролиза являются олигосахариды, инулотриозы (нистозы (GF<sub>3</sub>)), инулотетраозы (фруктозил-1-нистозы (GF<sub>4</sub>)), инулопентаозы. Экзоинулиназы ( $\beta$ -D-фруктанфруктогидролазы) отщепляют концевые остатки фруктозы от молекул инулина, сахарозы и раффинозы (Onodera S., 1988, Basso A., 2010, Sumat C.J., 2012, Rawat H.K., 2015, Vijayaraghavan K., 2009). При полном гидролизе инулина из разных источников (цикория, артишока, георгина, топинамбура, подсолнечника и др.) как экзо-, так и эндоинулиназы приводят к образованию фруктозы в качестве конечного продукта, обеспечивая высокую, хотя и несколько различающуюся в зависимости от источника инулина, глубину конверсии субстрата. Экзоинулиназа осуществляет гидролиз инулина по процессинговому механизму, последовательно отщепляя концевые мономерные звенья фруктозы, а также гидролизуя терминальные связи между фруктозой и глюкозой. Эндоинулиназа на первых этапах гидролиза субстрата разрушает внутренние  $\beta$ -2,1-фруктозидные связи инулина, приводя к первичному образованию олигосахаридов с последующим их превращением во фруктозу (Волков П.В., 2012, Flores A.C., 2016).

Инулиназы используются для производства сиропов с повышенным содержанием фруктозы (Sirisansaneeyakul S., 2007, Mansouri S., 2013, Ali S.,

2015), для синтеза инулоолигосахаридов – фруктоолигосахаридов (ФОС) со степенью полимеризации от 2 до 9 (Yun J.W., 1997, Singh R.S., 2010, 2014, de Moura F.A., 2014), а также для получения широкого спектра продуктов микробиологического синтеза: этанола (Hu N., 2012, Gao J., 2015, Zhang X., 2016, Khatun M.M., 2017), молочной (Petrova P., 2015) и лимонной кислот (Liu X.Y., 2010, Rakicka M., 2016), водорода (Jiang L., 2017) бутандиола, и др. (Chi Z.M., 2011, Gao J., 2015, Chi Z., 2009, Liu X.Y., 2010, Park J.M., 2017).

Среди микромицетов хорошо известны такие продуценты инулиназы, как *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Chrysosporium pannorum* и *Penicillium purpurogenum*. Среди дрожжей – *Kluuveromyces marxianus*, *Candida kefyri*, *Debaryomyces cantarellii* и *Pichia polymorpha*. Дрожжи продуцируют только экзоинулиназу, плесневые грибы – ее эндо- и экзо-форму (Rouwenhorst R.J., 1990, Соколенко Г.Г., 2010, 2013, 2015, Arand M., 2002, Kulminskaya A.A., 2003, Singh P.K., 2016, Hughes S.R., 2013, Laowklom N., 2012, Gao J., 2014, Treichel H., 2012, Chi Z., 2009, Khatun M.M., 2015, Santharam L., 2017).

Инвертаза, фруктозилтрансфераза, леваназа, эндоинулиназа и экзоинулиназа входят в семейство гликозидаз, группу  $\beta$ -фруктофуранозидаз, у которых в аминокислотных последовательностях присутствуют характерные консервативные участки WMN(D/E)PN; RDP и EC(P). Установлено, что у большинства карбогидраз механизм гидролиза полисахаридов предполагает участие двух кислых аминокислотных остатков, один из которых работает в качестве нуклеофила, а другой проявляет свойства донора протона. Методами сайт-специфического мутагенеза и химической модификации было выявлено, что в молекуле инвертазы дрожжей эти функции выполняют остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот (Asp 23 и Glu 204), входящие соответственно в состав последовательностей WMN(D/E)PN и EC(P). В акте катализа, вероятно, также участвуют Asp 20 или Glu 20. Установлено, что инулиназы из *Aspergillus ficuum* и *Aspergillus niger* AF10, экзоинулиназа из *Aspergillus awamori*, эндоинулиназа из *Arthrobacter*, инвертаза из *Thermotoga maritima*,

фруктозилтрансфераза из *Aspergillus foetidus* и леваназа из *Gluconacetobacter diazotrophicus* имеют консервативные последовательности WMNXPNGL и RDPKVF. Возможно, участок WMNXPNGL выполняет функцию нуклеофила, а RDPKVF также играет важную роль в акте катализа (Kim K.Y., 2008, Nagem R.A., 2004, Pouyez J., 2012, Vandamme A.M., 2013, Ma J.Y., 2016).

Экзоинулиназа *Aspergillus niger* (AngInuE) практически полностью идентична фруктозилтрансферазе 1-SST из *Aspergillus foetidus*, которая не способна к гидролизу инулина или левана. Более того, энзим AngInuE отличается на три аминокислоты от экзоинулиназы (InuE) из *Aspergillus niger* 12, способной расщеплять инулин, но не активной по отношению к левану (Arand M., 2002, Moriyama S., 2003, Rehm J., 1998). Идентичность аминокислотных последовательностей экзоинулиназы из различных продуцентов по отношению к родственным ей ферментам представлена в табл. 1.

Экзоинулиназа из *Bacillus polymyxa* MGL21 гомологична соответственно на 57, 39 и 41 % экзоинулиназам из *Pseudomonas mucidolens* и *Aspergillus niger* и леваназе из *Bacillus subtilis*. Шесть консервативных участков, характерных для ферментов, расщепляющих сахарозу, инулин и леван были обнаружены у инулиназы из *Bacillus polymyxa*. Инулиназа из *Bacillus polymyxa* имеет консервативный остаток Cys, аналогичный таковому в каталитическом центре инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, инвертазы из *Saccharomyces cerevisiae* и сахаразы из *Zymomonas mobilis* (Kwon H.J., 2003, Laloux O., 1991).



Таблица 1

Идентичность аминокислотных последовательностей экзоинулиаз и  
родственных ей ферментов из различных продуцентов

Продуцент экзо- инулиназы	Фермент для сравнения	Идентич- ность, %	Источник литературы
<i>Aspergillus niger</i>	фруктозилтрансфераза 1-SST из <i>Aspergillus foetidus</i>	100	(Akimoto H., 2000, Arand M., 2002, Bezzate S., 1994, Laloux O., 1991, Martin I., 1987, Moriyama S., 2003, Norman J.M., 1995, Ohta K., 1998, Onodera S., 1996, Perez J.A., 1996, Rehm J., 1998, Taussig R., 1983)
	экзоинулиназа из <i>Aspergillus awamori</i>	91	
	экзоинулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	38	
	эндоинулиназа из <i>Penicillium</i> species штамм TN-88	37	
	эндоинулиназа из <i>Penicillium</i> <i>purpurogenum</i>	36	
	эндоинулиназа из <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	35	
	леваназы из <i>Bacillus subtilis</i>	42	
	леваназы из <i>Actinomyces</i> <i>naeshlundii</i>	41	
	леваназы из <i>Bacillus polymyxa</i>	39	
	инвертазы из <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	40	
	инвертазы из <i>Pichia anomala</i>	39	
<i>Aspergillus awamori</i>	инулиназа из <i>Bacillus subtilis</i>	13	(Meng G., 2003, Nagem R.A., 2004)
	левансахараза из <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	13	
<i>Bacillus</i> <i>polymyxa</i> MGL21	экзоинулиназа из <i>Pseudomonas mucidolens</i>	57	(Gunasekaran P., 1990, Kwon H.J., 2003, Laloux O., 1991, Martin I., 1987)
	экзоинулиназа из <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	39	
	леваназы из <i>Bacillus subtilis</i>	41	
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) (InuAMN8) <sup>1</sup>	леваназы из <i>Arthrobacter</i> <i>phenanthrenivorans</i> Sphe3	81	(Zhou J., 2015)
	экзоинулиназа из <i>Bacillus</i> sp. snu-7	58	

<sup>1</sup> в этот организм инулиназа была экспрессирована из *Arthrobacter* sp. MN8

Сравнение пространственных структур экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (GH32), инвертазы из *Thermotoga maritima* (GH32), 1-экзогидролазы IIa (1-FEN IIa) из *Cichorium intybus* (GH32) и левансахаразы из *Bacillus subtilis* (GH68) показало, что каталитический центр располагается у этих ферментов в пределах  $\beta$ -пропеллерового домена (N-домена). T. Pons et al. (1998) предложили структурную модель для семейства гликозидаз GH32. Авторами были выявлены три консервативных аминокислотных остатка, входящих в состав активного центра: два остатка Asp и один остаток Glu (Nagem R.A., 2004, Alberto F., 2004, 2006, Meng G., 2003, Cazetta M.L., 2005, Наумов Д.Г., 2012).

R.A. Nagem et al. (2004) на основе данных рентгеноструктурного анализа (РСА) построили пространственную модель инулиназы из *Aspergillus awamori*. Авторы отметили, что энзим состоит из двух доменов. N-концевой домен, включающий активный центр, содержит 353 аминокислотных остатка (от Phe 20 до Gln 372). Он принадлежит к семейству  $\beta$ -пропеллеровых структур с пятью  $\beta$ -листами, располагающимися радиально вокруг центральной оси как лопасти пропеллера. Каждая лопасть включает четыре антипараллельных  $\beta$ -тяжа. Все тяжи объединены поворотом шпильки, причем четвертый тяж одной лопасти связан с первым тяжом последующей. Пятилопастная  $\beta$ -пропеллеровая складчатость встречается достаточно редко, например, она характерна для левансахаразы из *Bacillus subtilis*,  $\alpha$ -L-арабиназы A43 из *Cellvibrio japonicus* и тахилектина-2. Интересно, что тахилектин и арабиназа являются соответственно членами семейств GHF 43 и 68. Несмотря на низкую степень гомологии аминокислотных последовательностей представителей этих семейств (менее 15 %), общие структурные фрагменты были обнаружены между GHF 32 и 68 и между GHF 68 и 43, (Nurizzo D., 2002, Nagem R.A., 2004, Meng G., 2003, Naumoff D.G., 1999, Pons T., 2000, Sainz-Polo M.A., 2013, Alvaro-Benito M., 2010).

N-концевой домен экзоинулиназы из *Aspergillus niger* содержит 10 остатков His, восемь из которых расположены в упорядоченных, а два – в

неупорядоченных структурах молекулы (Arjomand M.R., 2017). Последние не только связывают  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слои, но также играют важную роль в проявлении структурно-функциональных свойств фермента. В отличие от остатков His из периодических структур, которые располагаются преимущественно в центре молекулы, остатки из неперiodических вторичных структур обычно лежат на поверхности глобулы и взаимодействуют с молекулами растворителя (Arjomand M.R., 2016). Применяв сайт-направленный мутагенез, M.R. Arjomand et al. (2017) доказали важность His 192 в обеспечении структурных особенностей и функциональных характеристик инулиназы.

C-концевой домен инулиназы (156 аминокислотных остатков от Arg 382 до Asn 537), состоит из двух  $\beta$ -листов, каждый из которых, в свою очередь, образован шестью  $\beta$ -тяжами, ассоциированными в структуру типа сэндвича. Первый и второй домены объединены короткими полипептидными линкерами. Близкая позиция и ориентация доменов стабилизируется многочисленными водородными связями и гидрофобными взаимодействиями (Nagem R.A., 2004, Lammens W., 2009).

Оба домена по структуре сходны с элементами другого члена семейства гликозидаз – инвертазы из *Thermotoga maritima*. Степень идентичности аминокислотных последовательностей этих ферментов составляет 29 %, в основном за счет внутренних участков молекулы. Высокая гомологичность двух различных по составу членов семейства GHF 32 дает возможность утверждать, что наблюдаемый тип складчатости представляет собой матрицу и для других энзимов этого семейства (Nagem R.A., 2004).

Сравнивая представленную R.A. Nagem et al. (2004) модель инулиназы из *Aspergillus awamori* (рис. 1) с моделями других белков из Protein Data Bank, можно выявить значительное структурное сходство между N-терминальным  $\beta$ -пропеллеровым доменом инулиназы и левансахаразы из *Bacillus subtilis* (PDB code 1OYG), членом GHF 68 (рис. 2), хотя степень

идентичности аминокислотных последовательностей этих белков составляет лишь 13 % (Nagem R.A., 2004, Meng G., 2003).

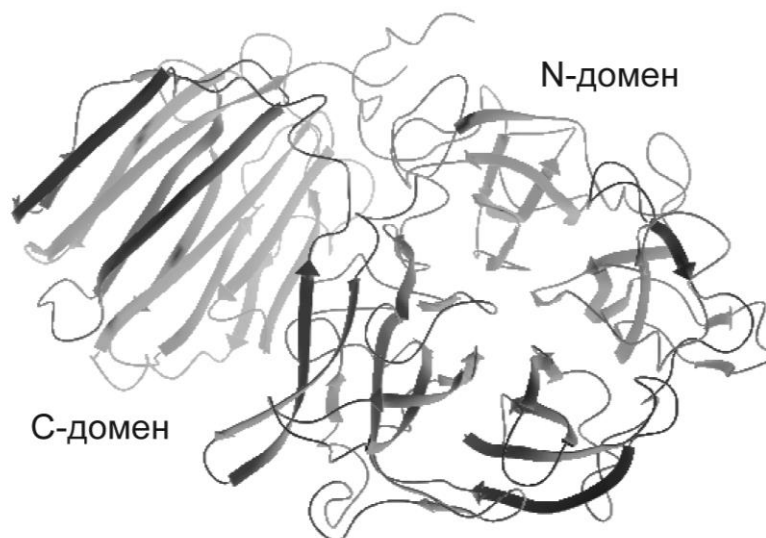


Рис. 1. Пространственная структура инулиназы из *Aspergillus awamori* (PDB ID 1Y4W). Молекулы воды и различных лигандов были удалены

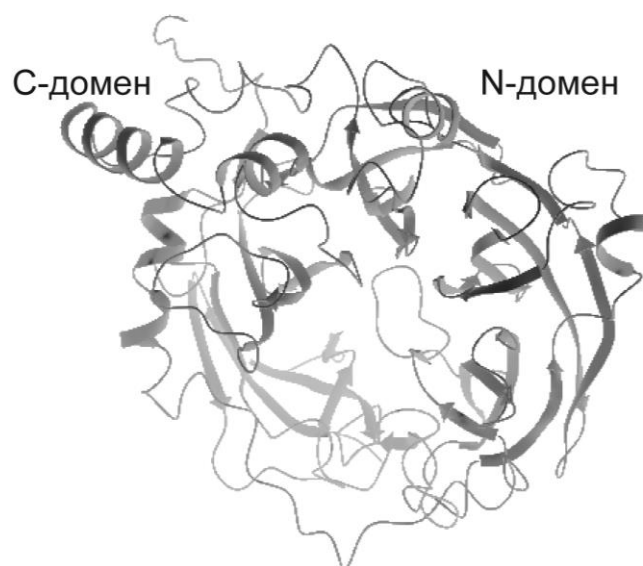


Рис. 2. Пространственная структура левансахаразы из *Bacillus subtilis* (PDB ID 1OYG). Молекулы воды и различных лигандов (моносахаридов) были удалены

Установлено, что экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* является гликопротеином, содержащим пять N-связанных олигосахаридных остатков. Авторами были получены две кристаллические формы, различающиеся степенью гликозилирования. Рентгеноструктурный анализ комплекса инулиназы с фруктозой при разрешении 1,87 Å позволил обнаружить два каталитически важных аминокислотных остатка: Asp 41 (нуклеофил) и Glu 241 (донор протонов) (Nagem R.A., 2004).

Данные рентгеноструктурного анализа были получены также группой M. Arand et al. (2002) при разрешении 1,73 Å. Установлено, что размер молекулы инулиназы составляет 64,7×82,0×136,1 Å.

C-терминальный домен инулиназы сходен с углевод-распознающим доменом кальций-зависимого лектина крысы p58 (PDB code 1GV9), хотя степень идентичности аминокислотных последовательностей этих белков составляет только 12 %. Домен, содержащий β-сандвич, является высококонсервативным среди гидролизующих фруктаны грибных ферментов, исключение составляют инвертазы. Возможно, он играет важную роль при связывании полимеров (Yuan X.L., 2006, Moriyama S., 2003, Ohta K., 1998).

Показано, что на противоположной поверхности от активного центра гликозидаз находятся аспарагиновые группировки (Asp-boxes). Asp-боксы встречаются в 5-лопастных (GH32), 6-лопастных (GH33, GH58), 7-лопастных (GH74) и 10-лопастных (Vps10-D) β-пропеллерах, в складчатостях типа β-сандвича у сульфитных оксидаз, некоторых структурно близких им ферментов (GH20) и микробных рибонуклеаз. Ранее предполагалось, что повторяющиеся триптофановые участки (PQQ) являются родственными Asp-боксам. Повторы Asp-boxes в β-пропеллерах выполняют структурную функцию во взаимодействии между лопастями (Quistgaard E.M., 2009).

Существует предположение о том, что в некоторых лопастях β-пропеллера Asp-боксы могут играть далеко не ведущую роль в формировании и стабилизации складчатости, а выполнять сигнальные,

дополнительные или альтернативные функции при связывании углеводов. Установлено, что два наиболее консервативных остатка D и W в основном находятся в углевод-связывающих сайтах (Boraston A.B., 2004).

Хорошо исследован домен A (связывающий сахарозу), который играет важную роль в акте катализа реакции гидролиза субстрата. Показано, что домен G, локализованный в щели между 5-лопастным  $\beta$ -пропеллером и  $\beta$ -сандвичем вдали от активного центра, также играет важную роль в акте катализа реакций гидролиза инулина и сахарозы. Замена консервативного Ser 469 в домене G на структурно- и биохимически сходный остаток Thr 469 приводила к уменьшению гидролитической активности инулиназы по отношению к сахарозе, инулину и левану. Замена Ser 469 на гидрофобный остаток Val 469 практически полностью блокировала ее ферментативную активность (Goosen C., 2007).

Показано, что в состав активного центра инулиназы из *Aspergillus awamori* входят карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты и имидазольная группа гистидина. Карбоксильная группа в молекуле инулиназы ассоциирована с имидазольной группой гистидина водородной связью. Таким образом, в расщеплении инулина важную роль играет электрофильно-нуклеофильная система карбоксил-имидазол. Предполагают, что в активный центр экзоинулиназ *Aspergillus niger* и *Penicillium species* входят карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот. Определение величин  $pK$ , теплоты ионизации, ингибирование *n*-хлормеркурийбензоатом, фотоокисление в присутствии метиленового голубого позволили заключить, что в активный центр фермента, выделенного из *Bacillus polymyxa*, входят имидазольная и сульфгидрильная группы (Жеребцов Н.А., 1999, 2003, Ohta K., 1998).

Эндоинулиназа из *Penicillium species* полностью инактивировалась при модификации N-бромсукцинимидом. Это позволяет предположить, что, по крайней мере, один остаток триптофана может быть в составе активного центра фермента. Два остатка в составе последовательности WMN(D/E)PN

Trp 17 и Met 18 являются консервативными для некоторых эукариотических фруктозилгидролаз, включая эндоинулиназу из *Aspergillus ficuum*. Роль Trp 17 в каталитическом механизме эндоинулиназы до сих пор не ясна. Вероятно, значение Trp 17 состоит в образовании водородной связи с гидроксильной группой C<sub>6</sub> кольца фруктозы, входящей в состав цепи инулина, что обеспечивает правильную ориентацию субстрата в активном центре указанной эндоинулиназы (Парк С., 2003).

Идентичность аминокислотных последовательностей эндоинулиназы из различных продуцентов по отношению к родственным ей ферментам представлена в табл. 2.

Экзоинулиназа и эндоинулиназа отличаются своей активностью, что обусловлено различием в строении их активных центров. Исследование эндоинулиназы из *Aspergillus niger* и экзоинулиназы из *Bacillus stearothermophilus* показывает, что на поверхности макромолекул ферментов присутствуют определенные аминокислоты, которые создают сложную сеть взаимодействий с несколькими другими остатками активного центра энзима, играя важную роль в поддержании его конформации, способствующей селективности фермента (Basso A., 2010). Поскольку экзоинулиназа из *Penicillium* sp. TN-88 образует больше водородных связей с субстратом (по сравнению с эндоинулиназами), она демонстрирует высокую эффективность катализа, стабильность фермент-субстратного комплекса по сравнению с эндоинулиназами. Экзоинулиназа образует активный сайт, богатый аминокислотой Asp и состоящий из Asp 22, Asp 128, Asp 179 и Ser 84 (Singh P.K., 2012). В активный центр энзима из *Pichia pastoris* X-33 входят Asp 30 и Glu 215 (Ma J.Y., 2016).

Основные отличия между структурами эндоинулиназы из *Aspergillus niger* и экзоинулиназы из *Bacillus stearothermophilus* были обнаружены в активном центре ферментов. Экзоинулиназы имеют Asp-остаток в активном центре (Asp 24 в ферменте из *B. stearothermophilus* и Asp 41 – в *A. awamori*), который должен отвечать за нуклеофильную атаку (рис. 3) (Nagem R.A.,

2004), в активном центре эндоинулиназы Asp заменяется остатком Glu 43 (рис. 4). Из-за большого размера субстратов каталитический домен в молекуле эндоинулиназы довольно широк и составляет около 90 из 516 остатков. Для сравнения, каталитический домен у экзоинулиназы существенно меньше и включает 42 из 493 аминокислот (Basso A., 2010).

Таблица 2

Идентичность аминокислотных последовательностей эндоинулиназ и родственных им ферментов из различных продуцентов

Продуцент эндоинулиназы	Фермент для сравнения	Идентичность, %	Источник литературы
<i>Aspergillus</i> sp.	инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	97	(Uhm T.B., 1998, Ohta K., 1998, Raba'atun Adawiyah S., 2011)
	инулиназа из <i>Aspergillus niger</i> inuA	96	
	инулиназа из <i>Aspergillus niger</i> inuB	96	
	эндоинулиназа из <i>Penicillium s purpurogenum</i>	69	
	экзоинулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	33	
	экзоинулиназа из <i>Kluuveromyces maxianus</i>	22	
<i>Arthrobacter</i> species S37	эндоинулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	15	(Kang S., 1999, Laloux O., 1991, Martin I., 1987, Ohta K., 1998, Onodera S., 1996, Taussig R., 1983, Uhm T.B., 1998)
	эндоинулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	15	
	эндоинулиназа из <i>Penicillium purpurogenum</i>	16	
	экзоинулиназа из <i>Kluuveromyces maxianus</i>	14	
	леваназы из <i>Bacillus subtilis</i>	16	
	инвертазы из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	



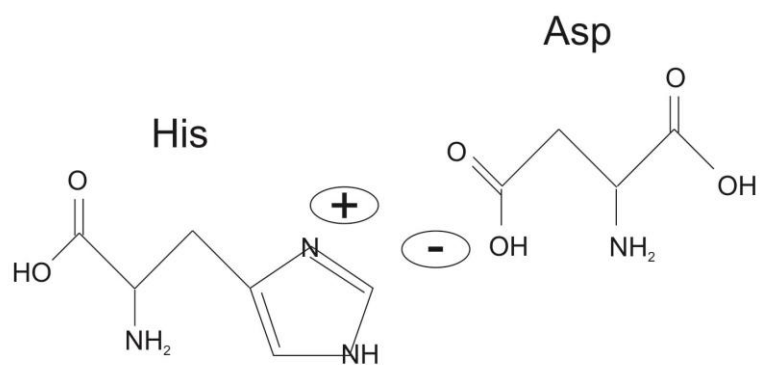


Рис. 3. Фрагмент активного центра экзоинулиназы

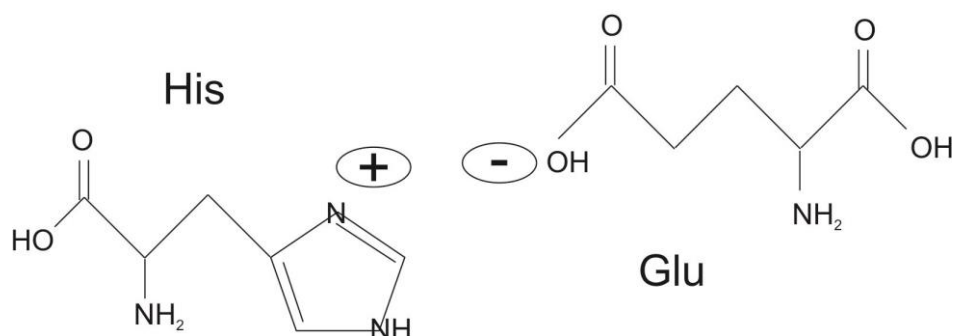


Рис. 4. Фрагмент активного центра эндоинулиназы

Общей особенностью структур эндоинулиназы и экзоинулиназы является наличие участка Arg-Asp-Pro (RDP), последовательность которого сохраняется и в других классах ферментов, таких как фруктозил-трансферазы или инвертазы. Предполагается, что присутствие этого фрагмента важно для распознавания пиранозидного кольца, что необходимо для обеспечения специфичности фермента в отношении фруктопиранозидных остатков (Nagem R.A., 2004, Basso A., 2010).

Несколько остатков, расположенных вблизи двух каталитически значимых глутаминовых кислот, Glu 43 и Glu 233 (Парк С., 2003, Pouyez J., 2012), могут играть роль в каталитическом механизме действия эндоинулиназы. К этим остаткам относятся Met 41 и Asn 42 в консервативном фрагменте WMN(D/E)PN; Pro 62, Trp 67 и Ile 70 из так называемого цикла 1; Asn 265 в конце петли 3; Arg 295 и Asp 298 в начале

цикла 4 и Arg 175 из консервативного фрагмента RDP. Определенную роль играют остатки Gln 59 и Phe 99. Эти 11 остатков были замещены в ферменте дикого типа из *Aspergillus ficuum* прямым мутагенезом на Gly или Ala, чтобы потенциально увеличить размер каталитического кармана. Наконец, хотя это приводит к сильному снижению активности (Park et al., 2003), каталитически значимый Glu 43 в консервативном фрагменте WMN(D/E)PN был заменен на Asp, который является меньшим по размеру остатком и сохраняется в большинстве гидролаз из семейств GH 32, 43, 62 и 68 (Pons T., 2004).

Активный центр инулиназы из *Aspergillus ficuum* отличается от активных центров других инулиназ. Нуклеофильный остаток представляет собой глутамат в эндоинулиназе, в отличие от других ферментов, где он представлен аспаратом (Pouyez J., 2012). Thr 100, близкий к каталитически активным остаткам в эндоинулиназе, заменяется серином в других белках. Вход в активный центр у экзоинулиназы обозначен глутаматом в отличие от эндоинулиназы, где эту функцию выполняет глицин (Gly 196). В положении 298 остаток Tyr, консервативный среди других ферментов семейства (Verhaest M., 2006), отсутствует в инулиназе из *Aspergillus ficuum* и заменен остатком Asp. Кроме того, остаток цистеина, следующий остаток после каталитически значимого Glu, присутствует во всех ферментах, кроме эндоинулиназы, где он замещен валином (Val 234) (Alberto F., 2004, Pouyez J., 2012).

## 1.2. Механизм ферментативного гидролиза полифруктанов инулиназами

В современных представлениях о механизме катализа и строении фермент-субстратных комплексов придается особое значение гетерогенности молекулы фермента, развивается гипотеза «активной полости», «углубления», «кармана», согласно которой молекула субстрата или ее фрагмент втягивается внутрь полости, где осуществляется акт катализа. Молекула субстрата или ее фрагмент удерживается в этой полости

надлежащим образом расположенными боковыми группами аминокислот, локализованных на стенках полости. Эта гипотеза гармонично вписывается в теорию индуцированного соответствия активного центра фермента и субстрата (Жеребцов Н.А., 1999).

Гипотетически механизм разрыва  $\beta$ -2,1-фруктозидных связей в инулине под действием инулиназы можно представить следующим образом (рис. 5). Атом кислорода имеет больший отрицательный индукционный эффект, чем атом углерода. Поэтому происходит перераспределение плотности электронного облака в  $\beta$ -2,1-фруктозидной связи. За счет оттягивания электронов к атому кислорода  $\beta$ -2,1-фруктозидной связи и к атому кислорода фуранозного кольца фруктозы атом  $C_2$  будет иметь меньшую плотность электронного облака. Иными словами, атом  $C_2$  обладает положительным индукционным эффектом. Под действием нуклеофильно-электрофильной пары карбоксил-имидазолий происходит оттягивание электронов к «точке закрепления» имидазольной группы и их уход от «точки закрепления» карбоксила, что приводит к разрушению связи (Жеребцов Н.А., 1999, Ковалева Т.А., 1998, Корнеева О.С., 2001).

Главная реакция, характерная для гликозидаз, включает протонирование гликозидного кислорода с последующей нуклеофильной атакой атома углерода субстрата (сахара) карбоксилатной группой. Нуклеофильная атака осуществляется консервативным остатком аспарагиновой кислоты в первой лопасти  $\beta$ -пропеллера (Asp 41), где остаток глутаминовой кислоты в четвертой лопасти  $\beta$ -пропеллера (Glu 241) действует как донор протона. Ферменты клана GH-J также имеют группировки, которые обеспечивают необходимую конфигурацию субстрата. Этот механизм отличается у белков семейства GH43 ( $\beta$ -ксилозидазы,  $\beta$ -ксилаказы,  $\alpha$ -D-арабиназы) и GH62 ( $\alpha$ -D-арабинофуранозидазы) (Pons T., 2004).

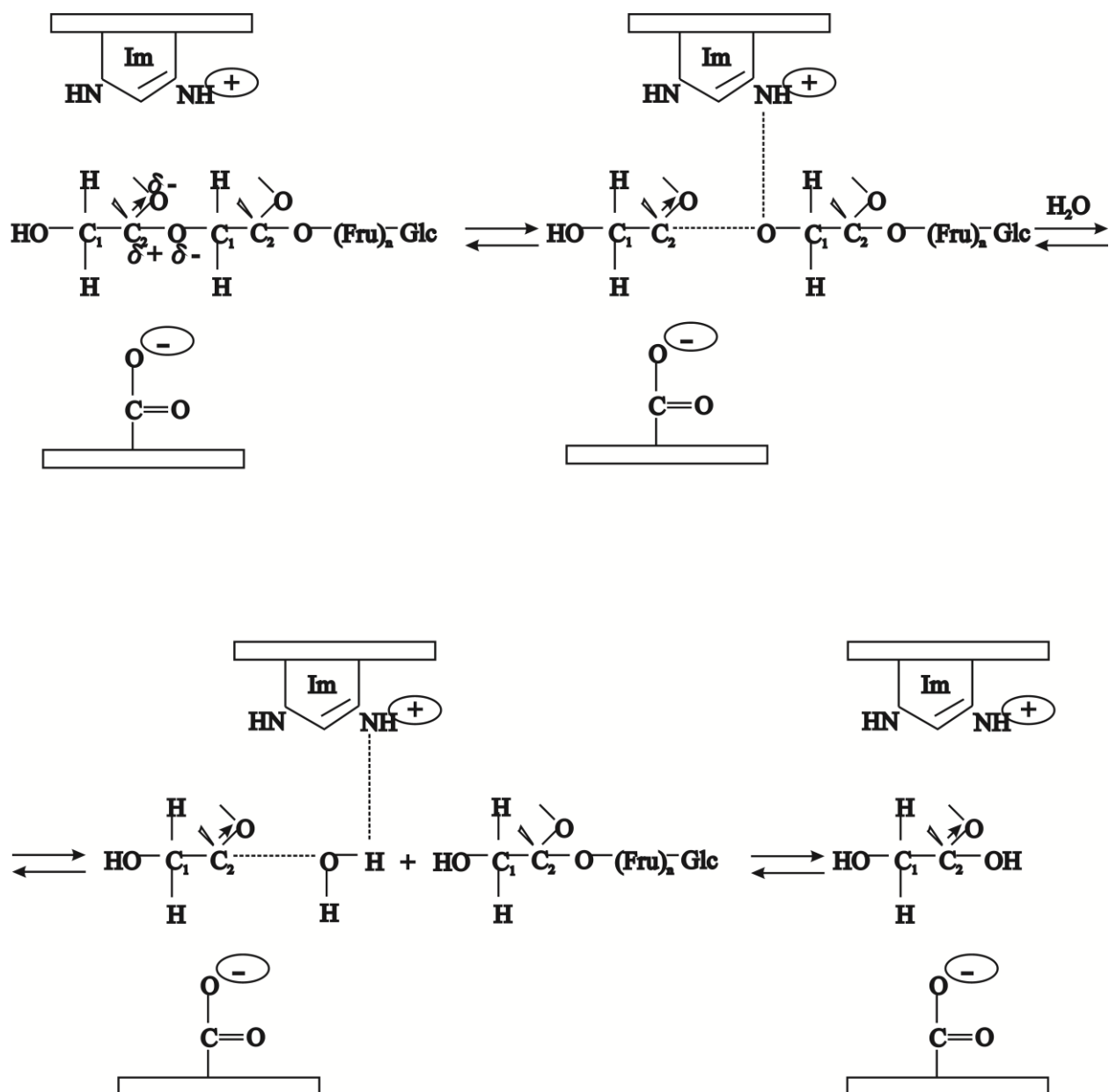


Рис. 5. Гипотетический механизм разрыва  $\beta$ -2,1-фруктозидных связей в инулине под действием инулиназы: Fru – остаток молекулы фруктозы; Glc – остаток глюкозы;  $\delta^+$  и  $\delta^-$  – остаточный заряд; стрелки отражают возможную передачу электронной плотности; шриховые линии обозначают щель в активном центре фермента (Корнеева О.С., 2001).

В активном центре донор протона располагается на расстоянии длины водородной связи от гликозильного кислорода в семействах GH32, GH68 и GH43. Расстояние между двумя каталитическими остатками у ферментов семейств GH32 и GH68 составляет 4,5-5,5 Å, а у энзимов семейства GH43 –

9,0-9,5 Å (Pons T., 2004). По сравнению с семейством GH68 у ферментов из GH32 присутствует дополнительный  $\beta$ -сандвич – домен с неизвестной функцией. M. Verhaest et al. (2005), исследуя фруктан 1-экзогидролазу Па из *Cichorium intybus*, наблюдали присоединение четырех молекул глицерола в щели между 5-лопастным  $\beta$ -пропеллером и  $\beta$ -сандвичем, вероятно,  $\beta$ -сандвич выполняет функцию присоединения и связывания полимерных фруктанов (Verhaest M., 2005, Goosen C., 2007).

Хорошо изучены каталитические роли консервативных аминокислотных остатков (Glu 323, Asp 460 и Glu 519) для инулиназы из *Arthrobacter* species S37 (EnIA). Эффективность фермента ( $k_{cat}/K_m$ ), выделенного из мутантов E323A и E519A, была значительно ниже, чем у дикого типа из-за существенного уменьшения значения  $k_{cat}$ , но не из-за изменений  $K_m$ , что, вероятно, связано с предполагаемыми ролями Glu 323 и Glu 519 как нуклеофила и кислотно-основного катализатора соответственно. Мутант D460A был полностью неактивен, тогда как мутанты D460E и D460N проявляли в некоторой степени каталитическую способность. Это показывает, что Asp 460 является каталитически важным остатком. Исследования зависимости активности инулиназы от pH среды позволили установить, что  $pK_a$  кислотно-основного катализатора уменьшился от 9,2 для фермента дикого типа до 7,0 для мутанта D460E, поэтому можно предположить, что остаток Asp 460 взаимодействует с Glu 519 и поднимает его  $pK_a$ . Моделирование на основе гомологии и молекулярной динамики для фермента дикого типа и мутанта D460E проливает свет на структурные роли Glu 323, Asp 460 и Glu 519 в каталитической активности фермента (Kim K.Y., 2008).

Три аминокислотных остатка Glu 56, Asp 189 и Glu 246 могут быть выделены в качестве каталитической триады эндоинулиназы из *Aspergillus fumigatus* CL1. Glu56 – нуклеофильный остаток, Glu246 – донор протонов, Asp189 обеспечивает водородные связи с фруктозой (Chen M., 2015).

Для определения ключевых остатков в связывании и распознавании субстрата в семействах GH32 и GH68 и, особенно, в инвертазах и экзоинулиназах (Vandamme A.M., 2013) были проведены множественные анализы структур, связанных с лигандом, полученных путем сайт-направленного мутагенеза. До сих пор для эндоинулиназ (например, для инулиназы из *A. ficuum*), за исключением хорошо известных каталитически значимых остатков Glu43, Asp176 и Glu233, только остаток Trp40 был описан как существенный для протекания реакции гидролиза (Парк С., 2003). Было показано, что специфическое расщепление инулина эндоинулиназой образует инулотриозы и инулотетрозы в равных количествах.

Остаток Asp176 присутствует в активных центрах фруктан-метаболизирующих ферментов и инвертаз. Замена Arg175 из фрагмента RDP на Ala привела к полной потере активности, как было описано Chen H. et al. (2009) для инвертазы, и Kuzuwa S. et al. (2012) для экзоинулиназы из *Lactobacillus casei*. В инвертазе из *Arabidopsis thaliana*, связанной с клеточной стенкой, остаток Arg148 вместе с Asn149, Trp82 и Asp239 играет роль в стабилизации фруктозы (Lammens W., 2008). Аналогичная роль этих остатков в ориентации связывания субстрата предлагается для эндоинулиназы. Остатки пролина могут выступать в качестве структурных разрушителей  $\alpha$ -спиралей и как поворотные точки в  $\beta$ -листах. Pro62 лежит в начале цикла 1, который предположительно отвечает за увеличение каталитического центра эндоинулиназы (Vandamme A.M., 2013).

Было установлено значение ароматических аминокислотных остатков Trp40, Trp67 и Phe99 для связывания инулина (Парк С., 2003, Vandamme A.M., 2013). Из анализа фрагмента RDP методами молекулярной динамики стало очевидно, что помимо одной Н-связи с субстратом, эти три остатка не играют прямой роли в фермент-субстратных взаимодействиях в экзо- и эндоинулиназах. Тем не менее, они создают сложную сеть взаимодействий с несколькими остатками активного центра, выполняя важную функцию в

поддержании его конформации и, следовательно, опосредованно ответственны за селективность фермента (Basso A., 2010).

Vandamme A.M. et al. (2013) выявили остатки, которые играют критическую роль в проявлении активности инулиназы: Pro62, Trp67, Gln59 и Arg175. Они также обнаружили, что Asn42 выполняет важную функцию в регулировании специфичности продукта.

Таким образом, исследований, касающихся непосредственно анализа структурных особенностей инулиназ, очень мало. Твердо не установлены родственные и эволюционные связи не только среди всех гликозидаз, но и внутри группы инулиназ, выделенных из различных продуцентов. Механизм расщепления инулиназой гликозидных связей до конца не изучен: не описаны и не систематизированы оптимальные условия регулирования их функциональной активности. Ряд ученых утверждают, что ведущую роль в акте катализа играют карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты и имидазольная группа гистидина. Другие исследователи предполагают, что в активный центр фермента входят карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, имидазольная и сульфгидрильная группы, остатки триптофана.

В представленной работе мы раскрываем проблемы пространственной организации инулиназ из различных продуцентов, приводим данные, касающиеся изучения фермент-ферментных взаимодействий в условиях различного микроокружения, в частности при иммобилизации инулиназы на матрице нерастворимых полимерных носителей. В диссертации обсуждаются взаимосвязи физико-химических характеристик молекул инулиназ с их способностью образовывать надмолекулярные комплексы. Кроме того, отдельно подчеркивается, что возможность процессов ассоциации-диссоциации молекул фермента необходимо учитывать при создании гетерогенных (иммобилизованных) ферментных препаратов.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

Объектами исследования были инулиназы, выделенные из культуры дрожжей *Kluyveromyces marxianus* и клубней топинамбура *Helianthus tuberosus* на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета (Холявка М.Г., 2010), а также коммерческий препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия). В качестве субстрата для гидролиза использовали инулин фирмы MP biomedical со следующими характеристиками: растворимость 100 мг / 1 мл воды; содержание свободной глюкозы < 0,01 %; содержание фруктозы – 0,02 %; отношение фруктоза / глюкоза 35:1; температура плавления – 158-165 °С.

В качестве носителей для иммобилизации фермента применяли ионообменные смолы: катиониты КУ-2, КУ-2-8, КУ-2-8чС (Россия), ИМАС-НР111 (США), аниониты АВ-17-2П, АМ 21А, АВ-16-ГС, ЭДЭ-10П, АН-12П (Россия), PUROLITE A100 (Великобритания); ионообменные волокна: амфолит КОПАН-90 (Белоруссия), анионит ВИОН АН-1, катионит ВИОН КН-1 (Россия), а также хитозан (Россия).

Сульфокатионит КУ-2 с активными группами  $-\text{SO}_3\text{H}$  ( $\text{pK} \leq 1-2$ ) синтезируется на основе стирола и дивинилбензола, обладает высокой термической и химической стабильностью, нерастворим в большинстве органических растворителей. Рабочий диапазон рН от 0-1 до 13-14, максимальная рабочая температура – 120-130 °С (Лурье А.А., 1972).

Катионит КУ-2-8 с активными сульфогруппами получают сульфированием гранульного сополимера стирола с 8 % дивинилбензола. Высокая химическая стойкость к щелочам, кислотам, окислителям, возможность использования при температурах 110-120 °С, механическая прочность, обменная емкость, мало зависящая от изменения рН среды, обусловили его широкое применение в различных отраслях промышленности



и народного хозяйства для смягчения воды и удаления из нее солей, в гидрометаллургии для выделения цветных и редких металлов, для очистки возвратных и сточных вод, в химической промышленности для разделения и очистки различных соединений (Бруцкус Т.К., 1975). Катионит КУ-2-8чС представляет собой модификацию КУ-2-8 и отличается от последнего особой чистотой. Ионит применяется для глубокого обессоливания воды, разделения различных элементов, очистки витаминов и других фармацевтических препаратов, в пищевой промышленности и медицине (Бруцкус Т.К., 1975).

Сильноосновный анионит АВ-17-2П с активными группами  $-N^+(CH_3)_3$  образуется при взаимодействии хлорметилового сополимера стирола и дивинилбензола с триметиламином. Этот ионообменник характеризуется механической прочностью, химической и биологической устойчивостью, достаточной проницаемостью для молекул фермента и субстрата, и поэтому он широко используется для очистки сахарных сиропов в промышленной технологии. Рабочий диапазон рН от 0 до 12-14, максимальная рабочая температура 50 °С (Лурье А.А., 1972).

По классификации ионообменных смол АВ-16-ГС является сильноосновным анионитом, синтезированным путем поликонденсации полиэтиленполиамина, эпихлоргидрина и пиридина. Ионит является полифункциональным, в качестве ионогенных групп содержит вторичные и третичные аминогруппы алифатического ряда и пиридиновые группы. Данный носитель относится к макропористым смолам аналитического сорта и используется для обесцвечивания сахарных растворов. Химически устойчив к кислотам и щелочам, неустойчив к действию окислителей. Рабочий диапазон рН от 0 до 8-9, носитель рекомендуется использовать при температуре не выше 95 °С. Анионит применяется в сахарной промышленности, в производстве лимонной кислоты, для удаления сильных кислот, очистки сточных вод от детергентов (Лурье А.А., 1972, Бруцкус Т.К., 1975).

Анионит ЭДЭ-10П – промежуточной основности по сравнению с вышеописанными полимерами. Представляет собой полифункциональный анионит, содержит вторичные и третичные аминогруппы алифатического ряда и около 20 % групп четвертичных аммонийных оснований. ЭДЭ-10П получают поликонденсацией полиэтиленполиаминов с эпихлоргидрином. Максимальная рабочая температура – 35-45 °С. Устойчив к действию кислот и щелочей, неустойчив к действию окислителей. Анионит применяют для деминерализации воды, очистки гидролизных растворов, для осветления нативных растворов антибиотиков, получения витаминов, очистки глюкозных сиропов, молочной сыворотки, спирта (Лурье А.А., 1972, Бруцкус Т.К., 1975).

АМ 21А – сильноосновный анионит полистирольной природы, устойчив к действию окислителей. Рабочая температура – 60-70 °С (Лурье А.А., 1972).

Ионообменные волокна ВИОН – новые высокоэффективные материалы для очистки воздуха от ряда токсичных и агрессивных газов, а также аэрозолей. Основные преимущества волокон ВИОН заключаются в следующем: степень очистки ионита 98 %, скорость сорбции и регенерации в 10-15 раз выше, чем для зернистых материалов, высокая объемная емкость, селективность, гидролитическая устойчивость к действию кислот, щелочей, регенерирующих агентов (сохранение обменной емкости после 100 и более циклов сорбция-регенерация).

Волокно ВИОН КН-1 – катионнообменное, карбоксилсодержащее, хемосорбционное, слабокислотное волокно с трехмерной сеткой. Полимер нашел широкое применение как дезодорирующий и ранозаживляющий материал. Характеризуется гидрофильностью, высокой скоростью сорбции, высокой гигроскопической устойчивостью, высокоразвитой поверхностью. Дезинфицирует и очищает рану путем нейтрализации токсических веществ, не прилипает к раневой поверхности, нормализует рН, адсорбирует гнойноспецифический запах, выводит фиброгнойный экссудат, не вызывает

раздражения и аллергии, что благоприятно сказывается на росте грануляций и эпителизации, сокращает расход лекарственных препаратов и перевязочных материалов, обладает антибактериальными и антигрибковыми свойствами. Применение волокна эффективно при терапии пролежней и гнойных ран, позволяет сократить сроки лечения.

Некоторые разновидности волокон ВИОН регенерируют ткань за счет окислительно-восстановительного процесса, очищают рану путем окисления токсических веществ в области раневой поверхности, выводят фибринозный экссудат за счет дренажных свойств, благоприятствуют эпителизации и грануляции тканей.

Технология синтеза ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1 известна и легко осуществима на заводах по производству полиакрилонитрильного волокна. Сочетание недорогих компонентов позволит сделать доступным этот технологичный метод для отечественных лабораторий.

Волокно-амфолит КОПАН-90 содержит одновременно низкоосновные аминогруппы и карбоксильные группы.

Анионит PUROLITE является аналогом ионитов группы АН и содержит в качестве ионогенных групп вторичные и третичные аминогруппы алифатического ряда.

Хитозан является сополимером 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозамина и 2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкозамина, связанных β(1→4) связями. Функциональные свойства этих катионных полиэлектролитов зависят от полидисперсности, молекулярной массы, микроструктуры (распределения мономеров по длине цепи), степени деацетилирования. Молекулы хитозана содержат гидроксильные и аминогруппы, его полимерная матрица позволяет иммобилизовать ферменты, как на поверхности сетки, так и внутри нее. Производные хитозанов характеризуются биосовместимостью, биоразлагаемостью, слабой иммуногенностью, нетоксичностью. Хитозан является слабым основанием с  $pK_a = 6,5$ , что близко к значению  $pK_a$  остатков D-глюкозамина. Пространственно-структурированные хитозаны

пользуются значительным спросом в медицине. Наблюдается интенсивное развитие исследований, связанных с применением пространственно-структурированных хитозанов в качестве носителей лекарственных субстанций в виде гелей, гранул, микрочастиц, микросфер. К настоящему времени в мировой и российской литературе накоплен значительный материал в области получения лекарственных препаратов, в состав которых входит хитозан и его производные. Дисперсию наночастиц хитозана успешно использовали для адсорбции анионных лекарственных препаратов с целью регулирования процесса их высвобождения в организме (Скрябин К.Г., 2002, Сливкин Д.А., 2011, Zakharova L.Ya., 2015).

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Электрофорез белков по модифицированному методу Дэвиса

Гомогенность полученных фракций фермента доказывали путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по модифицированному методу Дэвиса. Содержание акриламида в мелкопористом геле составляло 7,5 %, в крупнопористом геле – 4 %. На пластину наносили не более 200 мкл образца, сверху наслаивали электродный буфер (трис-глициновый, pH 8,3). В качестве маркера электрофоретического фронта использовали бромфеноловый синий. Разделение проводили в камере для вертикального электрофореза белков и нуклеиновых кислот VE-2M («Хеликон», Россия). Электроды присоединяли к источнику тока «Эльф-8» («ДНК-Технология», Россия). Образцы перед нанесением на концентрирующий гель смешивали с антиконвекционной средой в соотношении 1:1. В качестве антиконвекционной среды использовали 40 % раствор сахарозы. Процесс осуществляли в холодной камере при температуре 0-4 °С. По окончании электрофоретического разделения производили окрашивание белковых полос нитратом серебра по методу М.В. Нестеренко (Nesterenko M.V., 1994).

Краситель, не связанный с белком, отмывали, помещая пластину в 7 % раствор ледяной уксусной кислоты.

Для построения калибровочной прямой на одну из дорожек наносили образец, содержащий белки-метчики: фосфоорилазу b (97 кДа), БСА (68 кДа), овальбумин (45 кДа), углеродистую ангидразу (30 кДа), ингибитор трипсина (21,0 кДа) и  $\alpha$ -лактальбумин (14,4 кДа). Калибровочную прямую строили в координатах: по оси ординат – десятичный логарифм молекулярной массы белка – метчика, по оси абсцисс – значение  $R_f$  белка.

Электрофорез на специфичность инулиназы осуществляли так же, как и обычный электрофорез, за исключением стадии проявления образцов. Пластинку для окрашивания сначала помещали в раствор инулина ( $5 \times 10^{-4}$  моль/л) на 20 мин при 50 °С. Затем ее переносили в раствор, содержащий резорцин (в концентрации 1 мг/мл) и соляную кислоту (30 %) и наблюдали за проявлением полос, соответствующих положению инулиназы в геле.

### 2.2.2. Метод Лоури

Метод основан на образовании комплексного окрашенного соединения в результате взаимодействия белка со щелочным раствором сульфата меди (биуретова реакция) и вольфраматом и молибдатом натрия (реакция Фолина на тирозиновые и цистеиновые радикалы) (Lowry O.H., 1951). Метод Лоури является наиболее чувствительным методом количественного определения белка.

Для иммобилизованной инулиназы использовали модифицированный метод Лоури. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа для разрушения связей между матрицей носителя и молекулой фермента иммобилизованный препарат обрабатывали раствором  $K_2Na$ -тартрата, приготовленном на 1 М NaOH при 50 °С в течение 10 мин.

### 2.2.3. Метод определения каталитической активности инулиназы

Метод основан на выявлении редуцирующих веществ, освобождающихся в процессе гидролиза молекул инулина под действием фермента инулиназы (Ермаков А.И., 1987). При нагревании раствора, содержащего фруктозу, с сильными кислотами (в частности, с соляной кислотой) этот моносахарид превращается в оксиметилфурфурол, который образует комплексное соединение вишнево-красного цвета с двумя молекулами резорцина. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию оксиметилфурфуrolа (а, следовательно, фруктозы) в растворе. Концентрацию фруктозы в гидролизате определяли по калибровочной прямой на основе измерения величины оптической плотности раствора при длине волны 540 нм. За единицу активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль фруктозы за 1 мин.

### 2.2.4. Методика подготовки к работе ионообменных смол

Для предотвращения растрескивания гранул навески ионообменных смол помещали в насыщенный раствор NaCl на 3-4 часа, затем сорбент переносили в вертикальную колонку и промывали дистиллированной водой. Для удаления минеральных примесей смолу обрабатывали сначала растворами соляной кислоты в количестве 5 объемов на 1 объем смолы в нарастающей концентрации (0,5; 1; 2; 3 моль/л) до отсутствия ионов железа, затем обработку HCl повторяли при соответствующем уменьшении концентрации кислоты и отмывали образцы до нейтральной реакции дистиллированной водой. Следующей стадией подготовки ионитов-носителей была обработка препаратов растворами гидроксида натрия в нарастающей концентрации в диапазоне 0,1-0,25 моль/л, затем смолы вновь отмывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Для более

полного удаления примесей кислотнo-щелoчную обработку смол проводили тpоекpатно. После очистки иoнообменник переводили в требуемую иoнную форму. Для перевода катиoнообменника в H-форму использовали раствор HCl, для перевода аниoнообменника в OH-форму – раствор щелoчи, для получения соответствующих солевых форм (Na-форма, Cl-форма) применяли растворы хлоридов или других растворимых солей (Жуков А.Ф., 2001, Горбунов Н.В., 1978, Полянский Н.Г., 1976). Подготовленный таким образом носитель высушивали при комнатной температуре и хранили в посуде с плотно притертой крышкой.

#### 2.2.5. Подготовка к иммобилизации иoнообменных волокон

Для набухания иoнообменные волокна помещали в дистиллированную воду на 3-4 часа, далее их обрабатывали растворами соляной кислоты переменной концентрации (0,5; 1,0; 1,5; 1,0; 0,5 моль/л) для удаления ионов железа. После отмывки образцов дистиллированной водой осуществляли их попеременную четырехкратную обработку 1 моль/л растворами NaOH и HCl с промежуточной промывкой дистиллированной водой.

#### 2.2.6. Методика сорбционной иммобилизации

5 г носителя оставляли на 12 часов при комнатной температуре в 50 мл ацетатного буфера. Для катиoнообменных полимеров значение pH буфера составляло 3,7 единиц, для аниoнообменных полимеров – 4,5 единицы, для амфолита мы применяли ацетатный буфер с обоими значениями pH. После этого к суспензии препарата добавляли 5 мл раствора инулиназы в том же буфере и перемешивали в колбе в течение 1,5 часов при 25 °C. Далее образцы центрифугировали 5 мин при 500 g. Осадок промывали ацетатным буфером (pH 4,5) до отсутствия в промывных водах белка. Контроль процедуры осуществляли при  $\lambda = 280$  нм. Содержание белка в иммобилизованном

препарате инулиназы определяли модифицированным методом Лоури, а активность – спектрофотометрическим методом.

### 2.2.7. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Раствор инулиназы (2 мл) подвергали диализу три раза против 1 л 0,1 М ацетатного буфера с рН 4,7 при + 4 °С. Молярную концентрацию белка оценивали спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции при 280 нм, равный 127 325 л/моль·см, рассчитанный по аминокислотной последовательности (UniProt P28999, Bergkamp et al., 1993).

Исследования в области дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) проводились на микрокалориметре Nano DSC (TA Instruments) со скоростью нагрева 1 К/мин и избыточным давлением 4 бар. Концентрация инулиназы составляла 1,46 мг/мл в 0,1 М ацетатном буфере с рН 4,7. Измерения DSC и расчет удельной теплоемкости белка ( $C_p$ ) выполнялись, как описано в работе Пермякова С.Е. (2012). Частичный молярный объем инулиназы оценивали, согласно работе Häckel et al. (1999).

### 2.2.8. Визуализация молекул методом атомно-силовой микроскопии

Для приготовления образцов пластинки свежесколотой слюды (1,5×1,5 см) в течение 5 мин инкубировали с 5 мл буферного раствора фермента или его субъединиц (рН 4,7). Излишки жидкости аккуратно удаляли и высушивали полученные образцы в эксикаторе с влажностью 5-10 % в течение нескольких часов.

Изображение поверхности молекулы инулиназы и ее субъединиц получали в Лаборатории наноскопии и нанотехнологии Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета (ЦКПНО ВГУ) на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO. В работе с ферментом дрожжевого



происхождения использовали зонды NSG 20 и NSG 11, для экспериментов с растительными энзимами применяли кантилеверы марки HA\_NC.

#### 2.2.9. Определение доли агрегированных молекул

Ферментные образцы инкубировали при температурах 40, 50, 60, 70 и 80 °С в течение 10-60 мин, быстро охлаждали и центрифугировали 20 мин при 25000 g на центрифуге Jouan MR23i (Франция). Далее измеряли оптическую плотность супернатанта при 280 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Япония). Образцы, не подвергавшиеся нагреванию, служили в качестве контроля. Долю агрегированных молекул ( $\gamma_{agg}$ ) определяли как  $(1-D/D_0)$ , где  $D_0$  – оптическая плотность контрольных образцов, а  $D$  – экспериментальных (Golub N.V. et al., 2008).

#### 2.2.10. Определение доли инактивированных молекул

Ферментные образцы инкубировали при температурах 40, 50, 60, 70 и 80 °С в течение 10-60 мин, быстро охлаждали и центрифугировали 20 мин при 25000 g на центрифуге Jouan MR23i (Франция). Далее измеряли активность препаратов инулиназы по методике, описанной выше. Образцы, не подвергавшиеся нагреванию, служили в качестве контроля. Долю инактивированных молекул ( $\gamma_{in}$ ) определяли как  $(1-A/A_0)$ , где  $A_0$  – каталитическая активность контрольных образцов, а  $A$  – экспериментальных (Golub N.V. et al., 2008).

#### 2.2.11. Подготовка и анализ образцов методом инфракрасной спектроскопии

Регистрацию ИК-спектров неориентированных порошкообразных образцов осуществляли в ЦКПНО ВГУ с помощью спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия). Соотношение типов вторичной структуры для

инулиназы определяли, основываясь на законе Бугера-Ламберта-Бера, из уравнения

$$D = -\lg T = -\lg I/I_0 = \lg I_0/I = \varepsilon cl \quad (1),$$

где  $I$  – интенсивность света, прошедшего через образец;  $I_0$  – интенсивность света, падающего на образец;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции, л×моль<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>;  $c$  – концентрация исследуемого вещества, моль/л;  $l$  – длина оптического пути образца, см;  $D$  – оптическая плотность образца,  $T$  – коэффициент светопропускания.

#### 2.2.12. Определение размеров молекул методом динамического светорассеяния

Размеры инулиназы и ее субъединиц в экспериментах по исследованию закономерностей образования надмолекулярных комплексов и влиянию УФ-света на указанные объекты мы определяли методом динамического светорассеяния на приборе Photocor complex (ООО «Фотокор», Россия) ( $\lambda = 647$  нм, He/Ne-лазер). Форма белковой глобулы принималась за идеальную сферическую. Полученные данные обрабатывали в программе DynaLS.

В других экспериментах был использован прибор Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632,8 нм) собирали под углом 173° при температуре 25 °С. Концентрация белка составляла 1,0-1,5 мг/мл в 0,1 М ацетатном буфере с рН 4,7. Образец предварительно пропускали через фильтр Millipore с диаметром пор 0,45 мкм. Для расчета коэффициента диффузии  $D$  использовались следующие параметры решения: показатель преломления  $n_D$  1,333, динамическая вязкость  $\eta$  0,921 мПа (Kharat, S.J., 2008).

### 2.2.13. Молекулярный докинг

Подготовка структуры фермента для докинга выполнялась по стандартной для Autodock Vina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов.

Важно отметить, что эта инулиназа была кристаллизована вместе с некоторыми органическими лигандами, в том числе с D-маннозой, которая является активатором фермента. Известное местоположение этого сахара на поверхности фермента дало нам возможность прокалибровать выбранный пакет для докинга Autodock Vina (Trott O., 2010) на вполне конкретном примере комплекса маннозы и инулиназы. Несмотря на доверие к известному и популярному пакету Autodock Vina, в каждом расчете для новой мишени (молекулы белка) мы проводили своеобразный «тест применимости» этого пакета для конкретного расчета. Выражалось это в следующем. В качестве мишени, по возможности, выбирался белок, связанный с неким лигандом, решенный экспериментально (т.е. есть данные PCA), с наиболее высоким разрешением (менее 2 ангстрем, лучше около 1). Комплекс разбивался нами на составные части (белок, лиганд, вода, ионы буфера) – после чего проводится тестовый расчет докинга, направленный на сборку экспериментального комплекса путем моделирования. Если комплекс воспроизводился, это давало нам право утверждать, что результаты расчетов белка с интересующими нас лигандами тоже будут достоверными.

Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белка с помощью MGLTools, а также выбрана ячейка для расчета докинга, размеры которой составили  $68 \times 58 \times 60 \text{ \AA}$ . Центр молекулы белка находился в точке с координатами ( $x = 37,044$ ;  $y = -36,997$ ;  $z = -5,365$ ). Центр молекулы белка и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула инулиназы полностью была внутри расчетной области пространства. Эти же данные для мишени

использовались нами и для последующих манипуляций с выбранным набором лигандов.

#### 2.2.14. Тесты на гено- и цитотоксичность

В работе использовались бактериальный штамм *Salmonella typhimurium* TA 98-*hisD 3052, rfa, pKm 101, ΔuvrBbio* (НИИ по БИХС г. Купавна). Также в работе использовались раковые клетки молочной железы (MCF7). Культивирование бактерий проводили при соотношении объема среды к объему колбы 1:7,5 на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об/мин. Клетки *Salmonella typhimurium* TA 98 выращивали при температуре 37 °С. В качестве инокулята использовали 24 ч культуру, выращенную на среде LB. Клетки MCF7 культивировали на среде α-MEM без глутамина с добавлением стрептомицина и пенициллина.

Тест на мутагенность веществ заключается в том, что штаммы *Salmonella typhimurium*, ауксотрофные по гистидину, под действием мутагенов способны ревертировать к прототрофности. 5 мл ночной культуры *Salmonella typhimurium* TA98 переносили в 20 мл LB с ампициллином (25 мкг/мл) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °С с качанием до достижения культурой экспоненциальной фазы роста. Далее клетки концентрировали центрифугированием в течение 15 минут при 4000 об/мин, осадок ресуспендировали. Исследуемые соединения тестировали в трех концентрациях, отличающихся друг от друга в 2 раза. В качестве отрицательного контроля служит использованный в работе растворитель. В качестве положительного контроля использовался мутаген – азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ). В стерильные чашки Петри заливали нижний агар. В 3 мл верхнего агара вносили 0,1 мл бактериальной суспензии и исследуемые соединения. Содержимое перемешивали и наслаивали на нижний селективный агар. Чашки инкубировали при 37 °С. После 48 часов инкубации проводили учет результатов по индукции обратных мутаций к прототрофности по гистидину.

Если число колоний-ревертантов в опыте достоверно превышало таковое в контроле (растворителе) более чем в 2 раза, тестируемое вещество считали мутагенным.

Одним из способов выявления повреждений ДНК является так называемый SOS-хромотест – тест на определение индукции SOS-ответа бактериальной клетки на воздействие испытуемого агента. Для проверки испытуемых соединений ночную культуру бактерий *Salmonella uti* разводили в среде LB в 10 раз. Полученную культуральную жидкость разливали по 3 мл в пробирки и растили 4 часа в присутствии исследуемых соединений. Затем клетки собирали центрифугированием и определяли активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках.

Цитотоксичность соединений исследовали на линии MCF7 клеток рака молочной железы человека. Клетки инкубировали в 96-луночных планшетах на среде DMEM, дополненной глутамином, FBS и пенициллином и стрептомицином. В 96-луночные пластиковые планшеты (Cellstar Grenier bio-one No. 655 180) засеивали культуру клеток (4000 клеток на лунку) и добавляли исследуемые соединения. Затем культуру клеток инкубировали 24 часа при температуре 37°C и проводили MTS-тест. Этот тест основан на подавлении активности митохондриальной дегидрогеназы в присутствии токсичного соединения и способности окислять субстрат MTS 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий с использованием феназинметосульфата (PMS) в качестве электрон-связывающего реагента. Мы добавляли 100 мкл PMS раствора в 1 мл MTS непосредственно перед введением в культуральную жидкость, содержащую клетки, и аккуратно перемешивали. 10 мкл объединенного раствора MTS и PMS вносили в каждую лунку 96-луночного аналитического планшета, содержащего 50 мкл клеток в культуральной среде. Инкубировали при 37 °C в течение 1-4 часов в термостате с содержанием 5 % CO<sub>2</sub> до образования коричневой окраски в контрольных лунках.

### 2.2.15. Методика УФ-облучения образцов

УФ-облучение растворов инулиназы (в концентрации  $2 \times 10^{-5}$  моль/л) проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете ( $20 \pm 1$  °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30 и 40 минут. Доза облучения составляла соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

### 2.2.16. Статистическая обработка результатов экспериментов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась традиционным способом при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

## Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИНУЛИНАЗ

### 3.1. Структурные особенности инулиназ из различных продуцентов

Для понимания механизма действия инулиназ *in vivo* и внедрения ферментных препаратов в промышленное производство необходимо исследовать не только их физико-химические, но и структурно-функциональные свойства, особенности молекулярной и надмолекулярной организации, выявить оптимальные условия катализа.

Молекулярные массы инулиназ колеблются в широких пределах от 36,5 до 450 кДа (табл. 3). Две формы инулиназы из дрожжей *Kluuveromyces marxianus* СВР 6556 при использовании денатурирующего SDS-PAGE электрофореза давали при окрашивании пластин полидисперсную полосу между 87 и 102 кДа из-за различной степени гликозилирования молекул энзима. После обработки раствора эндо- $\beta$ -N-ацетил-глюкозоаминидазой (КФ 3.2.1.96), отщепляющей от белковой глобулы углеводные участки, молекулярная масса инулиназы составила 72 кДа. Таким образом, авторами было показано, что внеклеточная инулиназа из *Kluuveromyces marxianus* СВР 6556 является димером с массой в диапазоне от 165 до 180 кДа, а фермент, адсорбированный на клеточной стенке, – тетрамером с молекулярной массой 335-450 кДа. В обоих случаях в качестве одной субъединицы выступал полипептид массой 64 кДа и степенью гликозилирования от 26 до 37 %. Обе формы энзима были стабильными и без внешних воздействий не переходили друг в друга. По отношению к инулину тетрамер проявлял более низкую каталитическую активность, чем димер (Rouwenhorst R.J., 1990).

Таблица 3

## Молекулярные массы инулиназ

Продуцент	Молекулярная масса, кДа			Источник литературы
	Определена методом гель-хроматографии	Определена методом SDS-PAGE электрофореза	Метод не указан	
1	2	3	4	5
<i>Kluyveromyces</i> species Y-85 EI EII Eexo			42 65 57	(Wei W., 1997)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>			64	(Laloux O., 1989)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>			250	(Gupta A.K., 1994)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>			72	(Singh R.S. 2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> ATCC16045	77	57		(Kushi R.T., 2000)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 70106	200			(Pessoa A., 1997)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBP 6556	165-180 450	87-102 72 64 <sup>3</sup>		(Rouwenhorst R.J., 1990)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-303	63	54,8 и 8,4		<b>наши данные</b>
<i>Pichia pastoris</i> X-33 <sup>1</sup>		90	60,6 <sup>2</sup> 79,5 <sup>4</sup>	(Ma J.Y., 2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>			90 <sup>6</sup> 60 <sup>3</sup>	(Hong S.J., 2015)
<i>Yarrowia lipolytica</i> <sup>1</sup>		78,9	82,4 <sup>2</sup>	(Li Y., 2012)



Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5
<i>Aspergillus awamori</i>	87,7	76,9 и 10,1		(Ковалева Т.А., 2000)
<i>Aspergillus awamori</i> var. 2250		69, 63 <sup>3</sup>		(Arand M., 2002)
<i>Aspergillus ficuum</i>			64 66 54,8 <sup>3</sup>	(Uhm T.B., 1999)
<i>Aspergillus ficuum</i> ExoI ExoII ExoIII ExoIV ExoV EndoI EndoII EndoIII	75 76 74 74 74 64 64 64	76 74 74 - - 66 64 66		(Ettalibi M., 1987)
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06 ExoI ExoII ExoIII EndoIV EndoV			70 40 46 34 31	(Chen H., 2009)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	200	66 62,7 59,4	176,5 <sup>5</sup>	(Gill P.K., 2004)
<i>Aspergillus fumigatus</i> C11		55		(Chen M., 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	50	89	57 <sup>4</sup>	(Goosen C., 2007)
<i>Aspergillus niger</i>	315		85	(Uhm T.B., 1987)
<i>Aspergillus niger</i> 12		81	57,3 <sup>2</sup>	(Moriyama S., 2003)
<i>Aspergillus niger</i> M89 EI EII EIII EIV			102,6 97,9 62,5 36,5	(Ji Y., 1998)

Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5
<i>Penicillium</i> species			83 66 63	(Nakamura T., 1977)
<i>Penicillium</i> species TN-88 endo-inulinases exo-inulinases		81	68	(Moriyama S., 2002, Nakamura T., 1997)
<i>Penicillium</i> sp. NFCC 2768		68		(Rawat H.K., 2015b)
<i>Penicillium</i> <i>canescens</i> Inu1_Awa <sup>1</sup>		60		(Волков П.В., 2012)
<i>Penicillium</i> <i>canescens</i> InuA_Anig <sup>1</sup>		56		(Волков П.В., 2012)
<i>Penicillium</i> <i>janczewskii</i>			48 66 80	(Pessoni R.A., 1999, 2007)
<i>Arthrobacter</i> species H65-7	100	49		(Yokota A., 1991)
<i>Arthrobacter ilicis</i> OKU17B	50	27		(Kawamura M., 1988)
<i>Arthrobacter</i> <i>ureafaciens</i>	50	67		(Uchiyama T., 1973)
<i>Clostridium</i> <i>tyrobutyricum</i> <sup>1</sup>		56		(Jiang L., 2017)
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>		81		(Yedahalli S.S., 2016)
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>		59		(Zhou J., 2015)
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>		91,5		(Shen J., 2015)
<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> DSM 23505		130		(Petrova P., 2015)
<i>Arctium lappa</i> L. 1-FEH	80	65		(Ueno K., 2011)
<i>Cichorium intybus</i> 1-FEH I			от 60,5 до 72	(Claessens G., 1990)
<i>Cichorium intybus</i> 1-FEH II		64		(De Roover J., 1999)

1	2	3	4	5
<i>Cichorium intybus</i> L. 1-FEHw1 1-FEHw2		70		(Van der Ende W., 2003)
<i>Helianthus tuberosus</i> 1-FEH			75	(Marx S.P., 1997)

<sup>1</sup> инулиназа была экспрессирована в данный организм

<sup>2</sup> молекулярная масса установлена, исходя из первичной структуры

<sup>3</sup> после дегликозилирования

<sup>4</sup> молекулярная масса установлена методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)

<sup>5</sup> молекулярная масса установлена методом неденатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле

<sup>6</sup> молекулярная масса установлена иммуноблотингом

В литературе встречаются противоречивые (порой даже противоположные) результаты экспериментальных исследований относительно структурно-функциональных особенностей и надмолекулярной организации инулиназ. Это характерно не только для ферментов, выделенных из нескольких видов одного рода (в качестве примера могут послужить роды дрожжей *Kluyveromyces*, микромицетов *Aspergillus* и бактерий *Arthrobacter*), но даже для энзимов, синтезируемых штаммами одного и того же вида микроорганизма. Одни авторы утверждают, что инулиназа представлена в форме мономера (Kushi R.T., 2000, Haraguchi K., 1988), другие указывают на наличие четвертичной структуры в виде димера (Pessoa A., 1997, Kim K.Y., 2005, Kawamura M., 1988, Yokota A., 1991) или даже тетрамера (Rouwenhorst R.J., 1990, Gill P.K., 2004).

Для β-фруктофуранозидаз исследования надмолекулярной организации дают более четкую картину: энзимы из *Aspergillus niger* (P I), *Aspergillus niger* (P III), *Penicillium species* (P I), *Penicillium species* (P II), *Penicillium species* (P III) характеризуются кажущейся молекулярной массой 59, 54, 86, 63,5 и 66 кДа соответственно (Nakamura T., 1977, 1978).

В ряде работ показано, что ферменты из группы гликозидаз (GH 32) – фруктозилтрансфераза (1-SST) из *Aspergillus foetidus* (180 кДа) и инвертаза (SUC2) из *Aspergillus niger* N402 (210-240 кДа) функционируют в качестве димеров. Однако установлено, что фруктан-экзогидролазы (FEN), выделенные из высших растений, являются мономерами. В частности, это относится к 1-FEN I цикория (72 кДа), 1-FEN II цикория (64 кДа), 1-FEN топинамбура (75 кДа) и 1-FEN ячменя (62,5 кДа), FEN овса (33 кДа) (Claessens G., 1990, Henson C.A., 1998, Marx S.P., 1997).

Фруктозилтрансферазы (1-SST, 1-FFT) из *Cichorium intybus* и других продуцентов, а также некоторые растительные инвертазы являются гетеродимерами, образовавшимися при расколе одного отдельного монопептида. Показано, что разделение на субъединицы не возникает в ходе процесса очистки, более вероятно, что и мономерная, и гетеродимерная формы присутствуют в естественных условиях. Хорошо известно, что большинство растительных инвертаз и фруктозилтрансфераз, например, инвертаза и фруктозилтрансфераза (6-SFT) ячменя, трансферазы (1-SSTs) из *Helianthus tuberosus* и *Cichorium intybus* кодируются как белок с молекулярной массой 80 кДа, который в процессе созревания расщепляется на два – 60 и 25 кДа (Van den Ende W., 1996).

Установлено, что фруктан-1-экзогидролаза I (1-FEN I) из *Cichorium intybus* содержит не менее 10 потенциальных сайтов гликозилирования, что обуславливает отличия в значениях кажущейся молекулярной массы от 60,5 до 72 кДа. Подобные несоответствия характерны и для фруктозилтрансфераз (1-SST и 1-FFT) из цикория (Van den Ende W., 1996, Claessens G., 1990).

Инулиназы из микробных продуцентов также являются гликопротеинами (Zhang S.F., 2012). Фермент, выделенный из *Kluveromyces fragilis* ATCC 12424, содержит 66 % углеводов в составе молекулы, энзимы из *Aspergillus ficium*, *Aspergillus species*, *Aspergillus niger*, *Cryosporium pannorum*, *Kluveromyces species* Y-85 – от 20 до 40 % (Ettalibi M., 1987, Uhm T.B., 1999, Wei W., 1997, Workman W.E., 1983, Xiao R., 1989).

N-гликозилирование белков происходит в соответствии с последовательностью Asn-X-Ser/Thr (Petrescu A.J., 2004). Рекombинантная инулиназа из *Saccharomyces* sp. W0 имеет шесть предполагаемых консервативных сайтов N-гликозилирования (Zhang L.L., 2015), инулиназа из *Cryptococcus aureus* HYA – два консервативных сайта N-гликозилирования (Cao T.S., 2013). Все полученные сайты гликозилирования фактически расположены на поверхности белка в аналогичных положениях вблизи активного центра (Basso A., 2010).

Проанализировав ряд работ, можно сделать вывод, что исследования структурных особенностей инулиназ необходимо развивать и расширять, так как вопрос о существовании у этой группы энзимов надмолекулярной организации до сих пор окончательно не решен. Модели пространственной структуры предложены только для инвертазы из *Thermotoga maritima* (Alberto F., 2004, 2006), инвертазы из *Schwanniomyces occidentalis* (Alvaro-Benito M., 2010), инвертазы, связанной с клеточной стенкой из *Arabidopsis thaliana* (Verhaest M., 2006), экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (Arand M., 2002, Nagem R.A. 2004) и *Aspergillus ficuum* (Pouyez J., 2012),  $\beta$ -фруктофуранозидазы из *Bifidobacterium longum* (Bujacz A., 2011) и фруктан 1-экзогидролазы из *Cichorium intybus* (Verhaest M., 2005). Неизвестно, почему у одних организмов фермент функционирует в качестве мономера, а у других как димер или даже тетрамер. Остается открытым вопрос о целесообразности различной степени гликозилирования инулиназ, выделенных из ряда продуцентов.

В последние годы в научной литературе активно обсуждается вопрос о регулировании соотношения мономерных и димерных форм белковых макромолекул как эффективного пути направленного изменения функциональной активности сложных ферментных систем.

Ранее в нашей лаборатории кафедры биофизики и биотехнологии были получены гомогенные образцы инулиназы из дрожжей *Kluveromyces marxianus* Y-303, очищенные в 39,8 раза при выходе 13,5 %, а также

предложена методика для выделения и очистки трех фракций инулиназ (I, II и III) из клубней *Helianthus tuberosus*: степень очистки и выход фермента соответственно 55,7 и 5,4 % (I), 28,9 и 3,1 % (II), 21,6 и 1,9 % (III) (Холявка М.Г., 2010).

Для изучения надмолекулярной организации инулиназы из штамма *Kluuveromyces marxianus* Y-303 и получения доказательства предположения о существовании ее в дрожжевой клетке в форме димера нами был использован комплексный подход, заключающийся в сочетании электрофореза и гель-хроматографии с современными методами физико-химической биологии – атомно-силовой микроскопией, динамическим светорассеянием, инфракрасной спектроскопией. Аналогичные эксперименты были проведены с инулиназами I, II и III из *Helianthus tuberosus* и коммерческим препаратом инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия), который предварительно мы подвергали дополнительной очистке.

На электрофореграммах (рис. 6) мы наблюдали присутствие одной полосы, что свидетельствует о гомогенности полученных нами фракций ферментных препаратов, которые могли быть использованы для дальнейшего анализа: структурных и кинетических исследований, а также для определения их физико-химических свойств. Электрофорез на специфичность показал, что образцы проявляли инулиназную активность.

Размеры и молекулярные массы инулиназ различного происхождения представлены в табл. 4. В нативном препарате дрожжевой инулиназы наблюдалось наличие частиц с радиусом  $5,3 \pm 0,3$  и  $0,9 \pm 0,3$  нм (до 5 %); в образцах из *Aspergillus niger* – частиц с радиусами  $4,6 \pm 0,8$  и  $1,6 \pm 0,4$  нм (до 13 %); во фракции инулиназы I из топинамбура –  $3,1 \pm 0,3$  и  $1,1 \pm 0,2$  нм (до 15 %), которые соответствовали субъединицам фермента.

При добавлении додецилсульфата натрия ( $3,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) во фракции инулиназы II и III не происходило статистически достоверных изменений величин радиусов частиц, что подтверждало отсутствие надмолекулярной

организации у этих ферментов. Наши результаты согласуются с данными литературы: размер молекулы инулиназы из *Aspergillus awamori* по данным (Arand M., 2002) составлял  $6,5 \times 8,2 \times 13,6$  нм.

На трехмерном изображении поверхности молекулы инулиназы из дрожжей *Kluveromyces marxianus*, полученном с помощью атомно-силовой микроскопии, отчетливо видно, что данный белок имеет димерную структуру (рис. 7-9). Анализ профиля сечения молекулы позволил определить размеры инулиназы и ее субъединиц. «Длина» нативной глобулы намного превышала ее «высоту», возможно, что такое уплощение молекулы происходило за счет многоточечного связывания с поверхностью слюды заряженных аминокислотных остатков.

Методом атомно-силовой микроскопии наглядно продемонстрировано, что инулиназа из микромицета *Aspergillus niger* также является гетеродимером (рис. 10). Выявлено, что инулиназа I из клубней *Helianthus tuberosus* образует димеры (причем на изображении встречаются в равной степени как димеры, так и мономеры), а инулиназы II и III существуют в мономерной форме (рис. 11-13).

В следующей серии экспериментов мы попытались выявить роль процесса диссоциации молекулы фермента на субъединицы в проявлении функциональной активности инулиназ. Из табл. 5 видно, что активность инулиназ из всех исследуемых нами продуцентов в димерной форме ниже, чем суммарная активность их субъединиц. Это может быть связано с тем, что активные центры субъединиц белкового димера становятся стерически менее доступны для высокомолекулярного субстрата – инулина.

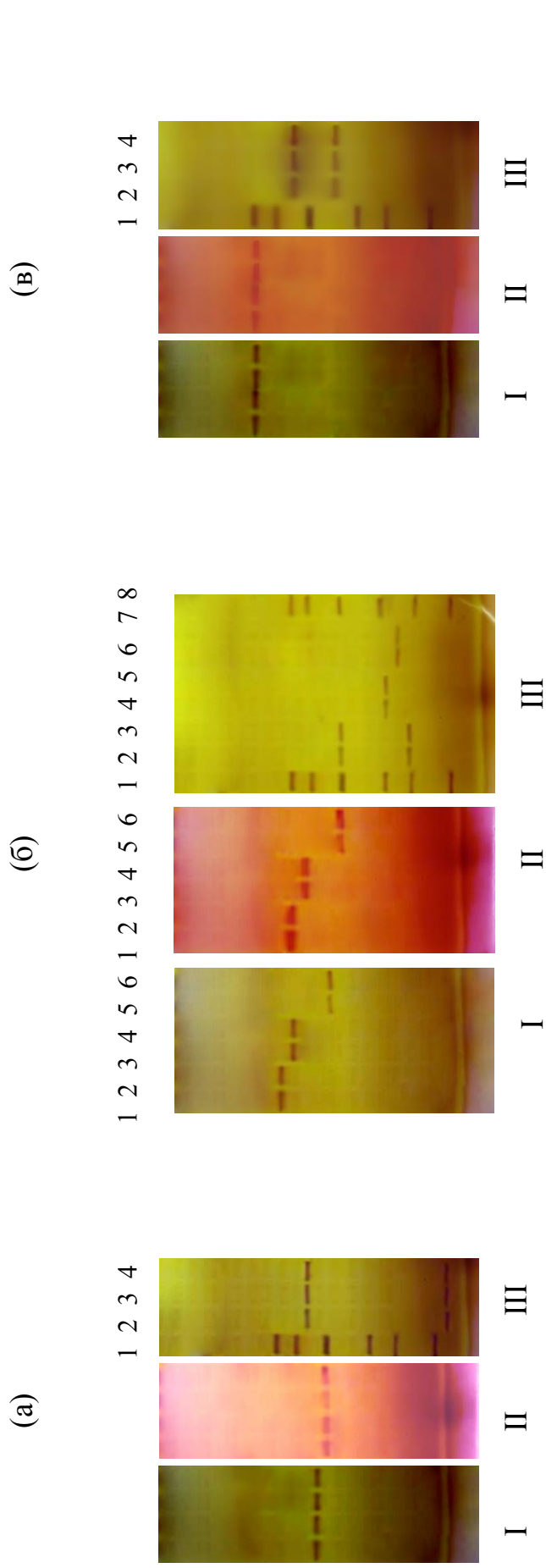


Рис. 6. Электрофореграммы фракций инулиназы: *Kluyveromyces fragilis* Y-303 (а): 1 – метчики, 2-4 –инулиназа; *Helianthus tuberosus* (б): инулиназа I – 1, 2 (I, II), 2, 3 (III); инулиназа II – 3, 4 (I, II), 4, 5 (III); инулиназа III – 5, 6 (I, II), 6, 7 (III); метчики – 1, 8 (III); *Aspergillus niger* (в): 1 – метчики, 2-4 –инулиназа.

I – электрофорез на гомогенность; II – электрофорез на специфичность; III – электрофорез в ПААГ с Na-SDS



Таблица 4

## Размеры (нм) и молекулярная масса (кДа) инулиназ

Продуцент	Нативная молекула			Субъединица		
	R, нм*	нм**	кДа	R, нм*	нм**	кДа
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,1±0,2	9,2±1,4	63±2	5,2±0,3	4,2±0,8	55±3
<i>Aspergillus niger</i>	12,6±2,4	6,4±1,1	102±4	5,1±1,1	3,4±0,2	62±3
<i>Helianthus tuberosus</i> Инулиназа I	5,5±0,5	6,7±0,7	65±3	3,2±0,3	3,4±0,1	46±3
Инулиназа II	1,0±0,1	3,1±0,3	31±2			
Инулиназа III	1,1±0,2	1,8±0,1	25±1			

\* Радиус молекулы, определенный методом динамического светорассеяния на приборе Photosog complex (ООО «Фотокор», Россия); \*\* высота молекулы, определенная методом атомно-силовой микроскопии на приборе SOLVER P47PRO («НТ-МДТ», Россия)

Таблица 5

## Активность инулиназы и ее субъединиц

Продуцент	Нативная молекула			Субъединица		
	Молекулярная масса, кДа	Удельная активность, ед/мг	Молекулярная масса, кДа	Удельная активность, ед/мг	Молекулярная масса, кДа	Удельная активность, ед/мг
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	63±2	22,1±3,2	55±3	20,2±3,8	8±3	15,8±3,5
<i>Aspergillus niger</i>	102±4	34,7±2,7	62±3	29,8±4,1	37±4	25,2±5,4
<i>Helianthus tuberosus</i> Инулиназа I	65±3	19,5±3,9	46±3	17,4±5,7	22±3	13,9±4,2

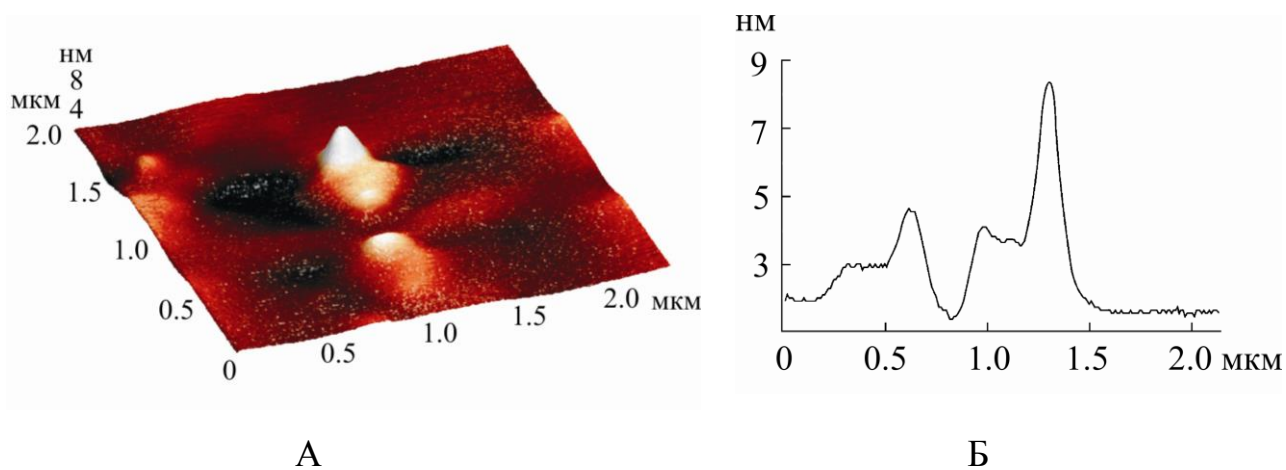


Рис. 7. Изображение поверхности молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 (размер кадра  $2,2 \times 2,2$  мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

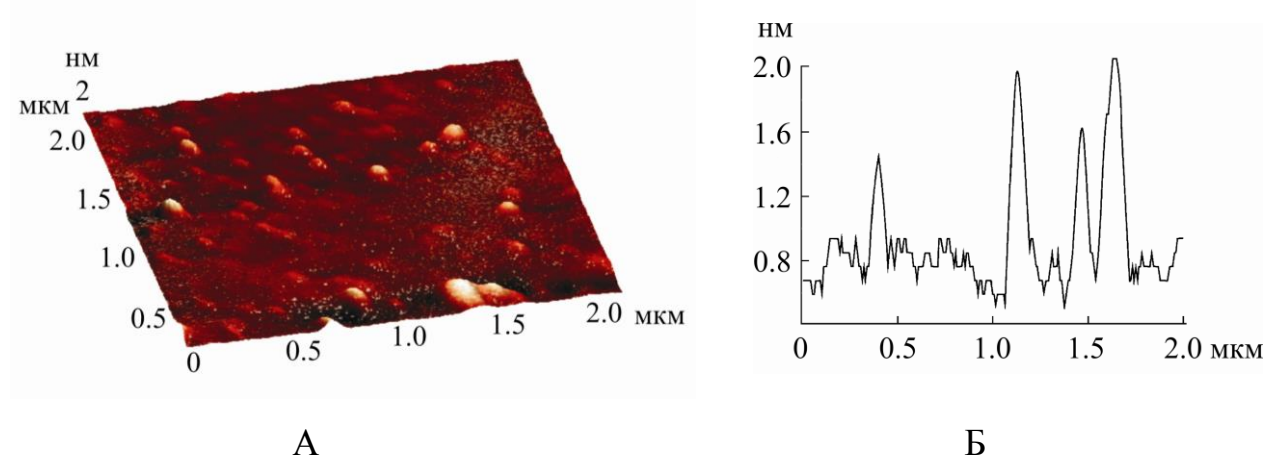


Рис. 8. Изображение поверхности субъединицы инулиназы № 1 (54,8 кДа) (размер кадра  $2 \times 2$  мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

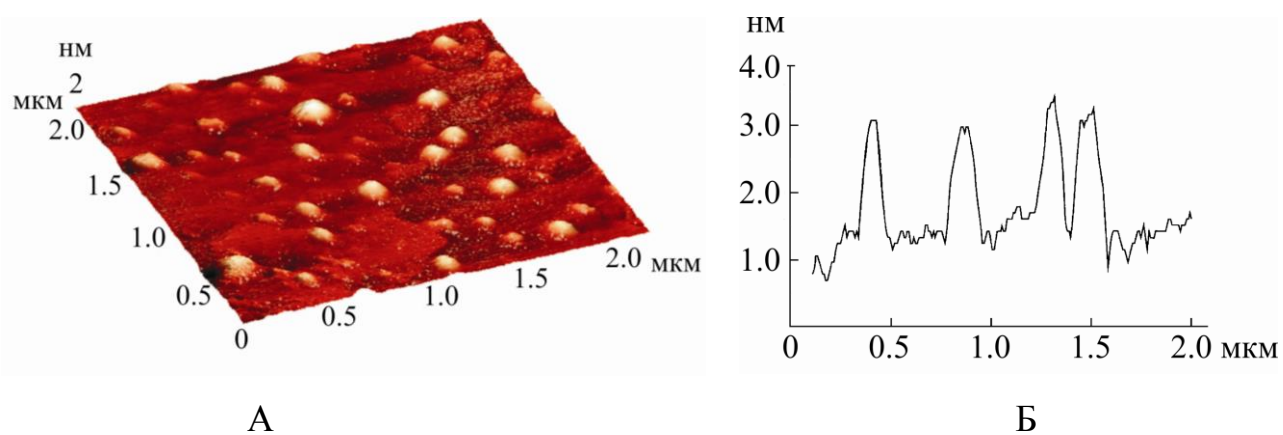


Рис. 9. Изображение поверхности субъединицы инулиназы № 2 (8,4 кДа) (размер кадра  $2 \times 2$  мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

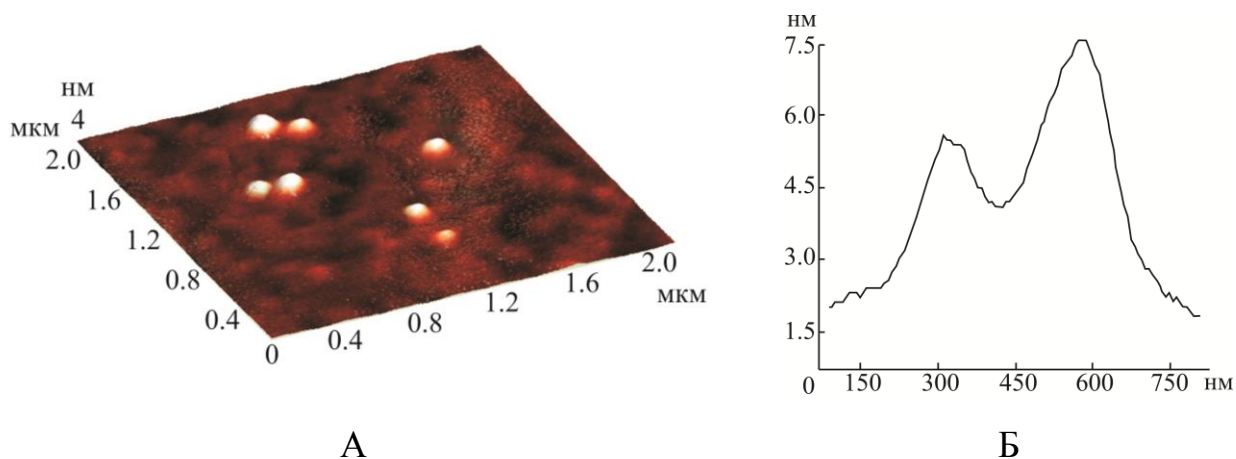


Рис. 10. Изображение поверхности молекулы инулиназы из *Aspergillus niger* (размер кадра  $2 \times 2$  мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение поверхности

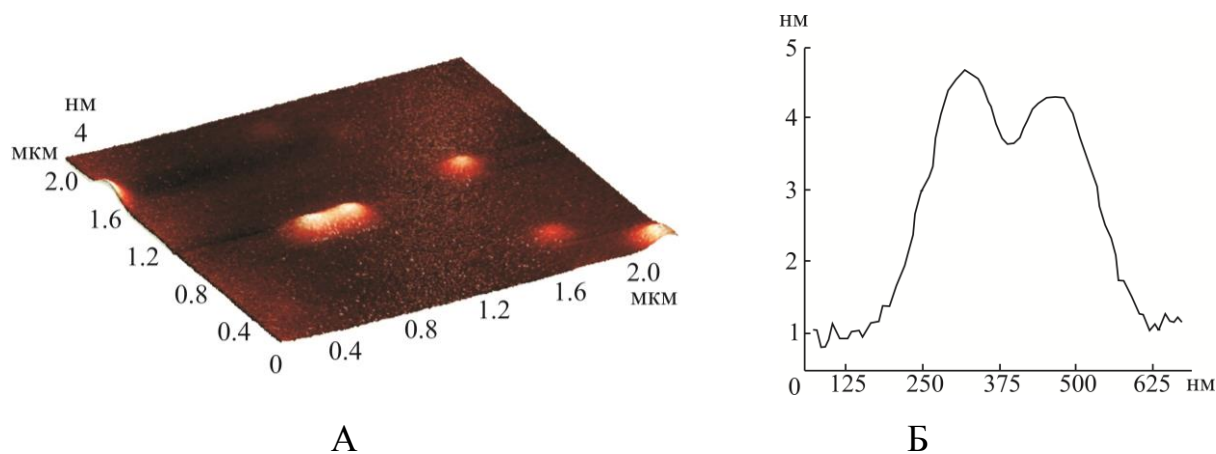


Рис. 11. Изображение поверхности молекулы инулиназы I из *Helianthus tuberosus* (размер кадра  $2 \times 2$  мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

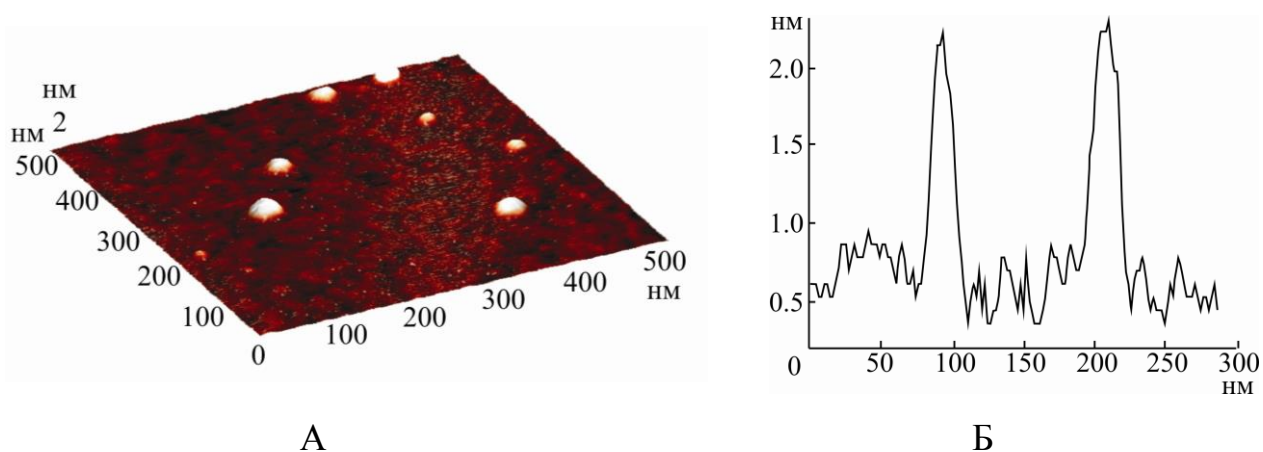


Рис. 12. Изображение поверхности молекулы инулиназы II из *Helianthus tuberosus* (размер кадра  $0,5 \times 0,5$  мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

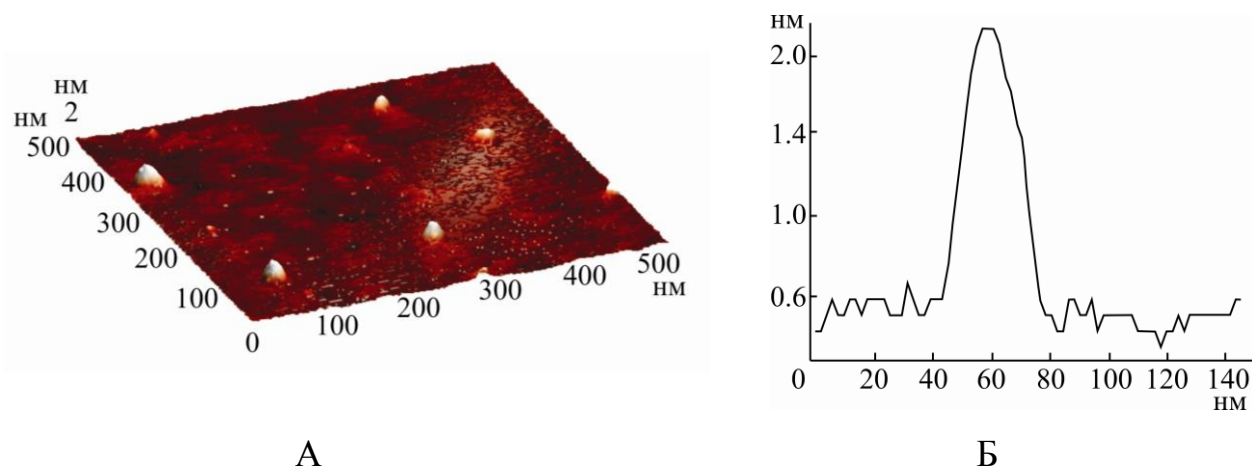


Рис. 13. Изображение поверхности молекулы инулиназы III из *Helianthus tuberosus* (размер кадра  $0,5 \times 0,5$  мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

Влияние процесса олигомеризации на способность энзима расщеплять инулин также зафиксировано для инулиназ из *Aspergillus awamori* ВКМФ-2250 и *Arthrobacter species* S37: их мономерная форма обладала меньшей способностью к катализу реакции гидролиза инулина, чем димер (Kim К.У., 2005, Ковалева Т.А., 1998). Примечательно, что кинетические свойства инулиназ также зависят от образования ими надмолекулярной структуры. В частности, мономер инулиназы из *Arthrobacter species* S37 обладал  $k_{cat}$   $(2,79 \pm 0,57) \times 10^4$  мин<sup>-1</sup> и  $K_m$   $0,55 \pm 0,11$  мМ, а для димера были характерны  $k_{cat}$   $(3,44 \pm 0,08) \times 10^4$  мин<sup>-1</sup> и  $K_m$   $0,29 \pm 0,05$  мМ (Kim К.У., 2005, 2008).

Итак, нами установлено, что инулиназы из дрожжей *Kluveromyces marxianus* и микромицета *Aspergillus niger* образуют гетеродимеры, а растительные инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* представлены как димерной, так и мономерной формами. Продемонстрировано, что активность инулиназ всех исследуемых нами продуцентов в димерной форме ниже, чем суммарная активность их субъединиц. На основании вышеизложенного можно с высокой степенью вероятности предположить, что процессы ассоциации-диссоциации инулиназы и родственных ей ферментов играют важную роль в регуляции метаболизма микроорганизмов и растений, использующих в качестве запасных питательных веществ инулин, различные

фруктаны и фруктоолигосахариды. Суммируя данные, полученные методами атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния, можно предположить, что четвертичная структура дрожжевой инулиназы более устойчива, по сравнению с димерной формой инулиназы I из топинамбура и инулиназы из *Aspergillus niger*.

В следующих сериях экспериментов мы изучали особенности вторичных структур инулиназ из *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* и *Helianthus tuberosus* (табл. 6, 7).

Таблица 6

#### Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах инулиназ

Полоса поглощения	Характеристика полосы
3400-3200 см <sup>-1</sup>	полоса валентных колебаний NH <sub>2</sub> – группы
1690-1630 см <sup>-1</sup>	амид I
1560-1520 см <sup>-1</sup>	амид II
1300-1200 см <sup>-1</sup>	амид III
1050 см <sup>-1</sup>	амид IV
700-580 см <sup>-1</sup>	амид V

У ферментов, выделенных из *Helianthus tuberosus*, достоверных отличий в соотношении типов вторичной структуры ( $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев, неупорядоченных областей) выявлено не было. Энзим из *Aspergillus niger* характеризуется наименьшим содержанием  $\beta$ -слоев (на 8-17 % ниже, чем у других инулиназ) и наибольшим количеством неупорядоченных участков (на 10-20 % выше, чем у прочих исследованных нами ферментов). Содержание  $\beta$ -слоев в молекуле инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на 8-9 % ниже, чем у растительных энзимов и на 8 % выше, чем у грибного фермента, при этом количество неупорядоченных участков на 8-10 % выше, чем у инулиназ из *Helianthus tuberosus*, и на 10 % ниже, чем у гидролазы, выделенной из *Aspergillus niger* (табл. 8).

Различия в ИК-спектрах инулиназ из *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* и *Helianthus tuberosus*

Полоса поглощения	Причина возникновения на спектре	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	Инулиназа из <i>Helianthus tuberosus</i>
3000-2100 см <sup>-1</sup>	Валентные колебания СН-группы в ненасыщенных и ароматических соединениях	Полоса более интенсивна, что свидетельствует о наличии более высокого числа аминокислот с ароматическими боковыми радикалами	Полоса менее интенсивна	Полоса менее интенсивна
1740±40 см <sup>-1</sup>	Карбонильная группа С=О	Полоса хорошо выражена, что указывает на наличие на поверхности молекулы более высокого числа остатков аспарагиновой и глутаминовой аминокислот	Полоса выражена в меньшей степени	Полоса выражена в меньшей степени
1690-1630 см <sup>-1</sup>	Колебания связи С=N	Полоса имеет более высокую интенсивность и лучше выражена, что указывает на существенные различия в количестве или расположении остатков аргинина и лизина	Полоса менее интенсивна и лучше выражена в меньшей степени	Полоса менее интенсивна
1049 см <sup>-1</sup>	Симметричные валентные колебания двух связей С-С	Полоса более интенсивна, что может свидетельствовать о наличии более высокого числа аминокислот с длинными алкильными радикалами	Полоса менее интенсивна	Полоса менее интенсивна
868 см <sup>-1</sup>	Асимметричные валентные колебания двух связей С-С	Полоса более интенсивна, что может свидетельствовать о наличии более высокого числа аминокислот с длинными алкильными радикалами	Полоса менее интенсивна	Полоса менее интенсивна

Таблица 8

Содержание типов (%) вторичной структуры в инулиназах из различных продуцентов

Конформация	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	Инулиназы из <i>Helianthus tuberosus</i>		
			I	II	III
$\alpha$ -спирали	27	25	25,5	27	28
$\beta$ -слои	28	20	37	36	37
Неупорядоченная структура	45	55	37,5	37	35

Таким образом, можно заключить, что инулиназы дрожжевого, грибного и растительного происхождения различаются друг от друга по структурным параметрам, что, вероятно, обуславливает их отличия по физико-химическим и каталитическим свойствам.

### 3.2. Исследование закономерностей образования надмолекулярных комплексов инулиназой из *Kluyveromyces marxianus*

Организация белковых субъединиц на уровне четвертичной структуры была отобрана эволюционно ввиду ее функциональных преимуществ, начиная от простой стабилизации (у гипертермофильных организмов) и тонкой регуляции (у аллостерических ферментов) до тщательно согласованных сложнейших реакционных механизмов – как в случае со следующими структурами: протеосомы, термосомы и шаперонные комплексы. Молекулярная структура белка является основой его функционирования. Всестороннее понимание этой связи – одна из фундаментальных задач современной биологии в целом и биофизики в частности (Trubitsina L.I., 2015, Tishchenko S., 2015). В этой связи в данном

разделе мы приводим результаты исследования закономерностей образования надмолекулярных комплексов инулиназой из *Kluyveromyces marxianus*.

Методом динамического светорассеяния были получены значения радиусов частиц, находящихся в растворах инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* в диапазоне концентраций  $10^{-7}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л. С помощью кластерного анализа эти значения были разделены на 8 групп: 1 группа – 0,5- 1,18; 2 группа – 1,22-4,2; 3 группа – 4,3-8,2; 4 группа – 9,2-21,5; 5 группа – 23,7-48,7; 6 группа – 50,0-83,7; 7 группа – 87,9-141,7; 8 группа – 148,1-199,0 нм.

1 (0,5-1,18 нм) и 2 (1,22-4,2 нм) группы соответствуют по размеру малой (8,4 кДа) и большой (54,8 кДа) субъединицам дрожжевой инулиназы, 3 группа (4,3-8,2 нм) – димерной форме фермента (63 кДа), 4 – тетрамеру, пятая и последующие – более крупным агрегатам.

Интересно отметить, что небольшое количество частиц (минимум 5,2 %), размером 0,9-1,18 нм, присутствует в растворе при всех исследуемых нами концентрациях. Частицы из 2 группы – 1,22-4,2 нм – отсутствуют только при наиболее высокой из выбранных нами концентраций –  $5 \times 10^{-4}$  моль/л. Частицы, соответствующие по размеру димерной форме фермента, присутствуют в диапазоне концентраций –  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л. По-видимому, при очень низких концентрациях в растворе ( $10^{-7}$ – $10^{-6}$  моль/л) димеры инулиназы полностью диссоциированы на субъединицы (рис. 14).

Процентное содержание частиц 1 группы в растворе увеличивается от 5,2 % при  $5 \times 10^{-4}$  моль/л до порядка 70 % при  $1 \times 10^{-7}$  моль/л. Содержание частиц 2 группы наиболее высоко при концентрациях фермента  $1 \times 10^{-6}$  и  $5 \times 10^{-7}$  моль/л: ~ 66 и 81 % соответственно. Количество частиц, соответствующих димерной форме фермента, варьирует от 37 до 78 % в диапазоне концентраций  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л. При тех же концентрациях число тетрамерных форм не превышает 39 %. В диапазоне концентраций



$10^{-7}$ – $10^{-6}$  моль/л димерные и тетрамерные формы не были зарегистрированы, также отсутствовали частицы из 6 группы (50,0–83,7 нм) (рис. 15).

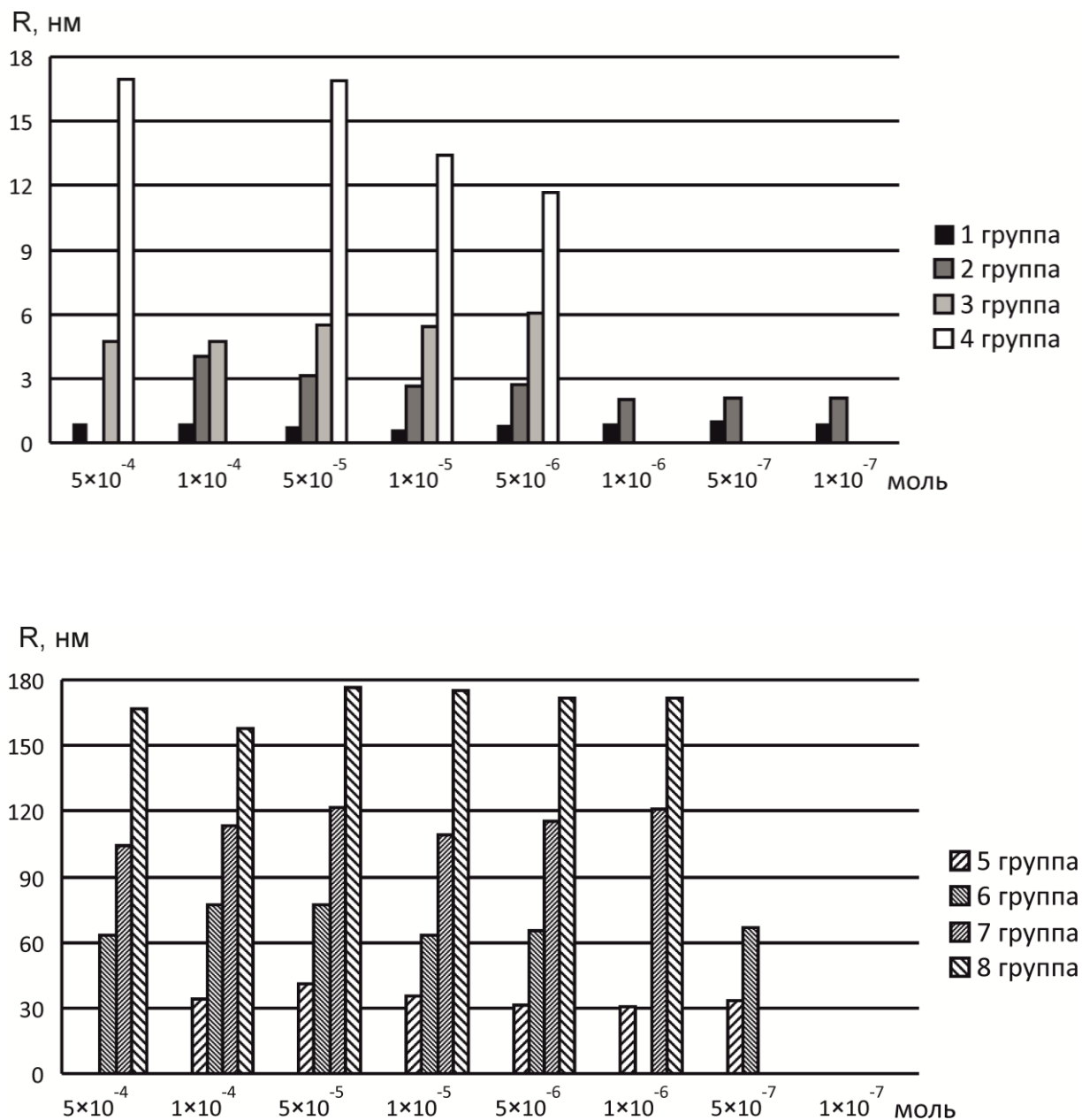


Рис. 14. Распределение радиусов (R) частиц при различных концентрациях инулиназы в растворе

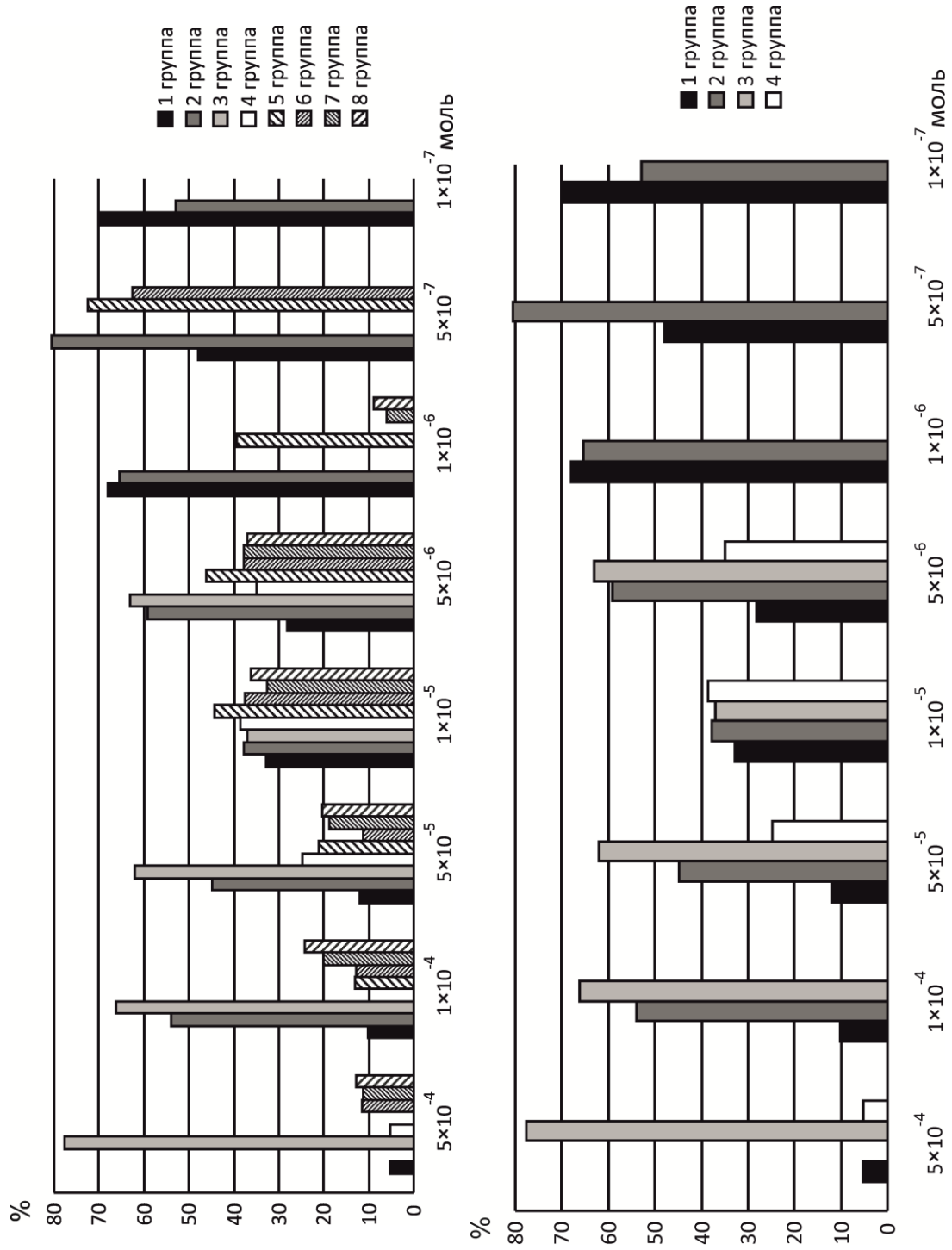
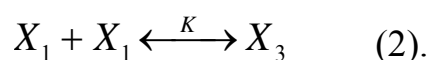


Рис. 15. Процентное содержание частиц различных радиусов при варьировании концентрации инулиназы в растворе

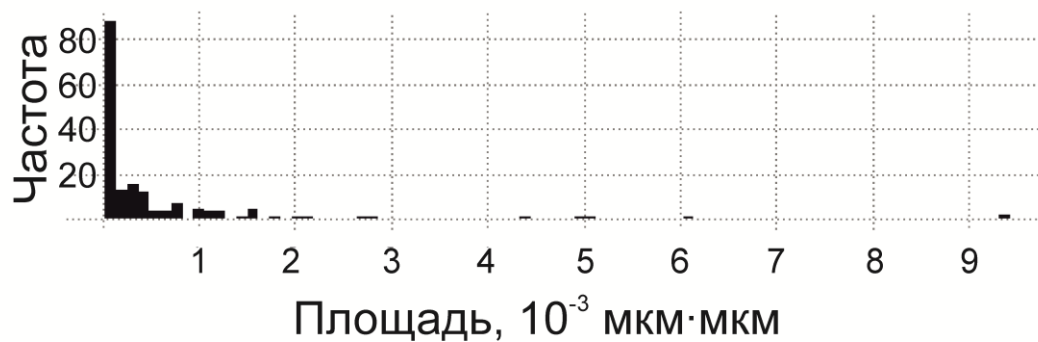
На рис. 16 представлены гистограммы частот встречаемости площадей поверхностей частиц при различных концентрациях инулиназы в растворе, полученные путем обработки данных атомно-силовой микроскопии. Также было зафиксировано снижение значений высот частиц: от 5-6 нм при концентрации  $10^{-5}$  моль/л до 4-5 нм при  $10^{-6}$  моль/л и менее 2 нм при  $10^{-8}$  моль/л (рис. 17).

Просуммировав результаты, полученные методом динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии, можно заключить, что при концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  моль/л инулиназа на 70-80 % диссоциирована на субъединицы. В диапазоне концентраций  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л преобладают димерные (максимум до ~80 %) и тетрамерные формы фермента (максимум до ~40 %).

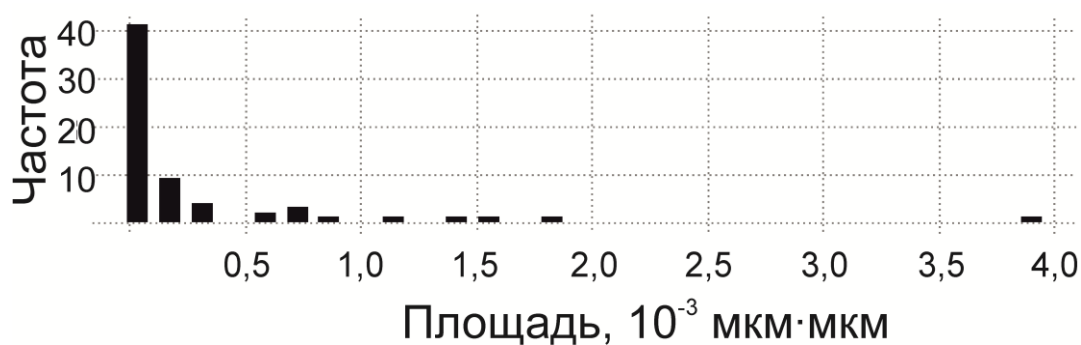
Агрегация белка должна подчиняться вполне естественному условию: по мере увеличения концентрации доля неагрегированных форм должна уменьшаться, а агрегированных – увеличиваться. Для групп 1 (мономер) и 3 (димер) эта тенденция однозначно прослеживается; для группы 2 разброс точек очень велик, а для группы 4 зависимость носит характер роста в пределах 20 % с последующим снижением до нуля при высоких концентрациях. Полученные данные по группам 2 и 4 не представляются надежными и не отражают ожидаемые закономерности агрегации. Группы 5 и последующие характеризуют более крупные, чем тетрамер, агрегаты, которые трудно однозначно интерпретировать. В связи с этим в последующем численном анализе данные по этим группам не использовались. Анализ полученных результатов проводили в рамках простейшей модели равновесия мономер↔димер для групп 1 и 3 с равновесной константой агрегации  $K$ :



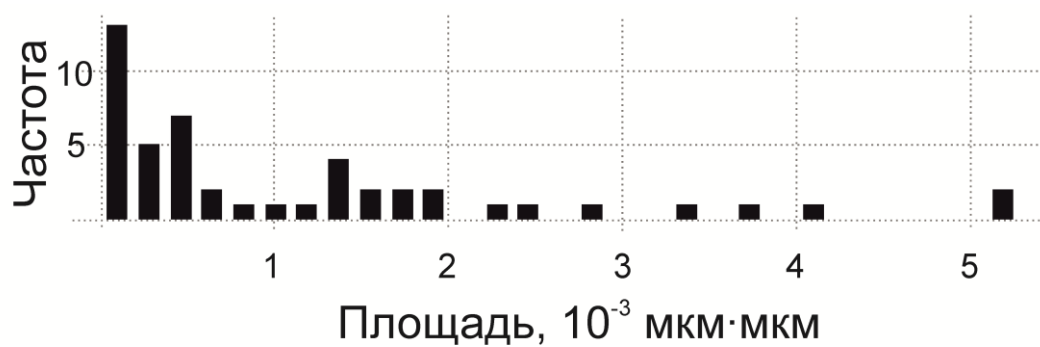
$10^{-5}$  моль/л



$10^{-6}$  моль/л



$10^{-7}$  моль/л



$10^{-8}$  моль/л

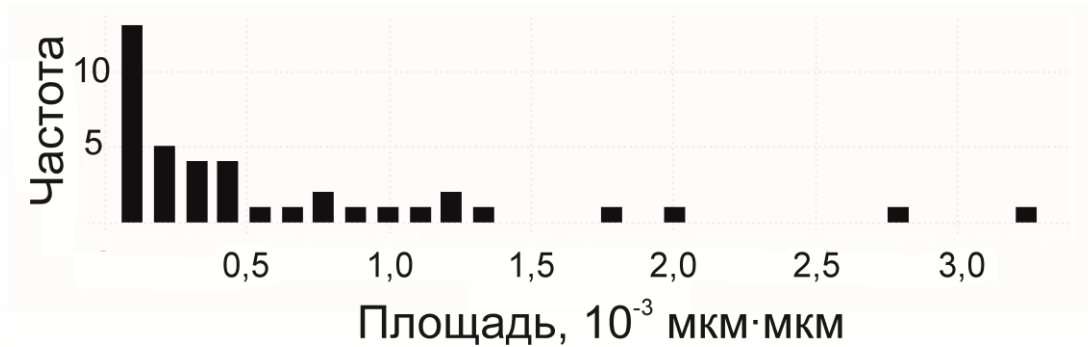


Рис. 16. Гистограммы частот встречаемости площадей поверхностей частиц при различных концентрациях инулиназы в растворе

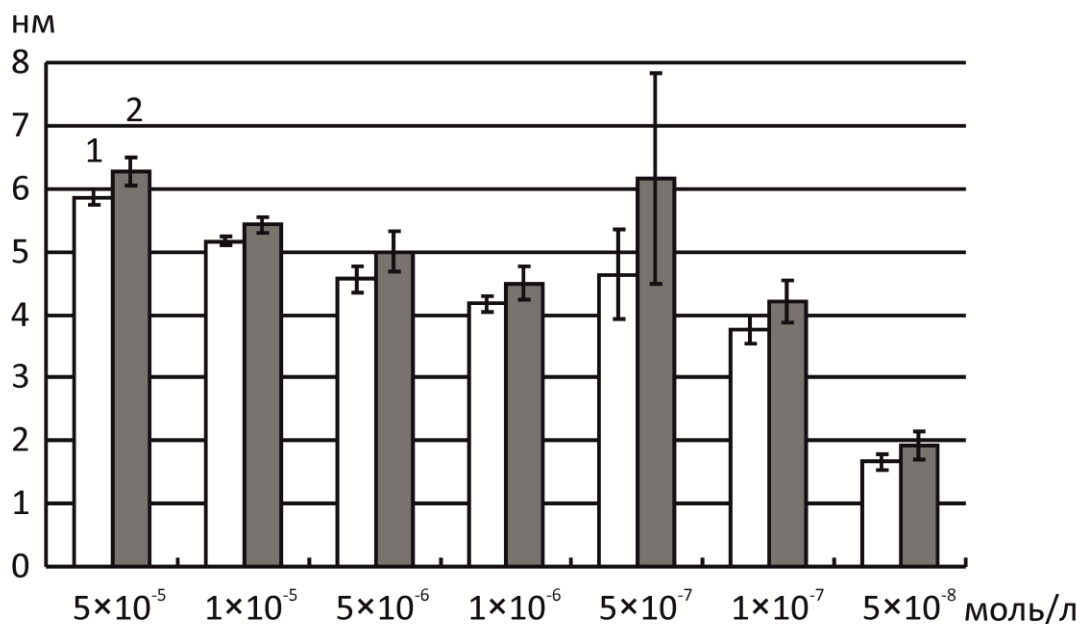


Рис. 17. Распределение высот частиц при различных концентрациях инулиназы в растворе по данным атомно-силовой микроскопии: 1 – среднее значение высоты, 2 – максимальное значение высоты

Для такой реакции связь мольной доли  $f_3$  димера с мольной долей  $f_1$  мономера подчиняется закону:

$$f_3 = K \cdot f_1^2 \cdot x_0 \quad (3),$$

где  $f_1$ ,  $f_3$  – мольные доли групп 1 и 3 из таблицы,  $x_0$  – концентрация инулиназы.

Далее по уравнению (2) производилась минимизация квадратичного отклонения (невязки) расчетного значения  $f_3$  от экспериментального путем варьирования параметра  $K$  в пакете SigmaPlot. Получено значение константы димеризации  $K = 617\,000 \text{ M}^{-1}$  при достоверности аппроксимации  $R^2 = 0,87$ .

Нами была проведена дополнительная верификация рассчитанного значения  $K$  путем проверки двух допущений:

- 1) мономер из группы 2 формирует димер из группы 3 ( $f_3 = K \cdot f_2^2 \cdot x_0$ ),
- 2) комплекс мономеров из группы 1 и группы 2 ( $f_3 = K \cdot (f_1 + f_2)^2 \cdot x_0$ ), формируют димер из группы 3.

Соответствующие расчеты показали значительно худшее качество аппроксимации экспериментальных данных, поэтому предложенный нами вариант (формула 3) наиболее адекватен. В целом полученная нами величина оценки  $K$  для инулиназы соответствует типичным значениям константы агрегации среднемолекулярных белков и может считаться достоверной.

Резюмируя результаты 3 главы, можно заключить, что инулиназы из *Kluveromyces marxianus* и *Aspergillus niger* преимущественно образуют гетеродимеры, а инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* представлены как димерной, так и мономерной формами, причем активность инулиназ в димерной форме ниже, чем суммарная активность их субъединиц. При концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  моль/л дрожжевая инулиназа на 70-80 % диссоциирована на субъединицы. В диапазоне концентраций  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л преобладают димерные (максимум до ~80 %) и тетрамерные формы фермента (максимум до ~40 %). Полученные результаты следует учитывать при разработке методики сорбционной иммобилизации инулиназы, т.к. для белков и аминокислот возможна конкуренция процессов ассоциации в растворе и сорбции на матрице носителя (Карлашова Т.С., 2014).

## Глава 4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНУЛИНАЗ

### 4.1. Некоторые физико-химические свойства инулиназ

Исследование физико-химических свойств инулиназ различного происхождения необходимо для расширения горизонтов их эффективного практического применения. Мы осуществили исследование физико-химических и кинетических свойств инулиназы из *Kluuveromyces marxianus* Y-303 и *Helianthis tuberosus*. Оптимумы функционирования и кинетические характеристики препаратов дрожжевой и растительной инулиназы представлены в табл. 9.

Таблица 9

Оптимумы функционирования и кинетические характеристики препаратов  
инулиназы

Препараты инулиназы	Температурный оптимум	Оптимум рН
Инулиназа из <i>Kluuveromyces marxianus</i>	50 °С	4,7
Инулиназа I из <i>Helianthis tuberosus</i>	48 °С	6,8
Инулиназа II из <i>Helianthis tuberosus</i>	39 °С	6,2
Инулиназа III из <i>Helianthis tuberosus</i>	44 °С	4,5

Так как инулин обладает хорошей растворимостью только при высоких температурах (около 50 °С) (Uhm T.B., 1987), для промышленного получения фруктозы из инулинсодержащего растительного сырья целесообразно использовать термотолерантные ферменты (Hughes S.R., 2017). Таким

образом, если принимать во внимание только температурный оптимум, то наиболее перспективным из выделенных нами энзимов является растительная инулиназа I с оптимумом функционирования 48 °С и дрожжевая инулиназа с оптимумом функционирования 50 °С.

Зона наибольшей стабильности фруктозы находится в интервале рН 4,0–5,0, поэтому в промышленных целях перспективным является использование растительной инулиназы III, так как ее рН-оптимум приходится на 4,5, и дрожжевой инулиназы с оптимумом рН 4,7.

Анализ кинетических кривых зависимости  $V(S)$  показал, что наибольшее сродство к инулину проявляет дрожжевая инулиназа.

Оптимальные значения температуры и рН, по данным различных авторов, для инулиназ и растительных фруктозилгидролаз представлены в табл. 10.

Большинство микроорганизмов синтезируют инулиназу с температурным оптимумом, находящимся в пределах 45-55 °С. Приводятся и более низкие значения: 35 °С у энзимов из *Bacillus polymyxa*, 37 °С – из *Bifidobacterium infantis*, 40 °С – из *Rhizopus species* и *Bacillus polymyxa* (Жеребцов Н.А., 2003, Gao W., 2009).

Температуры, применяемые в производственных циклах, не всегда совпадают с максимумами активности ферментов, часто приходится использовать более низкие значения, при которых энзим является стабильным в течение длительного времени, поэтому целесообразно выбирать те инулиназы, оптимум функционирования которых превышает предполагаемую температуру в биореакторе. Наиболее перспективными для промышленного применения являются такие термофильные микроорганизмы-продуценты, как *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia guilliermondii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces species*, *Arthrobacter species*, *Arthrobacter ilicis*, *Cladosporium cladosporioides*, которые продуцируют инулиназы с оптимумом функционирования до 60 °С. Существуют данные и о более высоких



температурных оптимумах, в частности, для инулиназы из *Bacillus species* он находится в области выше 65 °С, а для энзимов, выделенных из *Arthrobacter ureafaciens* и *Bacillus smithii*, составляет 70 °С (Gill P.K., 2006, Goosen C., 2007, Gao L.M, 2007, Uzunova K., 2001, Cazetta M.L., 2005).

Таблица 10

Оптимальные значения температуры и рН среды для функционирования  
инулиназ

Продуцент	t, °С	рН	Источник литературы
1	2	3	4
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	55	4,75	(Pandey A., 1999, Gupta A.K., 1994)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	49-55	4,7-5,2	(Vandamme E.J., 1983)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 52466	50	5,0	(Pessoa A., 1999)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	50; 70 <sup>2</sup>	4,5-5,0; 3,5 <sup>2</sup>	(Rouwenhorst R.J., 1990)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> MTCC 3995	50	4,0	(Jain S.C., 2012)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	55	5,0	(Mazutti M., 2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-303	50	4,7	<b>наши данные</b>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	50	5,5	(Singh R.S., 2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var.bulgaricus	55	4,4 4,75 <sup>2</sup>	(Kushi R.T., 2000)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var.bulgaricus	30-33	3,6	(Vranesic D., 2002)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. bulgaricus	60	3,5	(Cazetta M.L., 2005)
<i>Helianthis tuberosus</i>			
I	48	6,8	<b>наши данные</b>
II	39	6,2	
III	44	4,5	

1	2	3	4
<i>Cichorium intybus</i> L. 1-FEH IIa 1-FEH IIb	30-40	4,5-5,5	(Van der Ende W., 2003)
<i>Aspergillus awamori</i> MTCC 2879	55	5,0	(Rawat H.K., 2015)
<i>Aspergillus fumigatus</i> C11	55	6,0	(Chen M., 2015)
<i>Aspergillus fumigatus</i> GNCC 1351	60	6,0	(Rawat H.K., 2015)
<i>Aspergillus ficuum</i> MTCC 7591	55	5,0	(Rawat H.K., 2015)
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	60	5,0	(Chen X.M., 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	50	6,0	(Xu Y., 2016)
<i>Aspergillus niger</i> GNCC 2655	50	4,0	(Rawat H.K., 2015)
<i>Aspergillus niger</i> GNCC 2613	55	5,5	(Rawat H.K., 2015)
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	55 50 <sup>2</sup>	5,0 5,5 <sup>2</sup>	(Yedahalli S.S., 2016)
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	40	7,0	(Zhou J., 2014)
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	35	7,0	(Zhou J., 2015)
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	40-45	5,0-5,5	(Shen J., 2015)
<i>Lactobacillus paracasei</i> DSM 23505	50	4,8-4,9	(Petrova P., 2015)
<i>Penicillium</i> sp. NFCC 2768	50	5,0	(Rawat H.K., 2015b)
<i>Penicillium canescens</i> Inu1_Awa <sup>1</sup>	50	4,0-4,5	(Волков П.В., 2012)
<i>Penicillium canescens</i> InuA_Anig <sup>1</sup>	55	~ 6	(Волков П.В., 2012)
<i>Penicillium janthinellum</i> strain B01	50	4,5	(Wang L., 2011)
<i>Pichia pastoris</i> <sup>1</sup>	55	5,0	(Yang J.K., 2016)
<i>Pichia pastoris</i> <sup>1</sup>	50	5,0	(Chena G.J., 2016)
<i>Pichia pastoris</i> X-33 <sup>1</sup>	55	4,5	(Ma J.Y., 2016)
<i>Rhizopus microsporus</i>	70	5,0	(Flores C., 2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ВГШ-2	43-46	4,5-4,7	(Шуваева Г.П., 2010)

<sup>1</sup> инулиназа была экспрессирована в данный организм

<sup>2</sup> при использовании сахарозы в качестве субстрата

Температурный – и pH-оптимумы для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 отличались при использовании сахарозы (70 °С и pH 3,5) и инулина (50 °С и pH 4,5-5,0) в качестве субстратов. Этот феномен был

также характерен и для  $\beta$ -фруктозидаз из других штаммов рода *Kluuveromyces* и прочих дрожжей (Workman W.E., 1983, Rouwenhorst R.J., 1990).

Изоэлектрические точки большинства инулиназ находятся в диапазоне pH 3,8-5,4 (Pessoa A., 1997, Arand M., 2002, Moriyama S., 2003, Ji Y., 1998, Xiao R., 1989, Warchol M., 2002, Van der Ende W., 2003, De Roover J., 1999).

По данным различных авторов, pH-оптимум для инулиназ, выделенных из дрожжей *Kluuveromyces marxianus*, находится в диапазоне значений 3,5-5,5. Для ферментов из штаммов *Kluuveromyces marxianus* ATCC 52466, CDBBL-278, NRRL Y-7471 данный параметр соответствует pH 5,0. R. Xiao et al. (1989) и R.T. Kushi et al. (2000) показали, что оптимум pH для дрожжевой инулиназы составляет 4,4; E.J. Vandamme и D.G. Derycke (1983) – 4,7-5,2, а R.J. Rouwenhorst et al. (1988) – 4,5-5,0.

Инулиназы, выделенные из различных продуцентов, отличаются по pH-оптимуму. Грибные и дрожжевые ферменты проявляют максимальную активность в кислой среде (pH 4,0-5,5), бактериальные – в более нейтральной (pH 5,5-7,0). Кислотоустойчивость бактериальных инулиназ значительно ниже дрожжевых и грибных. Энзимы бактерий устойчивы в диапазоне pH 4,5–7,5, грибные – в диапазоне pH 3,0–8,0, дрожжевые – при pH 3,0–6,5. Известно, что величина pH сильно влияет на соотношение моно- и олигосахаридов в растворе: при более кислой среде (pH 4,0) содержание фруктозы и инулобиозы увеличивается, тогда как при pH 6,0 – заметно снижается.

В настоящее время принято считать, что инулиназы расщепляют, главным образом, инулин. Сахароза, инулоолигосахариды, раффиноза, мелицитоза, стахиоза, леван и леваноолигосахариды также гидролизуются, но с меньшей скоростью (Абелян В.А., 1996).

#### 4.1.1. Процессы ассоциации-диссоциации молекул инулиназ при различных значениях температуры

В диапазоне температур 25-40 °С и при концентрациях инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* 1, 5 и 10 мг/мл нами не были зарегистрированы процессы ассоциации-диссоциации молекул фермента: радиус частиц в системе, определенный методом динамического светорассеяния, составлял 4,3 нм. Однако при 45 и 50 °С (оптимум функционирования) и концентрации фермента 1 мг/мл наблюдалась тенденция к снижению величины радиуса молекулы до 3,8 нм, подобные изменения происходили при 51-55 °С и концентрации инулиназы 5 мг/мл, а также 53 °С и концентрации энзима 10 мг/мл. Практически полная агрегация частиц наблюдалась при 70 °С, если концентрация фермента составляла 1 мг/мл, при 64 °С и 5 мг/мл, 62 °С и 10 мг/мл. При значении температуры 61 °С и концентрации инулиназы 5 и 10 мг/мл в системе появились частицы с радиусом порядка 21-22 нм, что может свидетельствовать об образовании тетрамерных и октамерных форм фермента как предшественников процессов интенсивной агрегации молекул.

При инкубации раствора инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* при 50-57 °С во всех трех используемых нами концентрациях в течение 4 часов не происходило изменения размеров частиц в системе. При 60 °С и концентрации энзима 1 мг/мл через 2 часа инкубации в системе появлялись частицы радиусом  $16,3 \pm 4,1$  нм, после 3 часов минимальный размер частиц составлял  $21,9 \pm 7,9$  нм. При 60 °С и концентрации фермента 5 мг/мл пик, соответствующий размерам одиночных молекул энзима, полностью исчезал после 3,5 часов инкубации. Наиболее интересный эффект наблюдался при прогревании раствора с концентрацией 10 мг/мл: при 1,5-2 часах инкубации в системе появлялись частицы с радиусами  $1,0 \pm 0,1$  и  $1,2 \pm 0,1$  нм, которые могут указывать на протекание процессов диссоциации; параллельно после 2 часов инкубации регистрировался пик  $9,1 \pm 1,1$  нм, который может свидетельствовать о наличии тетрамеров.

При 63 °С и концентрации инулиназы 1 мг/мл мы детектировали следующее: после инкубации в течение 20 мин в системе появились частицы с радиусом порядка 14 нм, которые, вероятно, соответствуют тетрамерной форме фермента. Через 1 час 40 мин пик, соответствующий размеру димерных молекул инулиназы, полностью исчезал и появлялся максимум ~ 25 нм, который свидетельствует об образовании более крупных агрегатов.

Метод динамического светорассеяния позволил установить, что при концентрациях инулиназы I из *Helianthus tuberosus* 1, 5 и 10 мг/мл и температуре 25 °С практически не происходит выраженных процессов ассоциации-диссоциации молекул фермента: радиусы частиц в системе были равны  $3,3 \pm 1,3$ ,  $3,3 \pm 0,9$  и  $3,8 \pm 1,0$  нм соответственно. В диапазоне температур 32-58 °С радиус частиц в растворе с концентрацией энзима 1 мг/мл держался на уровне 3,8 нм, при 60 °С происходила интенсивная агрегация молекул. При концентрации инулиназы 5 мг/мл агрегация начиналась уже при 58 °С, а при 10 мг/мл – даже при 50 °С. Интересно, что при температуре 45 °С и концентрации фермента 10 мг/мл в системе наблюдались частицы с размером гидродинамического радиуса  $3,3 \pm 1,0$ ,  $2,8 \pm 0,9$  и  $12,2 \pm 3,3$  нм, что свидетельствует, вероятно, о реализации одновременно процессов и ассоциации, и диссоциации в названных условиях.

На рис. 18, 19 отражены предлагаемые нами схемы отдельных этапов ответной реакции инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* на воздействие различных температур.

t, °C	Каталитическая активность		Процесс
25 30 35 40	Снижение активности ↑	7 % 13 % 27 % 53 %	Процессы ассоциации-диссоциации молекул фермента не зарегистрированы при концентрациях инулиназы 1, 5 и 10 мг/мл ↑
45		более 70 %	Модификация третичной структуры белка, тенденция к снижению величины радиуса молекулы при концентрации инулиназы 1 мг/мл
50	Оптимум каталитической активности	100 %	↑ <b>Преобладание димерной формы фермента</b> ↓
55	Снижение активности ↓	более 85 %	Модификация третичной структуры белка, тенденция к снижению величины радиуса молекулы при концентрациях инулиназы 5 и 10 мг/мл ↓
61		~ 50 %	Образование тетрамерных и октамерных форм фермента как предшественников процессов интенсивной агрегации молекул при концентрациях инулиназы 5 и 10 мг/мл ↓
62 64 70		~ 30 % 20 %	Практически полная агрегация частиц: при концентрации инулиназы 10 мг/мл при концентрации инулиназы 5 мг/мл при концентрации инулиназы 1 мг/мл

Рис. 18. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на температурные воздействия

t, °C	Каталитическая активность		Процесс
25 30 35 40 45	Снижение активности ↑	36 %	Процессы ассоциации-диссоциации молекул фермента не зарегистрированы при концентрациях инулиназы 1, 5 и 10 мг/мл
		54 %	
		75 %	
		92 %	
		96 %	
48	Оптимум каталитической активности	100 %	↑ Преобладание димерной формы фермента ↓
50 58 60	Снижение активности ↓	92 %	Интенсивная агрегация частиц: при концентрации инулиназы 10 мг/мл при концентрации инулиназы 5 мг/мл при концентрации инулиназы 1 мг/мл
		48 %	
		43 %	

Рис. 19. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы I из *Helianthus tuberosus* на температурные воздействия

При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении температуры (50 и 48 °C соответственно) молекулы энзима из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* находятся преимущественно в димерной форме (каталитическая активность фермента принята за 100 %). При повышении или понижении значений температуры относительно оптимума функционирования происходит частичная или полная потеря каталитической способности инулиназ. При этом в диапазоне от 25 до 40 °C процессы ассоциации-диссоциации молекул не зарегистрированы для обеих инулиназ. Интенсивная агрегация частиц при концентрациях энзима в растворе 1, 5 и 10 мг/мл наблюдалась соответственно при 60, 58 и 50 °C для растительной инулиназы и при 70, 64 и 62 °C – для дрожжевой.

#### 4.1.2. Процессы ассоциации-диссоциации молекул инулиназ при различных значениях pH среды

При анализе зависимости гидродинамического радиуса инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* от pH среды были получены следующие результаты: в диапазоне pH 4,0-13,0, а также при pH 3,05 и 3,25 радиус молекулы не изменялся. Отличия от размеров молекулы в оптимальном для гидролиза инулина значении pH 4,7 ( $R = 4,5 \pm 0,8$  нм) регистрировались при pH, равном 3,0 ( $R = 2,9 \pm 0,2$  нм) и 3,5 ( $R = 3,7 \pm 0,7$  нм) (рис. 20). Кроме того, при pH 3,0-3,5 и 13,0 появлялись дополнительные пики (табл. 11), причем при pH 3,05 и 3,5 размеры частиц, соответствующих дополнительному пику, одинаковы.

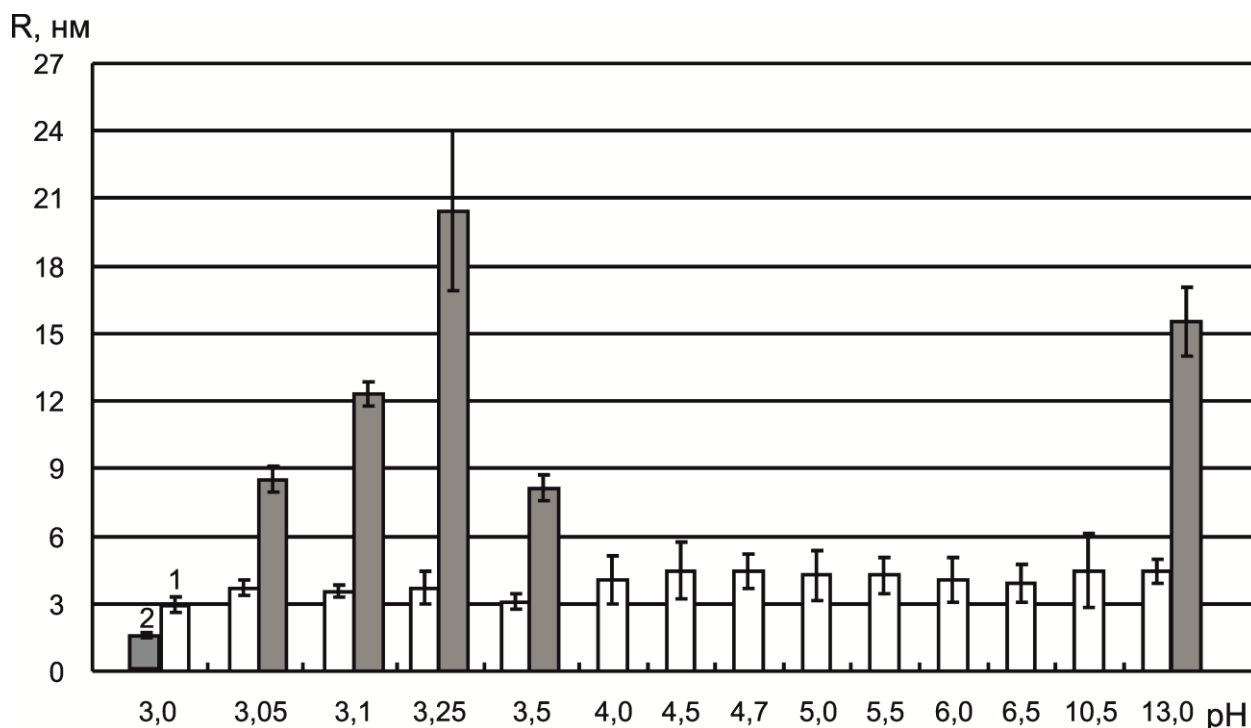


Рис. 20. Радиус (R) молекул инулиназы и их агрегатов при различных значениях pH среды: 1 – пик с более высокой интенсивностью (основной), 2 – пик с меньшей интенсивностью (дополнительный)



Таблица 11

Дополнительные пики при анализе гидродинамического радиуса инулиназы  
методом динамического светорассеяния

pH	Радиус частиц, нм	Масса частиц, кДа	Содержание частиц, %
3,0	1,5±0,1	8,3±0,5	35,6
3,05	8,5±0,6	504,2±32,9	11,5
3,1	12,3±0,5	не определена	2,9
3,25	20,5±3,5	не определена	8,1
3,5	8,1±0,6	452,5±24,4	6,7
13,0	15,5±1,5	не определена	8,4

Программное обеспечение прибора Malvern Zetasizer Nano ZSP позволяет рассчитывать массы частиц. При pH от 4,0 до 13,0 различий в массах частиц, обуславливающих основной пик, не выявлено. Однако значения масс уменьшаются в некоторой степени при pH 3,05-3,25 по сравнению с массой инулиназы в оптимальном для гидролиза инулина значении pH 4,7, при pH 3,0 и 3,5 эта разница выражена в еще большей степени (рис. 21).

Mr, кДа

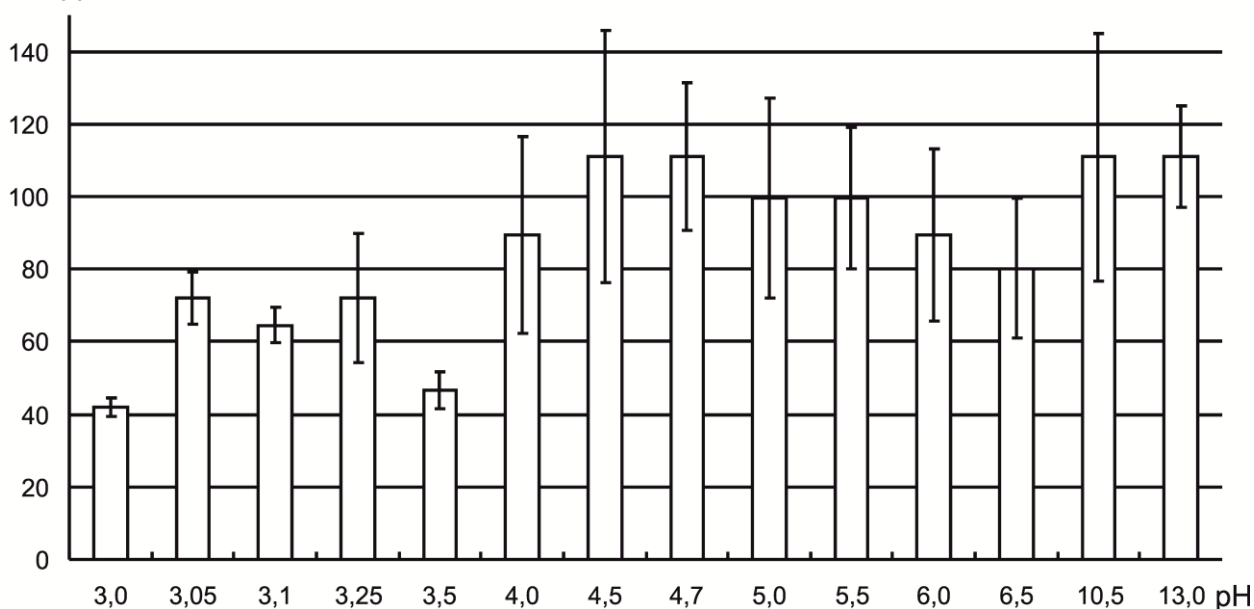


Рис. 21. Масса молекул инулиназы (основной пик) при различных значениях pH среды

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что при рН 3,0 инулиназа полностью диссоциирует на субъединицы. Масса частиц из дополнительного пика при рН 3,05 и 3,5 соответствует массе октамерной формы фермента, которая, вероятно, и образуется при названных условиях в количестве 11,5 и 6,7 % соответственно.

Для более подробного изучения предполагаемых нами эффектов мы измерили радиусы и массы молекул инулиназ при инкубации фермента в различные промежутки времени в диапазоне рН 3,0-3,5 и при рН 13,0. После инкубации в течение 8 часов при рН от 3,05 до 3,25 изменений в размерах частиц из основного пика выявлено не было. Размеры частиц из дополнительного пика без предварительной инкубации уже различались: при рН 3,05 и 3,5 они составляли соответственно  $8,5 \pm 0,6$  и  $8,1 \pm 0,6$ , при рН 3,1 и 3,25 –  $12,3 \pm 0,5$  и  $20,5 \pm 3,5$ , что в 1,5 и 2,5 раза выше размеров октамерной формы энзима и, по-видимому, свидетельствует об образовании более крупных агрегатов в изучаемой нами системе (рис. 22).

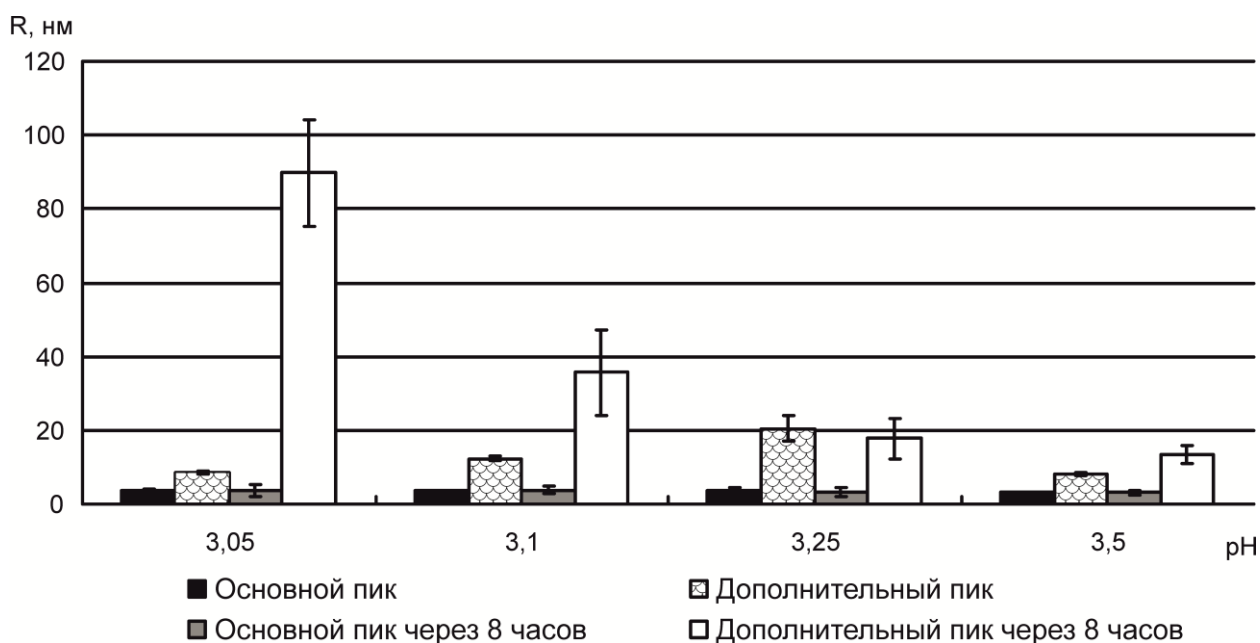


Рис. 22. Радиус (R) молекул инулиназы и их агрегатов при значениях рН среды в диапазоне от 3,05 до 3,5 единиц

Наиболее интересные результаты были получены нами в ходе инкубации раствора инулиназы при рН 3,0 и 13,0. При рН 3,0 во всем исследованном нами диапазоне времени мы наблюдали два пика, соответствующие разным размерам частиц. Первый пик, обусловленный частицами меньшего размера, составлял менее 2 нм (рис. 23). При инкубации раствора инулиназы в течение 1 часа при рН 3,0 достоверных изменений размеров частиц второго пика, соответствующего частицам большего размера, не происходило: радиус частиц оставался порядка 3 нм. После 2-2,5 часов он увеличивался до 4 нм. При инкубации молекул в диапазоне времени от 2 часов 50 мин до 9 часов 30 мин величина радиуса частиц составляла порядка 5-6 нм, что соответствует димерной форме фермента. Полученные данных указывают, что при инкубации в 0,1 М ацетатном буфере с рН 3,0 в интервале времени до 2,5 часов инулиназа практически полностью диссоциирована на субъединицы, а после 3 часов инкубации часть молекул фермента образуют димерную форму. К подобному выводу приводит и анализ изменения молекулярных масс частиц инулиназы и соотношения их количества (рис. 24, 25).

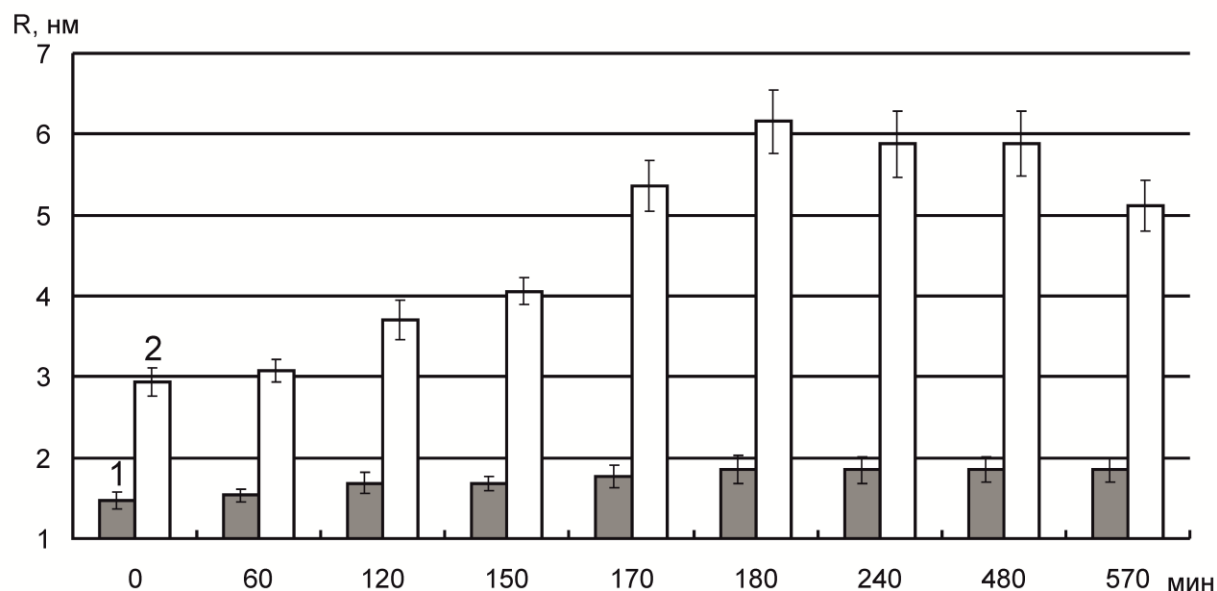
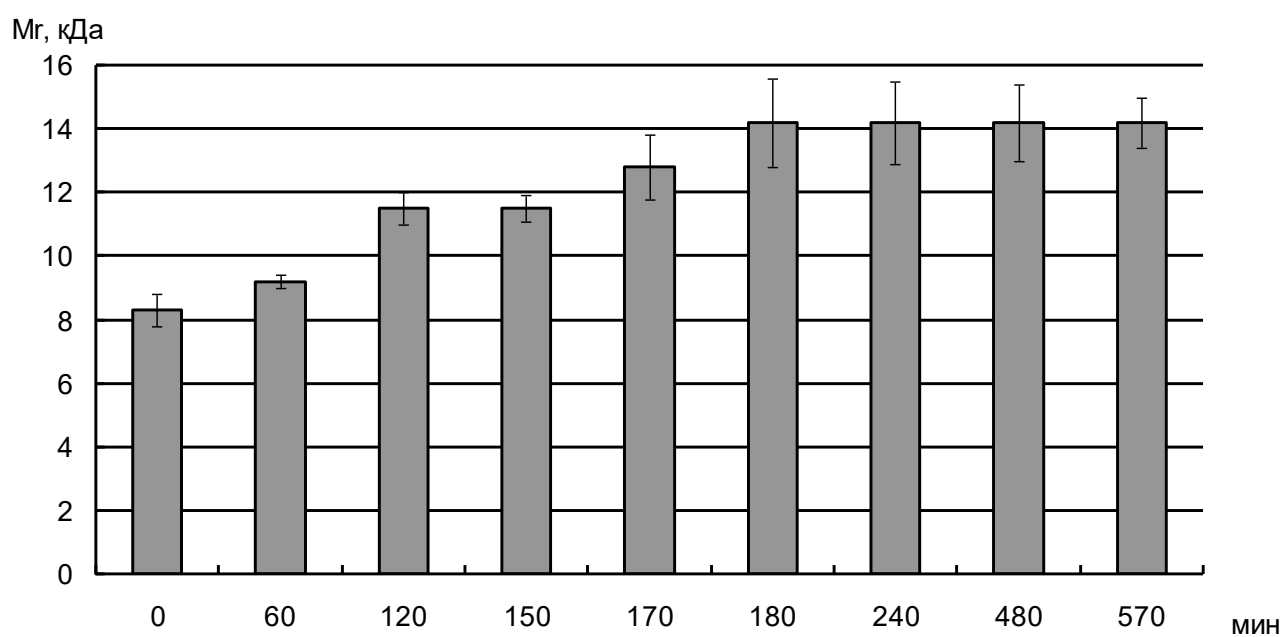
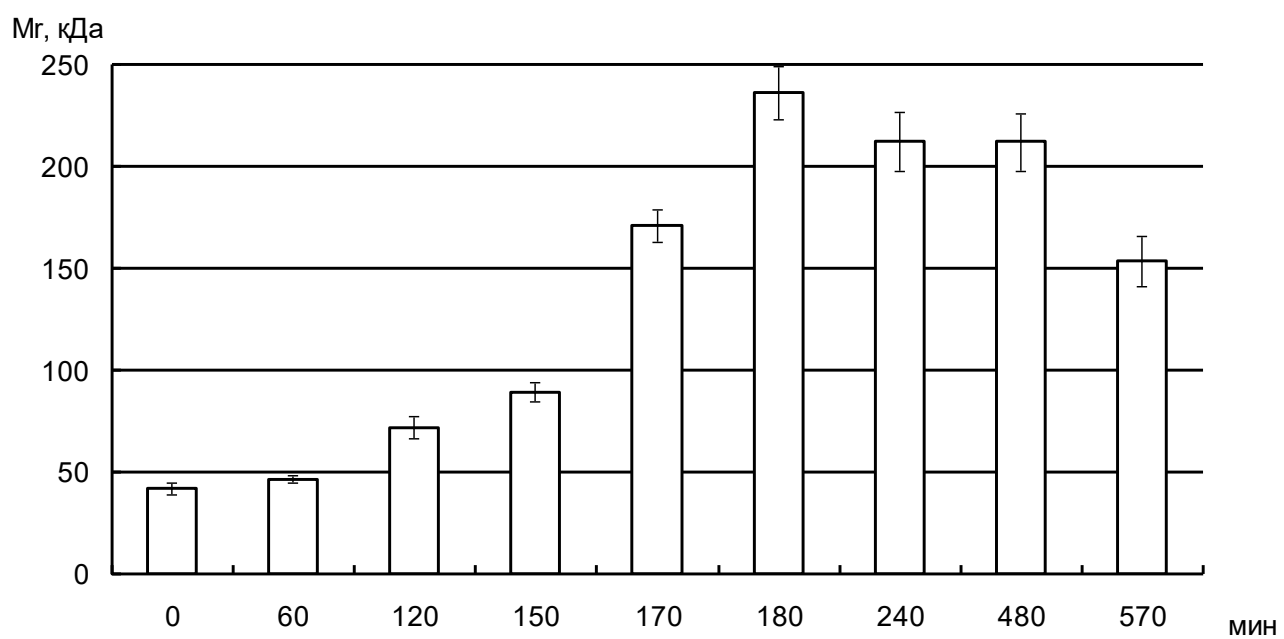


Рис. 23. Радиус (R) молекул инулиназы и их агрегатов при рН среды 3,0:

1 – первый пик, 2 – второй пик



А



Б

Рис. 24. Масса молекул инулиназы при рН среды 3,0: А – первый пик, Б – второй пик

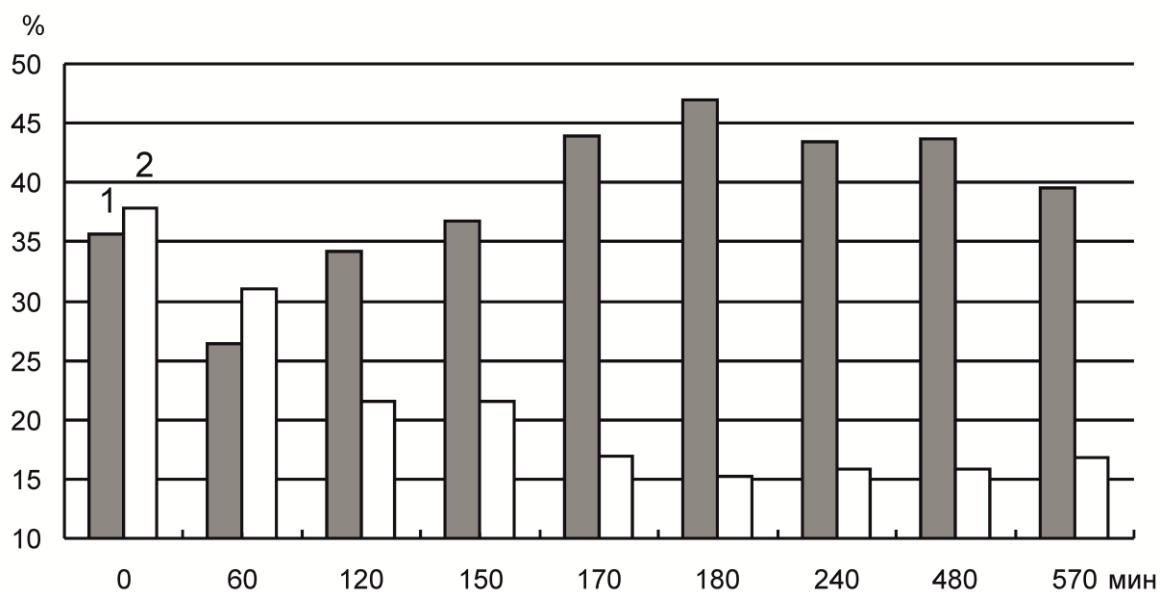


Рис. 25. Содержание (%) частиц различного размера при рН среды 3,0:  
1 – первый пик, 2 – второй пик

Количество частиц из первого пика после 1 часа инкубации снижается с 36 до 26 %, после 2 часов составляет 34 %, после 2,5 часов – снова 36 %, а далее от 3 до 9,5 часов инкубации возрастает и остается на уровне 40-47 %. Количество частиц из второго пика в первый час снижается с 37 до 31 %, через 2-2,5 часа составляет 21,5 %, и далее от 3 до 9,5 часов инкубации остается на уровне 15-17 %.

При рН 13,0 в диапазоне времени до 40 мин и от 2 часов 20 мин мы наблюдали два пика, что указывает на наличие в растворе частиц с разным размером. При инкубации 50-130 мин мы регистрировали наличие одного пика порядка 6 нм, кроме 50 мин, где размер молекул был  $4,7 \pm 0,3$ , что соответствует димерной форме инулиназы. Примечательно, что первый пик в период инкубации до 30 мин составляет порядка 4 нм, при 40 мин и 230 мин – 3 нм, при других периодах инкубации колеблется в пределах 3-4 нм. Второй пик без инкубации соответствует  $15,5 \pm 1,5$  нм и далее постепенно снижает свою величину до  $6,4 \pm 0,5$  нм при 40 мин. После 140 мин размер частиц, соответствующих второму пику, составляет  $7,4 \pm 0,5$  нм и в остальной

промежуток времени колеблется в пределах порядка 6,5-10 нм (рис. 26). Масса частиц из 1 пика варьирует от 90 до 100 кДа при инкубации в течение получаса и от 10 до 70 кДа в остальной промежуток времени (рис. 27).

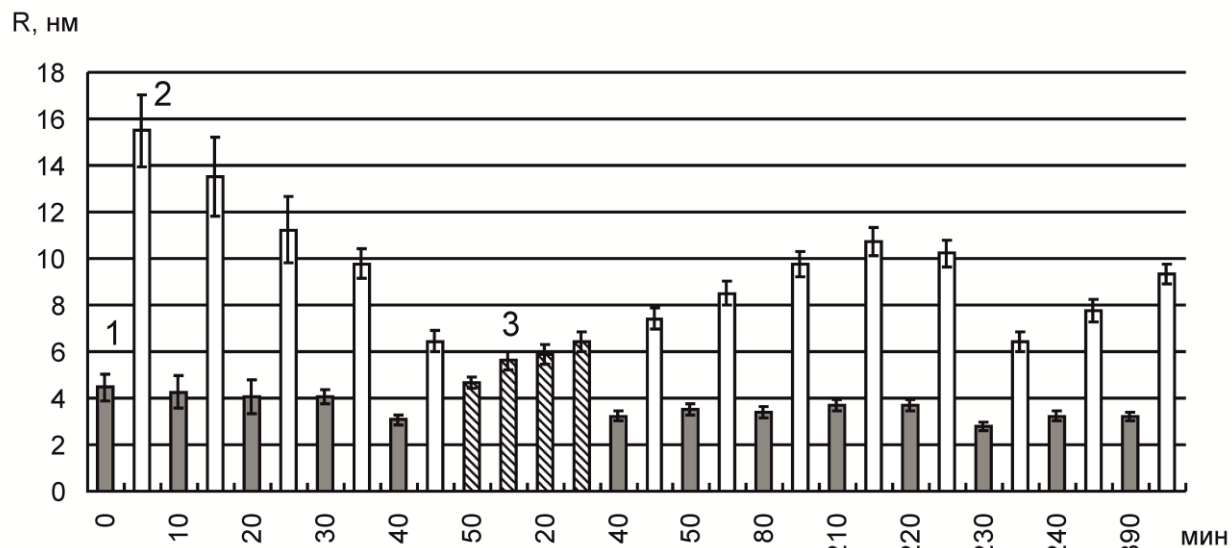


Рис. 26. Радиус (R) молекул инулиназы и их агрегатов при рН среды 13,0: 1 – первый пик, 2 – второй пик, 3 – единственный пик

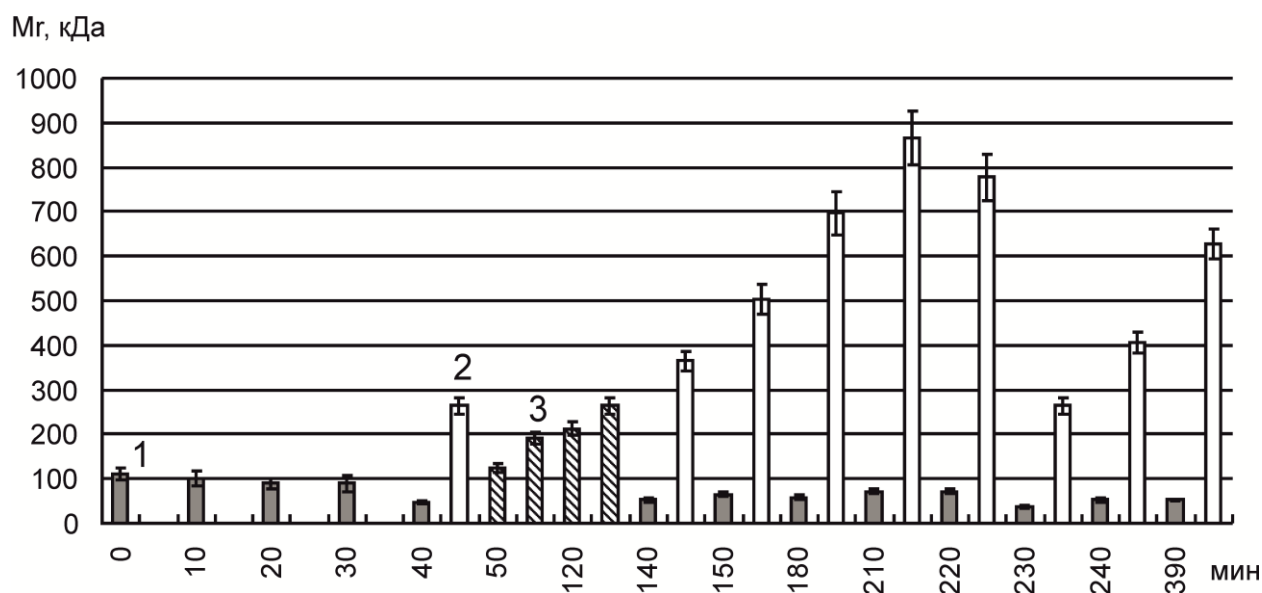


Рис. 27. Масса молекул инулиназы и их агрегатов при рН среды 13,0: 1 – первый пик, 2 – второй пик, 3 – единственный пик

Число частиц, относящихся к первому пику, составляет 38-47 % при инкубации в течение 20 мин, снижается до 24 % после получаса и остается на уровне 5-10 % в остальной промежуток времени. Количество частиц из второго пика постепенно увеличивается при инкубации в течение 30 мин с 8,4 до 19,8 %, при 40 мин составляет 16,9 % и не превышает 10,7 % в остальной промежуток времени (рис. 28). Из всего изложенного выше можно предположить, что при рН 13,0 в интервале времени инкубации до 30 мин в растворе встречаются тетрамерные формы фермента, которые затем диссоциируют на димеры и мономеры при увеличении времени инкубации.

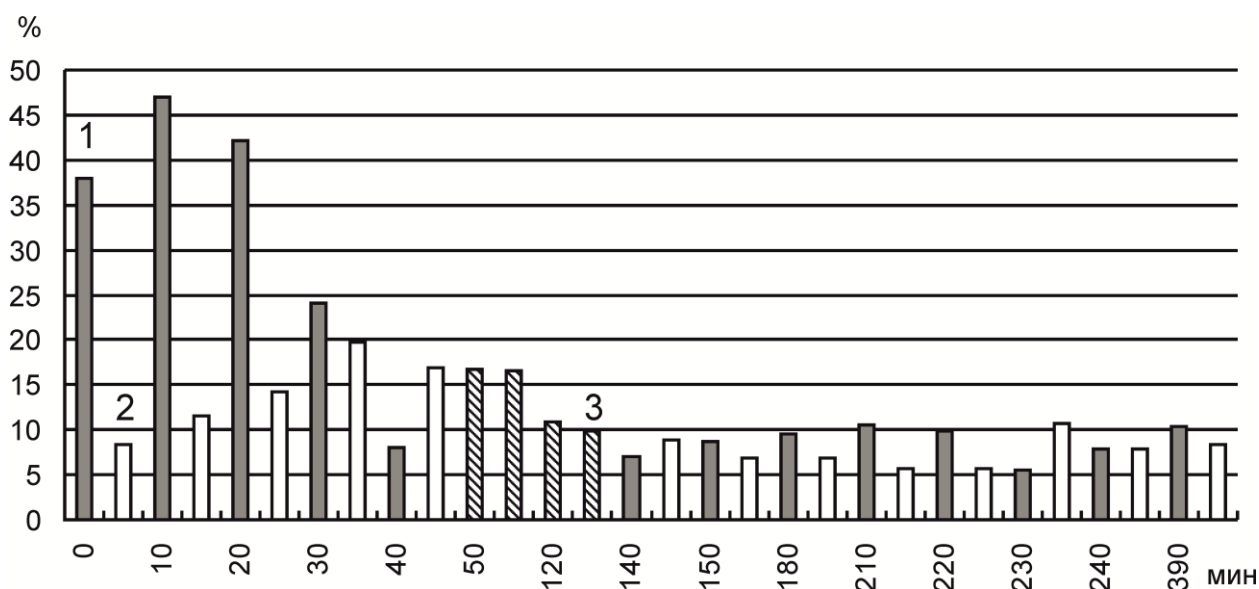


Рис. 28. Количество частиц (%) различного размера при рН среды 13,0: 1 – первый пик, 2 – второй пик, 3 – единственный пик

На рис. 29 отражена предлагаемая нами схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на воздействие различных значений рН среды.

рН	Каталитическая активность		Процесс
	Снижение активности ↑		
13,0	Снижение активности ↑	0	Образование тетрамеров, которые после 30 мин инкубации постепенно диссоциируют ↑
6,5 6,0 5,0		0 ~ 7 % ~ 87 %	Модификация третичной структуры белка
4,7		100 %	<b>Преобладание димерной формы фермента</b> ↑ ↓
4,5	Снижение активности ↓	более 80 %	Появление димеров с измененной пространственной структурой ↓
3,5		20 %	Образование октамерных форм (до 11,5 %) и более крупных ассоциатов, количество которых возрастает с увеличением времени инкубации ↓
3,0		0	Практически полная диссоциация молекулы инулиназы на субъединицы, после трех часов инкубации вновь образуются димеры

Рис. 29. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на воздействие высоких и низких значений рН среды

При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении рН 4,7 (каталитическая активность фермента принята за 100 %) молекулы энзима находятся преимущественно в димерной форме. При повышении или понижении рН относительно значения 4,7 происходит частичная или полная (рН 3,0 и рН 6,5 и выше) потеря функциональной способности инулиназы. При рН среды в диапазоне 5,0-6,5 единиц



происходит модификация третичной структуры белка, которая при рН 13,0 приводит к обратимому формированию неактивных тетрамеров молекул фермента. При рН 4,5 мы регистрировали появление димеров с измененной пространственной структурой, сохраняющих более 80 % каталитической способности. При рН 3,5 – детектировали образование октамерных форм (до 11,5 % от общего числа частиц в системе) и более крупных ассоциатов, количество которых возрастало с увеличением времени инкубации. При значении рН 3,0 происходила практически полная (но обратимая) диссоциация молекулы инулиназы на субъединицы, которые не проявляли функциональной активности. Таким образом, можно заключить, что значение рН среды оказывает существенное влияние на процессы ассоциации-диссоциации инулиназы и ее субъединиц, которые, однако, не связаны напрямую с эффективностью форм фермента как катализатора реакции гидролиза инулина.

#### 4.2. Кинетические свойства инулиназ

Для того, чтобы четко различать инулиназу и инвертазу, применяют так называемое I/S отношение, то есть отношение активностей при использовании инулина (I) и сахарозы (S) в качестве субстратов. Инулиназой считают фермент, имеющий коэффициент I/S больше  $10^{-2}$ , а инвертазой – меньше  $10^{-4}$  (Singh R.S., 2017). Ряд авторов для этой же цели используют S/I отношение. E.J. Vandamme и D.G. Derycke (1983) показали, что отношение активности к сахарозе и инулину обычно значительно выше для инвертаз ( $\geq 1500$ ) и ниже для инулиназ ( $\leq 10$ ). Например, S/I отношение для рекомбинантной инулиназы из *Escherichia coli* составило  $2,24 \pm 0,70$  (Yedahalli S.S., 2016). Установлено, что отношения I/S и S/I зависят от рН среды, температуры и метода определения ферментативной активности (Workman W.E., 1984).

Из клубней *Helianthus tuberosus* был выделен ряд микроорганизмов, синтезирующих инулиназу. Среди них были плесневый грибок, дрожжи, актиномицет и бактерия (штаммы KU-F1, KU-Y1, KU-A1 и KU-B3). Для штаммов KU-F1, KU-Y1, KU-A1 I/S отношение составляло соответственно 0,19, 0,11 и 0,3. Бактериальный штамм KU-B3 не проявлял инвертазной активности (Sirisansaneeyakul S., 2007). У инулиназы из *Penicillium oxalicum* BGPUP-4 отношение I/S было равно 2,64 (Sihgh R.S., 2017), у энзима из *Penicillium* sp. NFCC 2768 – 1,84 (Rawat H.K., 2015b).

М. Ettalibi и J.C. Baratti (1990) для того, чтобы отличить инулиназу от инвертазы, предложили использовать другой критерий – отношение констант  $k_{cat}/K_m$ : если деление значения  $k_{cat}/K_m$  при гидролизе ферментом инулина на значение  $k_{cat}/K_m$  при расщеплении сахарозы дает число меньше 1, то фермент считается инвертазой, если больше 1 – инулиназой.

Такие важнейшие кинетические параметры, как  $K_m$  и  $V_{max}$ , при гидролизе инулина и других субстратов для некоторых инулиназ, представлены в табл. 12. Значение  $K_m$  для инулиназы по отношению к инулину располагается в диапазоне от 0,003 до 86,9 мМ. Для большинства промышленных ферментов  $K_m$  составляет 0,01-100 мМ, что дает основание считать некоторые инулиназы перспективными для использования в современных технологических линиях (Arand M., 2002, Kushi R.T., 2000, Корнеева О.С., 2001, Uhm T.B., 1999, Mutanda T., 2009, Gill P.K., 2004, 2006, Goosen C., 2007, Nakamura T., 1997, Pessoni R.A., 1999, 2007, Jahnz U., 2001, Yokota A., 1991, Kim K.Y., 2005, Kwon H.J., 2003, Gao W., 2009, Vullo D.L., 1991, Drent W.J., 1991, Letca D., 2004, Kwon Y.M., 2000, Vandamme E.J., 1983, Sheng J., 2008).

Значения  $K_m$  и  $V_{max}$  для инулиназ из различных продуцентов

Продуцент	$K_m$ , мМ	$V_{max}$	Источник литературы
1	2	3	4
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	7,7-10	–	(Kim W.Y., 1982)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	13,3	–	(Вайраи Р., 1987)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0,31	–	(Vandamme E.J., 1983)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	11,9 15,7 <sup>1</sup> 8,2 <sup>2</sup> 9,7 <sup>3</sup>	122 ед/мл <sup>1</sup> 38 ед/мл <sup>2</sup> 32 ед/мл <sup>3</sup>	(Rouwenhorst R.J., 1988, 1990)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CDBB-L-278	3,04	–	(Cruz-Guerrero A., 1995)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-1196	3,92 11,9 <sup>2</sup>	–	(Ку М.А., 1994)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	7,1 13 <sup>1</sup>	17,79 М/мин 10,72 М/мин <sup>1</sup>	(Mazutti M., 2007, Treichel H., 2009)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	86,9 4,58 <sup>1</sup> 7,41 <sup>2</sup>	53,7 ед/мг 441 ед/мг <sup>1</sup> 240 ед/мг <sup>2</sup>	(Kushi R.T., 2000)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-303	0,22	102 мкмоль/(мг×мин)	<b>наши данные</b>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	3,4 25,3 <sup>2</sup> 27 <sup>3</sup>	7,6 мкМ/мин 16,6 мкМ/мин <sup>2</sup> 2 мкМ/мин <sup>3</sup>	(Singh R.S., 2007)
<i>Helianthis tuberosus</i> I II III	1,9 2,4 9,1	91 мкмоль/(мг×мин) 48 мкмоль/(мг×мин) 37 мкмоль/(мг×мин)	<b>наши данные</b>
<i>Aspergillus awamori</i>	25	13,8 мкмоль/(мг×мин)	(Шкутина И.В., 2012)
<i>Aspergillus fumigatus</i> C11	2,18	1590 мкмоль/(мг×мин)	(Chen M., 2015)

Окончание табл. 12

1	2	3	4
<i>Penicillium canescens</i> Inu1_Awa <sup>7</sup>	27 <sup>4</sup> 25 <sup>5</sup> 11 <sup>6</sup> 8,1 <sup>1</sup>		(Волков П.В., 2012)
<i>Penicillium canescens</i> InuA_Anig <sup>7</sup>	12 <sup>4</sup> 15 <sup>5</sup> 4,9 <sup>6</sup>		(Волков П.В., 2012)
<i>Pichia pastoris</i> X-33 <sup>7</sup>	0,322	4317 мкмоль/(мг×мин)	(Ma J.Y., 2016)
<i>Escherichia coli</i> <sup>7</sup>	5,3 12,2	402 мкмоль/(мг×мин) <sup>1</sup> 903 мкмоль/(мг×мин) <sup>1</sup>	(Yedahalli S.S., 2016)
<i>Escherichia coli</i> <sup>7</sup>	8,2	416,7 мкмоль/(мг×мин)	(Zhou J., 2015)

<sup>1</sup> по отношению к сахарозе

<sup>2</sup> по отношению к раффинозе

<sup>3</sup> по отношению к стахиозе

<sup>4</sup> по отношению к инулину из топинамбура, г/л

<sup>5</sup> по отношению к инулину из георгина, г/л

<sup>6</sup> по отношению к инулину из цикория, г/л

<sup>7</sup> инулиназа была экспрессирована в данный организм

Данные по кинетическим характеристикам гидролиза инулиназами различных субстратов немногочисленны. Окончательно не решен вопрос об их специфичности, максимальной каталитической способности и степени сродства к ряду поли-, олиго- и дисахаридов; не проведена также систематизация (упорядочивание) единиц их представления.

#### 4.3. Анализ степени корреляции между аминокислотными последовательностями инулиназ из различных продуцентов и их физико-химическими свойствами

Компьютерный анализ аминокислотных последовательностей инулиназ *in silico* из различных продуцентов может создать предпосылки к составлению прогнозов относительно структурно-функциональных особенностей фермента, строения его активного и субстратсвязывающих центров, механизма катализа, кинетических и физико-химических свойств. Детальный анализ макромолекул энзимов на всех уровнях их организации в сочетании с классическими подходами биофизики и биохимии позволяет выявить молекулярные механизмы действия инулиназ. На сегодняшний день возможность предсказать свойства фермента, исходя из его аминокислотной последовательности, является одной из главнейших задач современной интегративной биологии.

Сведения о первичных структурах инулиназ были получены в National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). В табл. 13 представлены максимальные и минимальные значения некоторых структурных характеристик инулиназ. Общее количество аминокислотных остатков в составе инулиназ варьирует в широких пределах – от 485 у ферментов из *Paenibacillus polymyxa*, *Arthrobacter aureescens* до 1074 у энзима из *Rhodopirellula baltica*. Содержание гидрофильных и особенно гидрофобных остатков характеризуется большим постоянством: 31,53-40,88 % и 51,72-59,11 %, соответственно. Ядро инулиназ формируют от 21,79 до 36,97 % аминокислот в зависимости от продуцента, а в состав упорядоченных структур ( $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складчатости) входит от 61,25 (у энзима из *Penicillium species*) до 88,95 % (у фермента из *Aspergillus niger*) остатков.

## Структурные характеристики инулиназ из различных продуцентов

Показатель*	Максимальное значение	Минимальное значение
1	2	3
общее количество аминокислотных остатков	1074 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	485 ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Arthrobacter aureus</i> )
гидрофобные, %	59,11 ( <i>Arthrobacter</i> species S37)	51,72 ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> )
гидрофильные, %	40,88 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	31,53 ( <i>Arthrobacter</i> species S37)
алкильные, %	40,88 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	21,58 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> )
кислые, %	16,11 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	5,05 ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )
основные, %	13,90 ( <i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)	7,26 ( <i>Penicillium</i> species)
поверхностные, %	41,78 ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> )	31,53 ( <i>Arthrobacter</i> species S37)
<b>находятся в:</b>		
ядре, %	36,97( <i>Cichorium intibus</i> )	21,79 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)
$\alpha_N$ , %	22,35 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	14,71 ( <i>Aspergillus niger</i> )
$\alpha$ , %	22,07 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	11,36 ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> )
$\alpha_C$ , %	13,90 ( <i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)	7,26 ( <i>Penicillium</i> species)
до $\alpha_N$ , %	37,52 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> )	26,83 ( <i>Cryptococcus aureus</i> )
за $\alpha_C$ , %	20,69 ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> )	11,73 ( <i>Talaromyces stripitatus</i> ATCC 10500)
$\beta$ , %	41,86 ( <i>Aspergillus niger</i> )	35,55 ( <i>Arthrobacter aureus</i> )
в петлях, %	41,28 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> )	33,02 ( <i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)
образуют $\alpha$ - и $\beta$ -структуры, %	88,95 ( <i>Aspergillus niger</i> )	61,25 ( <i>Penicillium</i> species)
образуют $\alpha$ -спирали, %	57,08 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	36,32 ( <i>Penicillium</i> species)

1	2	3
<b>не встречаются в:</b>		
$\alpha_N$ , %	12,78 ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	5,23 ( <i>Aspergillus niger</i> )
$\alpha$ , %	35,46 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> )	24,49 ( <i>Aspergillus ficuum</i> )
$\alpha_C$ , %	22,35 ( <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	14,71 ( <i>Aspergillus niger</i> )
$\beta$ , %	41,55 ( <i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)	29,05 ( <i>Aspergillus niger</i> )

\* основные структурные свойства аминокислотных остатков изложены в работе (Финкельштейн А.В., 2002)

Логично предположить, что оптимальное значение температуры для функционирования инулиназ зависит от отношения числа аминокислотных остатков, расположенных в упорядоченных структурах, к тому числу, что образуют петли (табл. 14), однако, подобной корреляции мы не обнаружили.

Примечательно, что не выявляется прямой связи между количеством аминокислотных остатков, образующих отдельно  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слои, и значением температурного- и pH-оптимумов инулиназы. Число остатков в  $\alpha$ -спиралях коррелирует только с видом продуцента, в частности, у энзимов из *Pichia guilliermondii*, *Cichorium intybus* и *Kluyveromyces marxianus* оно составляет 36,4-41,2 %, у ферментов из *Arthrobacter species* – 44,8-48,8 %, внутри рода *Aspergillus* варьирует в диапазоне 39,3-42,3 %, а внутри рода *Bacillus* находится в пределах 47-48 %.

Таблица 14

Количество аминокислотных остатков инулиназ, расположенных в различных структурах белковой макромолекулы

Продуцент	Отношение количества аминокислотных остатков			Остатки (%), входящие в состав	
	в $\alpha$ -спиралях и $\beta$ -слоях / в петлях	в $\beta$ -слоях / в петлях	гидрофобные / гидрофильные	$\alpha$ -спиралей	$\beta$ -слоев
<i>Arthrobacter species</i>	2,06	1,05	1,87	46,06	38,92
<i>Arthrobacter aurescens</i>	1,93	1,04	1,72	44,80	40,00
<i>Arthrobacter aurescens</i>	1,84	0,89	1,49	48,83	35,55
<i>Cryptococcus aureus</i>	1,86	0,98	1,80	45,17	39,38
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	2,14	1,14	1,43	45,51	41,12
<i>Pichia guilliermondii</i>	1,95	1,11	1,36	39,88	41,05
<i>Pichia guilliermondii</i>	1,95	1,11	1,36	40,27	40,86
<i>Cichorium intybus</i>	1,90	1,10	1,35	41,20	41,73
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,71	1,00	1,36	37,41	40,83
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,73	1,02	1,37	37,30	41,44
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,70	1,00	1,38	36,40	41,28
<i>Aspergillus awamori</i>	2,01	1,11	1,66	41,34	40,78
<i>Aspergillus awamori</i>	1,93	1,07	1,61	39,58	40,15
<i>Aspergillus ficuum</i>	1,89	1,08	1,61	40,70	41,28
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,90	1,08	1,76	40,72	41,29
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,93	1,04	1,55	42,25	39,54
<i>Aspergillus niger</i>	1,87	1,08	1,61	40,70	41,28
<i>Aspergillus niger</i>	1,89	1,08	1,58	40,89	41,09
<i>Aspergillus niger</i>	1,93	1,08	1,65	39,48	40,22
<i>Aspergillus niger</i>	1,85	1,05	1,51	40,69	40,69
<i>Aspergillus niger</i>	2,33	1,10	1,64	39,92	41,86
<i>Aspergillus niger</i>	1,93	1,08	1,66	39,29	40,22
<i>Bacillus polymyxa</i>	2,34	1,21	1,47	47,84	41,03
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	2,35	1,21	1,47	48,04	41,03
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1,99	1,11	1,24	41,38	41,38
<i>Bacillus subtilis</i>	1,88	0,96	1,69	47,06	38,34



Практически у всех инулиназ отношение числа аминокислотных остатков, образующих  $\beta$ -складчатости, к числу остатков, расположенных в петлях, имеет значение, близкое к 1. Однако у всех ферментов, выделенных из *Kluuveromyces marxianus*, оно несколько ниже, чем у энзимов из рода *Aspergillus*, что отчасти объясняет более высокий температурный оптимум функционирования инулиназ плесневого происхождения. Интересно, что отношение более 1,1 характерно для белков из *Pseudomonas tucidolens*, *Pichia guilliermondii* и *Geobacillus stearothermophilus*, для которых оптимальными условиями являются pH 6,0 и температура соответственно 55, 60 и 60° С. Самое высокое значение (1,21) наблюдается у инулиназ из *Bacillus polymyxa* и *Paenibacillus polymyxa*, что может обуславливать их pH-оптимум 7,0, резко отличающийся от ферментов из других продуцентов, либо является просто отличительной особенностью энзимов из данного вида бактерий.

Мы также не наблюдали прямой корреляции между температурными оптимумами инулиназ и отношением содержания гидрофобных аминокислотных остатков к гидрофильным. Выявляется лишь тенденция к тому, что данный показатель выше у инулиназ бактериального происхождения, немного ниже – у плесневых ферментов, еще ниже – у дрожжевых энзимов.

Итак, исследование аминокислотных последовательностей инулиназ из различных продуцентов является полезным на первых этапах изучения структурно-функциональных свойств ферментов, но оно является недостаточным для составления достоверных прогнозов относительно оптимальных условий функционирования, стабильности, длительности хранения инулиназ и перспектив их применения в промышленных циклах, а, следовательно, должно быть дополнено и углублено работами биофизического и биохимического характера.

#### 4.4. Сравнительный анализ первичных структур инулиназ из *Aspergillus ficium* и *Kluuveromyces marxianus*

В табл. 15 представлен сравнительный анализ структур инулиназ из *Aspergillus ficium* и *Kluuveromyces marxianus* с аминокислотными последовательностями других инулиназ из базы данных NCBI. Процент перекрывания (Query cover) последовательностей и их идентичность (Ident) были рассчитаны в программе Blast. Сравнительный анализ структур этих инулиназ был проведен нами, т.к. именно для них далее мы осуществляли виртуальный скрининг агентов для иммобилизации.

Из табл. 15 видно, что первичные структуры инулиназ из *Aspergillus ficium* и *Kluuveromyces marxianus* идентичны всего на 31 %. Интересно отметить, что при близких значениях степени идентичности с инулиназами из *Magnaportheopsis poae* ATCC 64411 (32 и 38 % соответственно) и *Papiliotrema aurea* (34 и 37 % соответственно) эндоинулиназа из *Aspergillus ficium* и экзоинулиназа из *Kluuveromyces marxianus* существенно отличаются от названных выше структур в степени перекрывания – соответственно 61 и 87 % с первой, 52 и 93 % – со второй последовательностью.

Неожиданным является также практически идентичный процент перекрывания (93 и 94 %) исследованных нами инулиназ с аминокислотной последовательностью инвертазы из *Saccharomyces cerevisiae*, которая по механизму действия близка к экзоинулиназам, что подтверждается идентичностью ее первичной структуры на 51 % с экзоинулиназой и лишь на 27 % с эндоинулиназой.

Таблица 15

Сравнительный анализ структур инулиназ из *Aspergillus ficium* и *Kluyveromyces marxianus* с аминокислотными последовательностями других инулиназ из базы данных NCBI

Эндоинулиназа из <i>Aspergillus ficium</i>		Фермент	Шифр последовательности в NCBI	Экзоинулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	
Процент перекрытия (Query cover), %	Идентичность (Ident), %			Процент перекрытия (Query cover), %	Идентичность (Ident), %
1	2	3	4	5	6
<b>64</b>	<b>31</b>	<b>Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i></b>	<b>CAA48500.1</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
64	31	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	AAN32611.1	100	99
93	26	Экзоинулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	AAT70412.1	95	98
93	27	Инвертаза из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BAJ07815.1	94	51
98	28	Инулиназа из <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ABW75766.2	93	47
80	32	Инулиназа из <i>Candida kutaonensis</i>	CCF77887.1	91	46
14	46	$\beta$ -фруктофуранозидаза из <i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> ATCC 15697	ALY05367.1	14	45
91	27	Инулиназа из <i>Papiliotrema aurea</i>	AFO84001.1	94	42
89	28	Инулиназа из <i>Valsa mali var. pyri</i>	KUI59739.1	87	41

1	2	3	4	5	6
91	27	Инулиназа из <i>Shiraia</i> sp. slf14	AOY07795.1	87	40
89	28	Инулиназа из <i>Valsa mali</i>	KUI64208.1	89	39
61	32	Инулиназа из <i>Magnaportheopsis poae</i> ATCC 64411	KLU89857.1	87	38
98	62	Инулиназа из <i>Aspergillus udagawae</i>	GAO81637.1	87	38
52	34	Инулиназа из <i>Pariliotrema aurea</i>	ACC61059.1	93	37
95	34	$\beta$ -фруктофуранозидаза из <i>Raenibacillus</i> sp. TI45-13ar	ODP28006.1	92	33
91	34	$\beta$ -фруктофуранозидаза из <i>Microbulbifer</i> sp. JAM-3301	BAL70274.1	90	33
93	37	Экзоинулиназа из <i>Arthrobacter</i> sp. MN8	AGC01505.1	87	33
91	34	Экзоинулиназа из <i>Raenibacillus polyмуха</i>	AAL82575.1	87	33
93	34	Экзоинулиназа из <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	BAC45010.1	85	35
93	34	Экзоинулиназа из <i>Pseudomonas tucidolens</i>	AAF44125.1	87	35
89	32	Инулиназа из <i>Arthrobacter</i> sp. MWB30	KIA74147.1	87	33
94	35	Экзоинулиназа из <i>Aspergillus luchuensis</i>	GAT18742.1	89	33
94	34	Инулиназа из <i>Byssoschlamys spectabilis</i> No. 5	GAD92596.1	88	32
94	34	Инулиназа из <i>Penicillium citrinum</i>	AIY26830.1	91	32
<b>100</b>	<b>100</b>	<b>Инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i></b>	<b>CAA07345.1</b>	<b>73</b>	<b>31</b>
94	36	Фруктозилтрансфераза из <i>Raenibacillus polyмуха</i>	CAA81392.1	87	30
100	99	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	AAK43726.1	64	30
100	99	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	EHA19510.1	64	30
93	29	Экзоинулиназа из <i>Bacillus licheniformis</i>	AGR40655.1	57	30
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. vasinfectum 25433]	EXM16508.1	89	29
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. pisi HDV247	EXA30199.1	87	29
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	EWZ28230.1	87	29

1	2	3	4	5	6
98	63	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. conglutinans race 2 54008	EXL68891.1	87	29
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense race 4]	EMT72224.1	87	29
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense tropical race 4 54006]	EXL91590.1	87	29
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. radicis-lycopersici 26381	EXL54341.1	87	29
94	64	Инулиназа из <i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	KMK58827.1	87	29
91	66	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense race 1	ENH74256.1	85	29
98	63	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. raphani 54005]	EXK77357.1	68	29
98	63	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. conglutinans race 2 54008	EXL66374.1	68	29
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	EWZ28461.1	68	29
95	94	Эндоинулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	AAN64131.1	64	29
89	24	6-, и 1- фруктан экзогидролаза из <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568254.1	38	29
88	27	β-фруктозидаза из <i>Lactobacillus paracasei</i>	AKA87712.1	88	28
97	73	Инулиназа из <i>Talaromyces cellulolyticus</i>	GAM42287.1	87	28
98	64	Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> FOSC 3-a	EWY84367.1	87	28
98	62	Инулиназа из <i>Diaporthe helianthi</i>	OCW33198.1	87	28
90	25	Фруктан 1-экзогидролаза I из <i>Cichorium intybus</i>	CAC19366.1	51	27
92	26	Фруктан β-фруктозидаза из <i>Streptococcus gallolyticus subsp.</i> <i>gallolyticus</i> ATCC 43143	BAK27009.1	91	26
93	26	β-фруктофуранозидаза из <i>Vibrio scophthalmi</i>	ANU38700.1	88	26

Окончание табл. 15

1	2	3	4	5	6
89	24	6-, и 1- фруктан экзогидролаза из <i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	EFH47764.1	57	26
95	24	Сахарозо-6-фосфат гидролаза из <i>Bifidobacterium adolescentis</i> L2-32	EDN82157.1	86	25
93	27	Эндоинулиназа из <i>Arthrobacter</i> sp. S37	CAB63119.1	73	24
91	25	$\beta$ -фруктофуранозидаза из <i>Raenibacillus</i> sp. TI45-13ar	ODP26905.1	87	23
43	28	Эндоинулиназа из <i>Microbulbifer</i> sp. JAM-3301	BAL70275.1	78	22

Экзоинулиназы из *Arthrobacter* sp. MN8, *Paenibacillus polymyxa*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas mucidolens* и *Aspergillus luchuensis* идентичны эндоинулиназе из *Aspergillus ficuum* соответственно на 37, 34, 34, 34 и 35 % (процент перекрывания последовательностей составляет 93, 91, 93, 93 и 94 %), а экзоинулиназе из *Kluyveromyces marxianus* – на 33, 33, 35, 35 и 33 % (процент перекрывания последовательностей – 87, 87, 85, 87 и 89 %). При этом степень перекрывания аминокислотной последовательности экзоинулиназы из *Bacillus licheniformis* с исследуемой нами грибной инулиназой составляет 93 %, с дрожжевым ферментом – 57 % (при идентичности структур 29 и 30 % соответственно).

Сродство эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* с 6-, и 1-фруктан экзогидролазами из *Arabidopsis thaliana* и *Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata* оказалось выше (89 % перекрывания и 24 % идентичности), чем у экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (соответственно 38 и 57 % перекрывания, 29 и 26 % идентичности). Фруктан 1-экзогидролаза I из *Cichorium intybus* также оказалась ближе по первичной структуре к грибной эндоинулиназе (90 % перекрывания и 25 % идентичности), чем к дрожжевой экзоинулиназе (51 % перекрывания и 27 % идентичности).

Эндоинулиназа из *Arthrobacter* sp. S37, как и ожидалось, более близка к инулиназе из *Aspergillus ficuum* (93 % перекрывания и 27 % идентичности), чем к ферменту из *Kluyveromyces marxianus* (73 % перекрывания и 24 % идентичности), однако, эндоинулиназа из *Microbulbifer* sp. JAM-3301 показала иной результат – 43 % перекрывания и 28 % идентичности с исследуемой нами эндоинулиназой и 78 % перекрывания и 22 % идентичности с дрожжевой экзоинулиназой.

Из всего изложенного выше можно заключить, что далеко не во всех случаях механизм гидролиза субстрата определяет степень гомологии инулиназ и родственных им ферментов. Возможно, некоторые инулиназы могут выступать и как эндо, и как экзо-ферменты, т.е. обладают обоими типами каталитической активности по отношению к фруктанам.

#### 4.5. Компьютерный анализ вторичных структур инулиназ из различных продуцентов

При исследовании ферментных препаратов промышленного назначения в настоящее время достаточно актуальны проблемы изучения их структурных особенностей, трактовки механизма катализа, идентификации функциональных групп активных и субстратсвязывающих центров энзима. Эти знания помогают существенно удешевить процесс производства за счет сокращения стадии НИОКР и усовершенствовать технологические линии. Особенности вторичных структур белков обуславливают их пространственную организацию, следовательно, и эффективность функционирования. С этой целью нами был проведен сравнительный анализ вторичных структур инулиназ из разных продуцентов на основании расчета соотношения  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев и неупорядоченных участков макромолекул ферментов.

Сведения об аминокислотных последовательностях инулиназ получали в National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). Соотношение упорядоченных и неупорядоченных структур в составе молекул инулиназ определяли с помощью двух программ:

- 1) GOR (Garnier-Osguthorpe-Robson) – метод основан на определении вероятности соответствия количества неупорядоченных структур,  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев параметрам, полученным с помощью рентгеновской кристаллографии для известного белка. Метод GOR учитывает не только «склонности» индивидуальных аминокислот, но также и вероятность образования  $\alpha$ -спирали или  $\beta$ -слоя с учетом соседних аминокислотных остатков ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.plpage=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_gor4.html)).
- 2) SOPMA (Self-Optimized Prediction Method with Alignment) – прогнозирует расположение аминокислотных остатков не только в составе  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев и неупорядоченных структур, но также в составе поворотов и



«шпилек» белковых макромолекул ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.plpage=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_sopma.html)).

На основании полученных нами расчетных данных трудно четко и однозначно выявить зависимость между структурными особенностями инулиназы и ее физико-химическими свойствами, однако, можно получить сведения о пределах колебаний тестируемых показателей. В табл. 16 обобщены результаты расчетов, полученных в программах GOR и SOPMA (столбец 3), а также экспериментальные данные различных исследователей (столбец 4). Ферменты сгруппированы по таксономической принадлежности их продуцентов – дрожжи, микромицеты, бактерии, а внутри таксономической группы продуценты распределены по увеличению температурного оптимума выделенных из них инулиназ.

Логично предположить, что оптимальное значение температуры для функционирования инулиназ зависит от отношения количества аминокислотных остатков, расположенных в упорядоченных структурах, к тем, что образуют петли, однако, подобной корреляции мы не обнаружили ни при сопоставлении первичных структур различных инулиназ, ни при анализе их вторичных структур. Соотношение числа аминокислотных остатков в  $\alpha$ -спиралях,  $\beta$ -слоях и неупорядоченных структурах коррелирует с видом продуцента в большей степени, чем с физико-химическими характеристиками фермента. Наши модельные расчеты мы сопоставили с собственными данными по ИК-спектроскопии, которая позволяет получать сведения о вторичной структуре белков (соотношении  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев и неупорядоченных структур) и успешно применяется российскими и западными учеными для этих целей (Сердюк И., 2009, Файзуллин Д.А., 2013, Валиуллина Ю.А., 2014). Из табл. 17 видно, что по результатам эксперимента фермент, выделенный из *Kluveromyces marxianus*, имеет более упорядоченную структуру по сравнению с инулиназой из *Aspergillus awamori* и *Aspergillus niger*: у него наблюдается меньшая протяженность нерегулярных участков и большая протяженность  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев.

Таблица 16

Структурные и физико-химические характеристики инулиназ из различных продуцентов

1 Продуцент	2 Источник аминокислотной последовательности	3 Содержание типов вторичной структуры в молекуле инулиназы (%), рассчитанное в программах						4 Свойства фермента		5 Источник литературы
		GOR			SOPMA			t, °C	рН	
		α-спирали	β-слои	неупорядоченные структуры	α-спирали	β-слои	неупорядоченные структуры			
<b>Дрожжи</b>										
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Wang J.H., 2004)	6,38	36,77	56,85	5,82	30,77	56,66			(Vandamme E.J., 1983, Pessoa A., 1999, Rouwenhorst R.J., 1990, Mazutti M., 2007, Singh R.S., 2007, наши данные)
	(Laloux O., 1991)	7,39	35,86	56,75	8,29	30,27	54,59			
	(Chapman W., 1994)	8,45	34,71	56,84	8,81	30,40	53,42	49-55	4,5-5,5	
	(Wen T.Q., 2003, Lertwattanasakul N., 2011)	8,47	34,23	57,30	7,39	32,25	52,97			

<b>Микромицеты</b>												
<i>Aspergillus ficuum</i>	(Uhm T., 1998, Pouyez J., 2012)	8,72	31,78	59,50	11,63	28,68	55,62	50	5,4	(Mutanda T., 2009)		
	(Chen X.-M., 2010)	18,81	26,63	54,56	9,31	28,12	55,49					
<i>Aspergillus niger</i>	(Ohta K., 1998)	7,36	33,91	58,73	10,08	30,43	53,10	50-60	4,0-6,0	(Ongen-Baysal G., 1994, Goosen C., 2007)		
	(Wang J.H., 2002)	6,07	32,59	61,34	8,10	28,74	56,88					
	(Pel H.J., 2007)	7,75	31,2	61,05	10,66	29,07	54,46					
	(Ohta K., 1998)	8,72	31,78	59,50	10,47	30,04	53,88					
	(Ohta K., 1998)	18,81	26,26	54,93	10,99	28,86	54,38					
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(Nierman W.C., 2005)	14,94	27,45	57,61	9,39	30,30	52,63	60	5,5-6,0	(Gill P.K., 2004, 2006)		
	(Fedorova N.D., 2008)	13,26	25,57	61,17	9,28	29,36	54,73					
<i>Aspergillus awamori</i>	(Arand M., 2002)	11,13	28,03	60,84	9,94	29,62	54,27		4,0	(Корнеева О.С., 2001)		
<b>Бактерии</b>												
<i>Bacillus polymyxa</i>	(Kim B.-W., 2002)	23,51	27,01	49,48	7,63	31,96	54,64	35-40	7,0	(Kwon H.J., 2003, Жеребцов Н.А., 2002)		
		20,81	26,85	52,34	13,67	25,49	55,05					
<i>Arthrobacter sp. S37</i>	(Kang S.I., 1998)	10,36	31,64	58,00	7,45	30,18	58,00	50	5,0	(Sheng J., 2008, Gao L., 2007, Gao L.M., 2007)		
		14,86	25,29	59,85	14,48	24,90	52,90					
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	(Kwon Y.-M., 1999)	14,77	29,74	55,49	9,58	30,54	52,50	55	6,0	(Kwon Y.-M., 2000)		
		11,36	32,05	56,59	9,13	31,85	53,14					
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	(Tsujiimoto Y., 2003)	11,36	32,05	56,59	9,13	31,85	53,14	60		(Tsujiimoto Y., 2003)		

Таблица 17

Содержание типов вторичной структуры инулиназ из различных продуцентов, рассчитанное с помощью компьютерных программ и метода ИК-спектроскопии

Продуцент	Источник аминокислотной последовательности	Содержание типов вторичной структуры в молекуле инулиназы (%), рассчитанное с использованием ИК-спектроскопии					
		GOR		SOPMA		использованное с	
		$\alpha$ -спирали и $\beta$ -слои	неупорядоченные структуры	$\alpha$ -спирали и $\beta$ -слои	неупорядоченные структуры	$\alpha$ -спирали и $\beta$ -слои	неупорядоченные структуры
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Wang J.H., 2004)	43,15	56,85	36,59	56,66	55	45
	(Laloux O., 1991)	43,25	56,75	38,56	54,59		
	(Chapman J.W., 1994)	43,16	56,84	39,21	53,42		
	(Wen T.Q., 2003, Lertwattanasakul N., 2011)	42,70	57,30	39,64	52,97		
<i>Aspergillus awamori</i>	(Arand M., 2002)	39,16	60,84	39,56	54,27	43	57
	(Ohta K., 1998)	41,27	58,73	40,51	53,10	45	55
(Wang J.H., 2002)	38,66	61,34	36,84	56,88			
(Pel H.J., 2007)	38,95	61,05	39,73	54,46			
(Ohta K., 1998)	40,50	59,50	40,51	53,88			
<i>Aspergillus niger</i>	(Ohta K., 1998)	45,07	57,93	39,85	54,38	45	55

Расхождение экспериментальных и расчетных результатов составило для инулиназы из *Aspergillus awamori* 3-4 %, для энзима из *Aspergillus niger* – 1-8 %, а для фермента из *Kluyveromyces marxianus* – 12-18 %. Колебания результатов при использовании названных программ составляли максимум 13-14 %.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что компьютерное моделирование вторичных структур инулиназ из различных продуцентов является перспективным на первых этапах изучения структурно-функциональных свойств ферментов, так как позволяет сэкономить временные и материальные ресурсы, его вполне достаточно для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик белковых молекул и экспресс-оценки их динамического состояния. Для получения более точных результатов расчетные данные должны быть подкреплены рядом работ биофизического и биохимического характера, в частности экспериментами с использованием методов ИК-спектроскопии, кругового дихроизма, рентгеноструктурного анализа.

#### 4.6. Исследование закономерностей процесса термической инактивации инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 и *Helianthus tuberosus*

По мере повышения температуры возрастают сила молекулярных столкновений и энергия внутримолекулярных колебаний, что приводит к разрыву водородных связей и неполярных взаимодействий и, как следствие, к денатурации биологических макромолекул. Термоустойчивость – важнейший критерий при отборе биокатализаторов промышленного значения, поэтому в данном разделе мы представляем результаты исследования процесса термоинактивации инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 и *Helianthus tuberosus*.

С целью изучения воздействия различных температур на структурно-функциональные свойства инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* нами были проведены эксперименты по исследованию термостабильности данных препаратов. Для этого растворы белков инкубировали в интервале времени 10-60 мин при различных температурах (50-80 °С) с последующим определением каталитической активности.

Анализируя не абсолютные значения активности дрожжевого фермента и растительных инулиназ I, II и III, а процент ее сохранения по сравнению с нативными препаратами при инактивации в диапазоне температур 50-80 °С, мы получили довольно интересные результаты. Динамика потери каталитической способности при 50 и 70 °С для всех трех ферментов из клубней *Helianthus tuberosus* сходна (рис. 30-33). При 60 °С наблюдается практически полное совпадение кривых инактивации для инулиназ II и III, у инулиназы I снижение каталитической способности происходит гораздо быстрее. При 80 °С мы также видим сходство по форме и значениям кривых инактивации для инулиназы II и III, инулиназа I в данных условиях инактивируется более глубоко в интервале времени 0-10 мин, но еще проявляет каталитическую способность после 40 минутной инкубации, тогда как две другие инулиназы уже не обладают активностью после нагревания в течение 30 мин.

При наибольшей каталитической активности нативного образца (19,9 ед/мг) и относительно высоком, по сравнению с инулиназами II и III, температурным оптимумом (48 °С) инулиназа I является менее устойчивой при 60 и 70 °С, чем инулиназы II и III (табл. 18). Константы скорости инактивации при названных температурах для инулиназы I выше, чем для инулиназ II и III и составляют 18,3 и 18,6 ч<sup>-1</sup>×10<sup>-3</sup> соответственно.

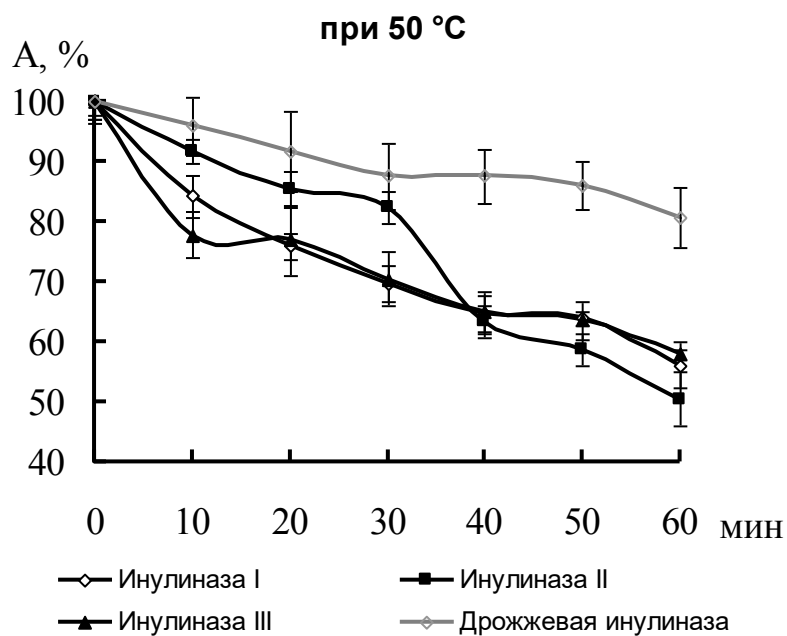


Рис. 30. Процент сохранения активности (А) инулиназ при 50 °С

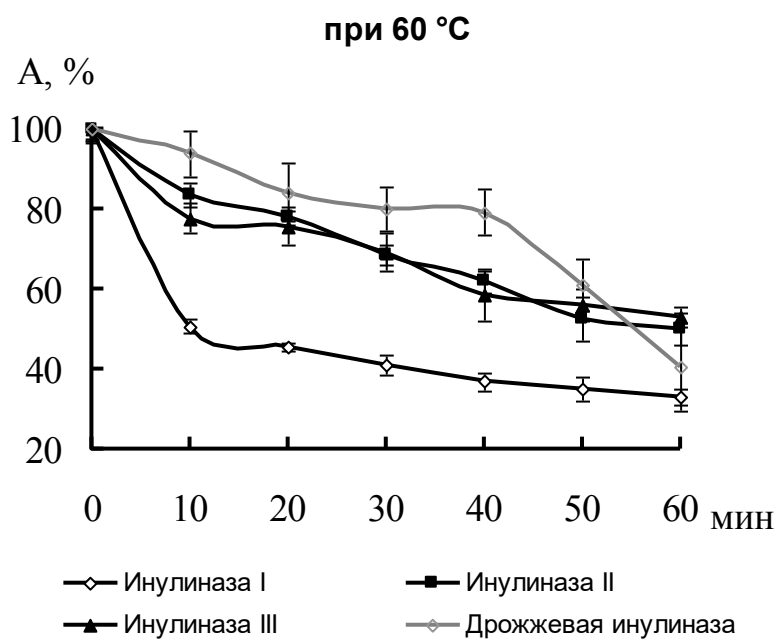


Рис. 31. Процент сохранения активности (А) инулиназ при 60 °С

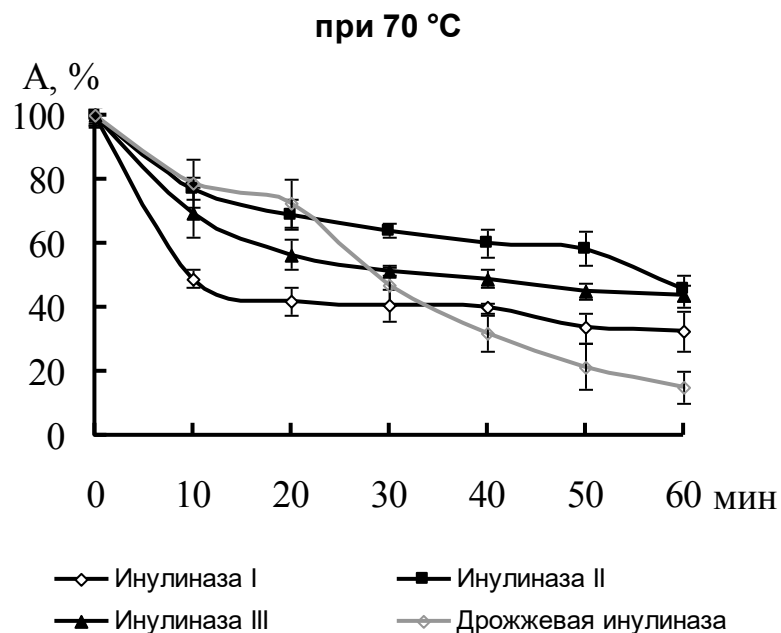


Рис. 32. Процент сохранения активности (А) инулиназ при 70 °С

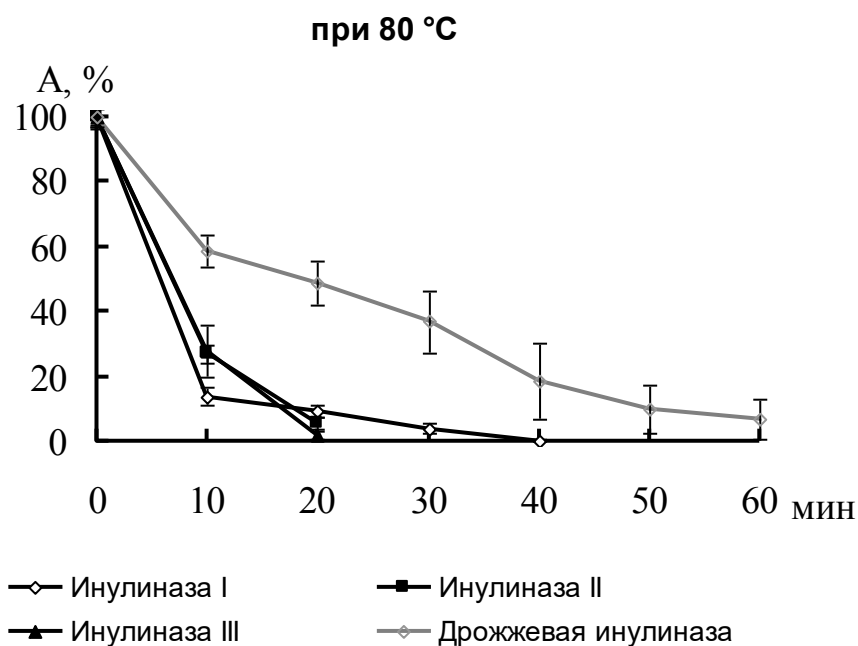


Рис. 33. Процент сохранения активности (А) инулиназ при 80 °С

Инулиназа I является менее термоустойчивой по сравнению с инулиназами II и III, которые приблизительно равноценны по исследуемому показателю.



Константы скорости термической инактивации инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Температура	к, ч <sup>-1</sup> ×10 <sup>-3</sup>			
	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Инулиназы из <i>Helianthus tuberosus</i>		
		I	II	III
50 °С	1,8	9,6	11,3	9,0
60 °С	3,6	18,3	11,5	10,5
70 °С	5,8	18,6	12,9	13,7
80 °С	10,4	107,3	96,7	128,8

Инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* при 50 и 80 °С во всем временном интервале и при 70 °С в течение 10-40 мин оказалась более термоустойчивой по сравнению с растительными ферментами. Однако при 70 °С в течение 50 и 60 мин инкубации она проявила меньшую устойчивость. Константы скорости инактивации дрожжевой инулиназы во всем диапазоне температур ниже, чем у растительных ферментов (при 80 °С константа скорости инактивации ниже на порядок).

Инулиназа из *Saccharomyces cerevisiae* ВГШ-2 после 1 ч инкубации при 50 °С и рН 4,0 сохраняла около 80 % активности, что свидетельствует об ее высокой термической и кислотной устойчивости. Повышение температуры до 60 °С приводило к более резкой инактивации фермента. Значения константы скорости термической инактивации инулиназы из *Saccharomyces cerevisiae* при рН 4,0 и температурах 50 и 60 °С были соответственно 75 и 885 ч<sup>-1</sup>×10<sup>-3</sup>, что превышает полученные нами значения как для дрожжевой, так и для растительной инулиназы (Шуваева Г.П., 2010).

В.А. Абеляном и Л.С. Манукяном (1996) показано, что инкубация инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* при температурах в диапазоне от 30 до 37 °С в физиологическом растворе в отсутствие субстрата инулина не

подавляла ее ферментативной активности, однако, при уже 45 °С терялось 25-30 % каталитической способности. Воздействие более высоких температур на энзим приводило к его резкой инактивации. R.J. Rouwenhorst et al. (1990) установили, что время полужизни энзима составляет 30 мин при 60 °С. Инулиназа из *Kluveromyces marxianus* ССМВ 322 сохраняла 55,28 % первоначальной активности после 50 минут инкубации при 60 °С, однако, была полностью неактивной уже после 10 мин нагревания до 70 °С (Lima D.M., 2009).

Н.К. Rawat et al. (2017) выделили и очистили термостабильную (при 50 и 60 °С) инулиназу из *Aspergillus niger*, которая, однако, уступала по этому критерию изучаемому нами энзиму из *Kluveromyces marxianus*. Грибной фермент после 45 и 60-минутных инкубаций при 70 °С сохранял соответственно менее 20 и 10 % активности, а при этих же временных интервалах и 80 °С был полностью инактивирован. Дрожжевая инулиназа после 50 и 60-минутных прогреваний при 70 °С проявляла 21 и 15 %, а при 80 °С – 15 и 7 % первоначальной каталитической способности.

Форма кривых термической инактивации инулиназы из *Kluveromyces marxianus* при температурах 60, 70 и 80 °С указывает на возможность участия в регуляции каталитической активности процессов ассоциации-диссоциации ее субъединиц. Для доказательства справедливости данного предположения в отношении дрожжевой инулиназы мы применили метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Было получено изображение поверхности молекулы инулиназы после инкубации буферного раствора фермента в термостате при 60 °С. Отчетливо видно, что происходит диссоциация энзима на субъединицы, которые располагаются отдельно друг от друга и не образуют каких-либо более крупных агрегатов. К тому же, при разделении белка на мономеры происходит изменение их структуры и размеров по отношению к нативному препарату (рис. 34).

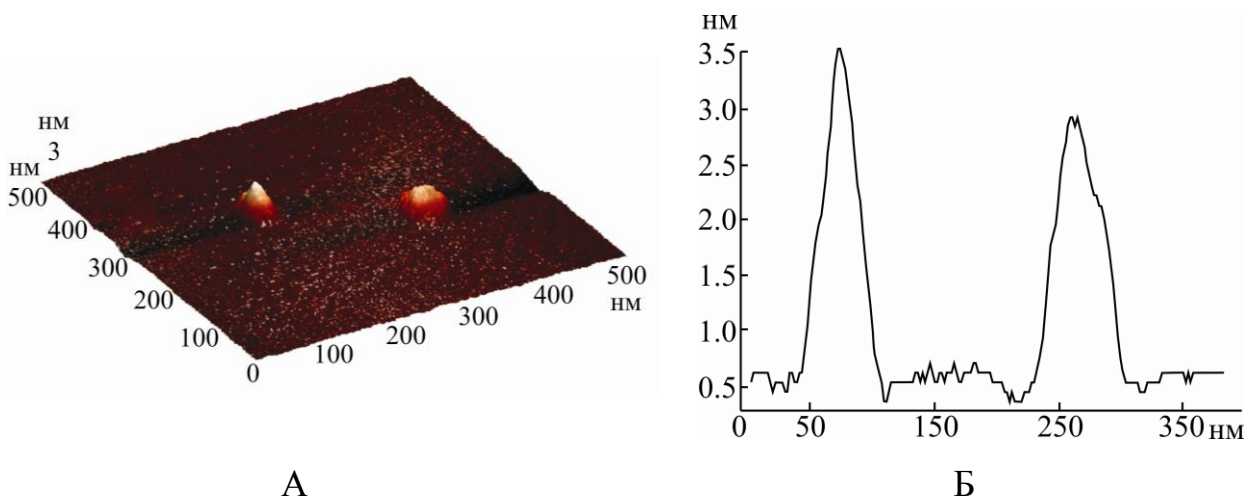


Рис. 34. Изображение молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* после инкубации в термостате при 60 °С (размер кадра 0,5×0,5 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

Р.К. Gill et al. (2004, 2006) выделили из *Aspergillus fumigatus* препараты инулиназы, отличающиеся по термической стабильности. Изоформа I проявляла 35,9 и 25,8 % активности после 4-часовой инкубации при 50 и 55 °С соответственно, а изоформа II была более устойчива к температурным воздействиям и сохраняла 72 и 44 % каталитической способности после 12-часовой инкубации при 60 и 70 °С. Оптимум функционирования обоих ферментов составлял 60 °С.

П.В. Волковым и соавт. (2012) установлено, что в кислых растворах эндоинулиназа из *Penicillium canescens* InuA\_Anig более стабильна, чем экзоинулиназа, выделенная из *Penicillium canescens* Inu1\_Awa. При 40, 50 и 60 °С эндоинулиназа сохраняла соответственно 100, 95 и 75 % исходной активности через 3 ч инкубации при pH 5,0, в то время как для экзоинулиназы эти показатели составили 85, 70 и 3 % (период полуинактивации Inu1 при 60 °С и pH 5,0 был равен 7 мин). При повышении температуры до 70 °С стабильность обоих ферментов в растворе уменьшалась: период полуинактивации InuA составил 5 мин, а Inu1 – 3 мин при pH 5,0. Для InuA pH-оптимум которой лежал в нейтральной области, были также исследованы процессы термоинактивации при pH 6,5–7,0. Выяснилось, что при нейтральных и слабощелочных значениях pH среды

фермент менее стабилен, чем в слабокислых средах: периоды полуинактивации эндоинулиназы при pH 6,5–7,0 составили 240, 180, 4 и 2 мин при 40, 50, 60 и 70 °С соответственно.

Экспрессированная J.Y. Ma et al. (2016) в *Pichia pastoris* X-33 экзоинулиназа сохраняла 89 % каталитической активности после часовой инкубации при 50 °С, что сопоставимо с данными, полученными нами для дрожжевой инулиназы, однако, после часовой инкубации при 60 °С рекомбинантный фермент был полностью инактивирован, тогда как исследуемый нами фермент из *Kluyveromyces marxianus* проявлял более 40 % первоначальной каталитической способности. Для сравнения, инулиназа из *Candida kutaonensis* сохраняла 78 % активности после двухчасовой инкубации при 60 °С (Yuan B., 2012), при 50 °С время полужизни фермента из *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* составило 40 мин (Kushi R.T., 2000), а из *Chrysosporium pannorum* and *Fusarium oxysporum* – 10-15 мин (Singh P., 2006, Xiao R., 1989).

Средняя молекулярная масса инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, рассчитанная по данным динамического рассеяния света при концентрации фермента 1,5 мг/мл, составляет  $(88,6 \pm 4,0)$  кДа, что соответствует степени олигомеризации  $(1,48 \pm 0,07)$ . Следовательно, образец инулиназы не является полностью мономерным. Массовая доля белковых олигомеров с молекулярной массой более 100 кДа ниже 0,1%, что указывает на низкую восприимчивость инулиназы к образованию высокомолекулярных олигомеров.

Зависимость избыточной удельной теплоемкости  $c_p^{\text{ex}}$  (Дж·г<sup>-1</sup>·К<sup>-1</sup>) инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* от температуры (рис. 35) характеризуется наличием двух пиков, которые были описаны гауссовыми функциями с температурами промежуточного перехода 55,7 °С (61 % от общей калориметрической энтальпии) и 67,3 °С (39 % от общей энтальпии).

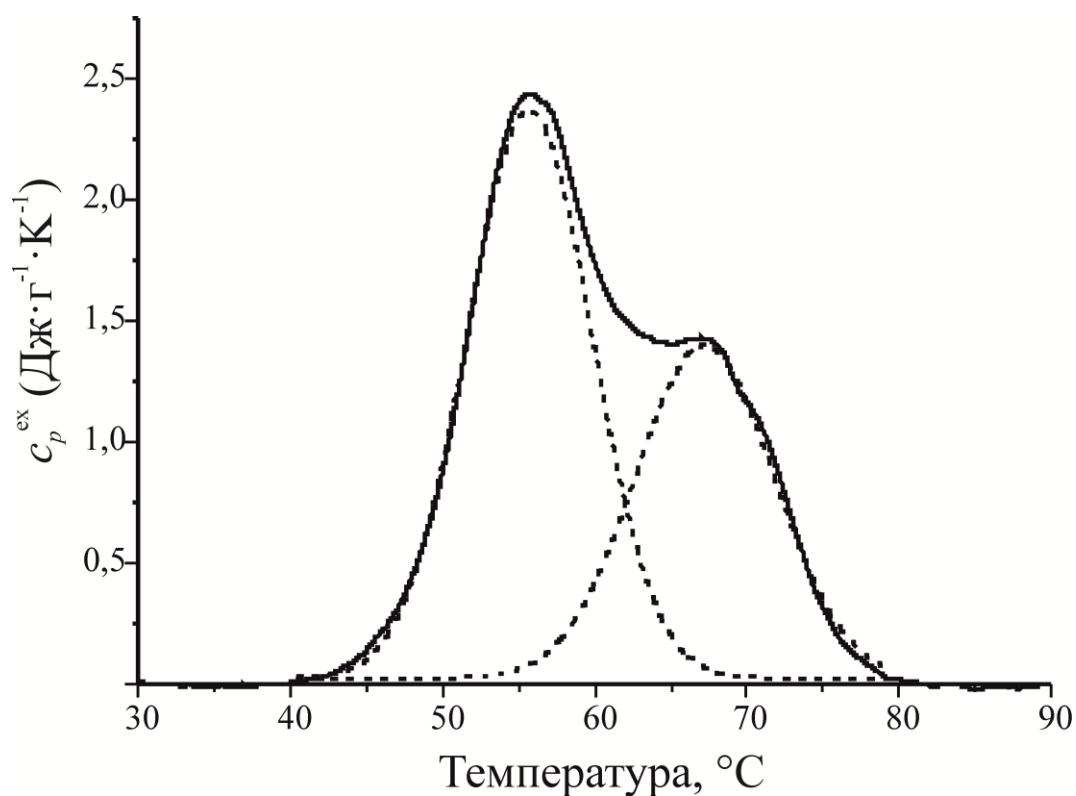


Рис. 35. Температурная зависимость избыточной удельной теплоемкости инулиназы, полученная из данных дифференциальной сканирующей калориметрии. Непрерывная кривая соответствует результатам эксперимента, а пунктирные кривые – расчетным данным

В дополнение к экспериментам по термической инактивации инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 и *Helianthus tuberosus* мы определили долю молекул, агрегировавших под действием температур 50, 60, 70 и 80  $^{\circ}\text{C}$ , и сравнили ее с долей инактивированных молекул (табл. 19).

Таблица 19

Доля агрегированных ( $\gamma_{agg}$ ) и инактивированных ( $\gamma_{in}$ ) молекул инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и инулиназ I, II и III из *Helianthus tuberosus*

Температура	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>		Инулиназа I		Инулиназа II		Инулиназа III	
	$\gamma_{agg}$	$\gamma_{in}$	$\gamma_{agg}$	$\gamma_{in}$	$\gamma_{agg}$	$\gamma_{in}$	$\gamma_{agg}$	$\gamma_{in}$
50 °C	0,06	0,11	0,03	0,44	0,18	0,50	0,10	0,42
60 °C	0,07	0,19	0,05	0,67	0,23	0,50	0,12	0,47
70 °C	0,11	0,30	0,08	0,68	0,23	0,54	0,12	0,56
80 °C	0,35	0,47	0,40	0,96	0,43	0,95	0,52	0,98

Установлено, что для всех инулиназ доля инактивированных молекул существенно (минимум в 2 раза) превышает долю агрегированных. Поэтому логично предположить, что процесс инактивации фермента под действием высоких температур идет быстрее, по сравнению с процессом агрегации, а, следовательно, потеря каталитической способности энзима в малой степени коррелирует или совсем не связана с процессом образования белковых агрегатов. В частности, у инулиназы I из *Helianthus tuberosus*, у которой наблюдается минимальная доля агрегированных молекул во всем диапазоне исследованных нами температур, по сравнению с другими инулиназами, при температурах 60 и 70 °C значения  $\gamma_{in}$  наиболее высоки и практически одинаковы – 0,67 и 0,68 соответственно, тогда как  $\gamma_{agg}$  отличаются более существенно – 0,05 и 0,08. Для инулиназы III, наоборот, значение  $\gamma_{agg}$  при обеих температурах (60 и 70 °C) составляет 0,12, а доля инактивированных молекул варьирует: 0,47 и 0,56. Наименьшая доля инактивированных при воздействии температур 50-80 °C характерна для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, что хорошо согласуется с анализом кривых термической инактивации.

Таким образом, по критерию термической устойчивости инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* оказалась наиболее перспективной для промышленного применения по сравнению с другими изучаемыми нами ферментами: константы скорости термической инактивации и доля инактивированных молекул ниже при всех исследуемых температурах, а при 80 °С значение константы скорости инактивации на порядок ниже, чем у растительных энзимов.

#### 4.7. Процессы ассоциации-диссоциации молекул инулиназы при различных условиях ее термической инактивации

При инкубации раствора инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* при 50-57 °С во всех трех используемых нами концентрациях (1, 5, 10 мг/мл) в течение 4 часов не происходило изменения размеров частиц в системе. При концентрации энзима 1 мг/мл и 1,5-2 часах инкубации при 60 °С появлялись частицы с радиусами  $1,0 \pm 0,1$  и  $1,2 \pm 0,1$  нм, которые могут указывать на протекание процессов диссоциации, через 2 часа нагревания появлялись частицы радиусом  $16,3 \pm 4,1$  нм, после 3 часов минимальный размер частиц составлял  $21,9 \pm 7,9$  нм. При 60 °С и концентрации фермента 5 мг/мл пик, соответствующий размерам одиночных молекул энзима, полностью исчезал только после 3,5 часов инкубации. При 63 °С и концентрации инулиназы 1 мг/мл мы детектировали следующее: после инкубации в течение 20 мин в системе появились частицы с радиусом  $14,1 \pm 5,7$  нм, которые, вероятно, соответствуют тетрамерной форме фермента. Через 1 час 40 мин пик, соответствующий размеру нативной молекулы инулиназы, полностью исчезал и появлялся максимум порядка 25 нм, который свидетельствует об образовании более крупных агрегатов.

На рис. 36 представлена предлагаемая нами схема процессов ассоциации-диссоциации молекул инулиназ при различных условиях ее термической инактивации.

Процесс	Условия протекания		
	t, °C	Время инкубации	Концентрация инулиназы, мг/мл
Преобладание димерных форм фермента ↓	от 50 до 57	до 4 часов	1, 5, 10
Протекание процессов диссоциации ↓	60	1,5 часа	1
Появление тетрамерных форм фермента ↓	60 61 63	2 часа 5 мин 20 мин	1 5, 10 1
Практически полная агрегация частиц	60	3,5 часа	5
	62	5 мин	10
	63	1 час 40 мин	1
	64	5 мин	5
	70	5 мин	1

Рис. 36. Схема процессов ассоциации-диссоциации молекул инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* при различных условиях ее термической инактивации

#### 4.8. Исследование УФ-индуцированных изменений структурно-функциональных свойств инулиназ

Работы, направленные на исследование УФ-индуцированных изменений структурных особенностей и функциональных характеристик молекул ключевых ферментов метаболизма микроорганизмов и растений (к которым относится инулиназа), необходимо развивать и детализировать. Изучение механизмов влияния физико-химических факторов, в том числе и УФ-облучения, на процессы формирования олигомерных форм фермента и их деструкции имеет фундаментальное значение. Учитывая важную роль



инулиназы в регуляции метаболических процессов в клетках растений и микроорганизмов, а также отсутствие в литературе сведений, касающихся выяснения взаимосвязи между структурным состоянием фермента, модифицированного воздействием УФ-излучения, и проявлением его каталитической активности, представляется необходимым исследовать структурно-функциональные свойства инулиназы после УФ-облучения в широком диапазоне доз для выявления динамики фотопроцессов. Целью следующего этапа работы было изучить в сравнительном аспекте УФ-индуцированные изменения каталитической активности и размеров молекул инулиназ дрожжевого, грибного и растительного происхождения.

Установлено, что при дозах облучения 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> происходит статистически значимое (~ в 2 раза) увеличение размеров молекулы дрожжевой и растительной инулиназы (рис. 37), что можно рассматривать как результат разворачивания белковой глобулы или следствие протекающих в системе процессов агрегации молекул инулиназы. При воздействии УФ-облучения на раствор инулиназы из *Aspergillus niger* процессы ассоциации ее молекул не выявляются: при всех используемых нами дозах облучения наблюдается лишь тенденция к увеличению размеров молекулы.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что размеры молекул инулиназ из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* и клубней *Helianthus tuberosus* после воздействия УФ-облучения подвержены изменению в большей степени, чем размеры белковой глобулы у инулиназы из микромицета *Aspergillus niger*.

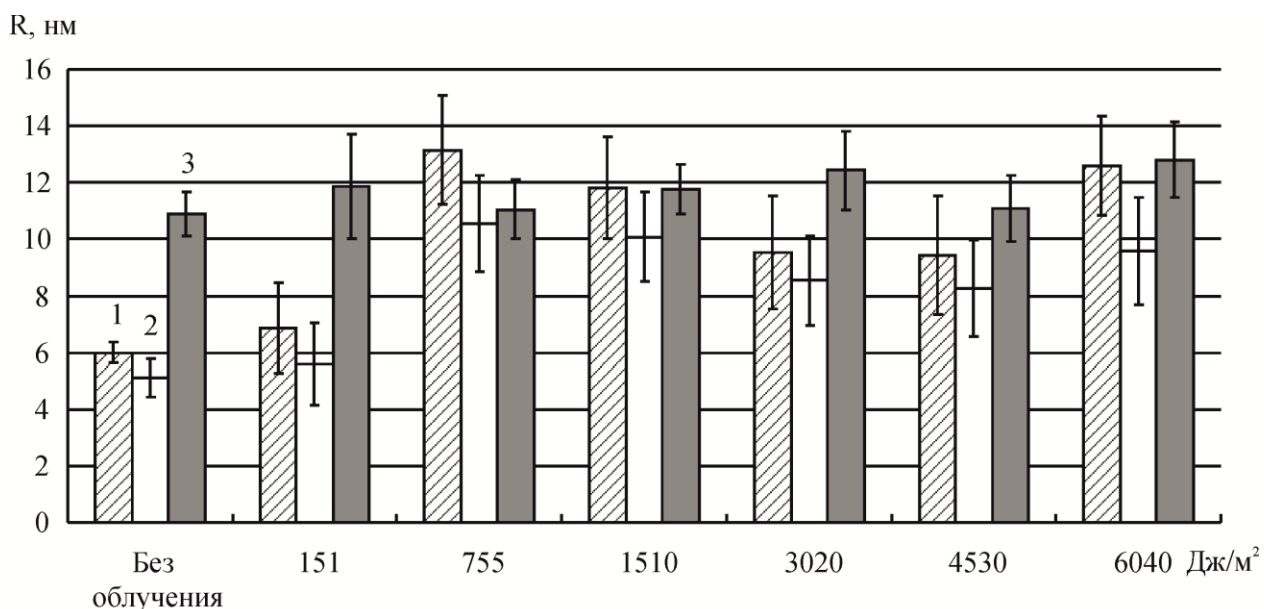


Рис. 37. УФ-индуцированные изменения размеров (R) молекул:

1 – инулиназа из *Kluyveromyces marxianus*, 2 – инулиназа I из *Helianthus tuberosus*, 3 – инулиназа из *Aspergillus niger*

Показано, что при УФ-облучении в дозах в диапазоне от 453 до 1510 Дж/м<sup>2</sup> не происходит статистически значимых изменений активности ферментов, выделенных из *Kluyveromyces marxianus*, *Helianthus tuberosus* и *Aspergillus niger* по сравнению с нативными (необлученными) образцами (рис. 38). При облучении в дозе 3020 Дж/м<sup>2</sup> наблюдалась тенденция к снижению активности по сравнению с контрольными пробами. При облучении в дозах 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> мы регистрировали статистически достоверное уменьшение каталитической способности на 18 и 19,5 % для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, на 21 и 26 % для фермента из *Helianthus tuberosus*. Инулиназа из *Aspergillus niger* проявляла более высокую устойчивость к действию УФ-облучения: статистически значимое снижение ее активности (на 22 %) происходило только при облучении дозой 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

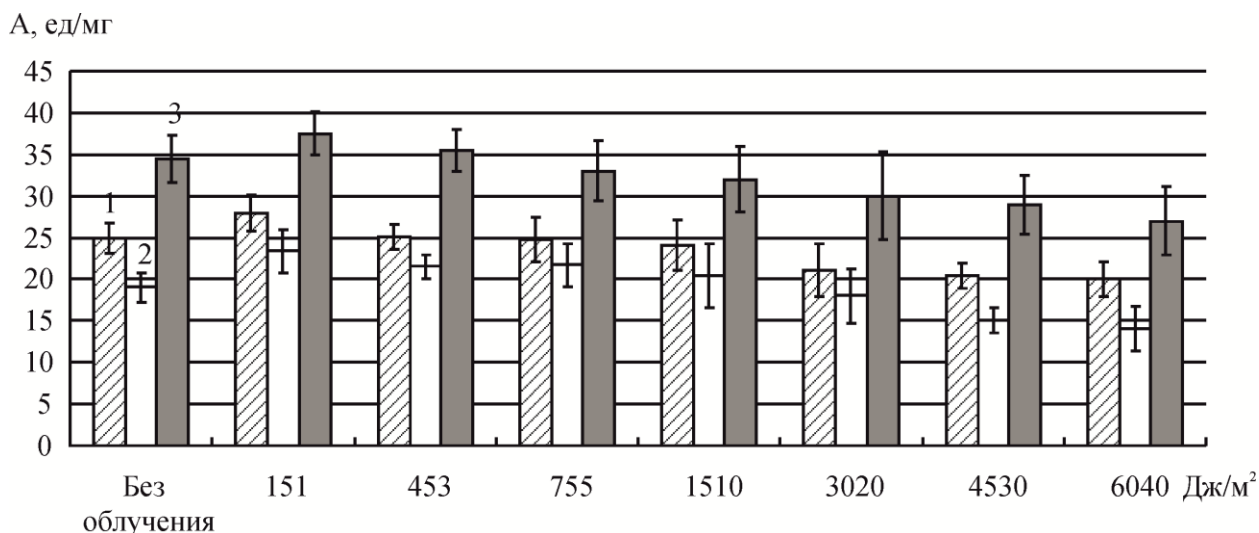


Рис. 38. УФ-индуцированные изменения удельной каталитической активности (А): 1 – инулиназа из *Kluuveromyces marxianus*, 2 – инулиназа I из *Helianthus tuberosus*, 3 – инулиназа из *Aspergillus niger*

При облучении образцов дозой 151 Дж/м<sup>2</sup> была выявлена тенденция к повышению каталитической активности ферментов из всех трех продуцентов, что указывает на возможное активизирующее действие УФ-облучения в указанной дозе на молекулы инулиназы.

Для объяснения полученных результатов мы проанализировали первичные структуры инулиназ дрожжевого, растительного и грибного происхождения. Известно, что за функционально активное поглощение УФ-света белковыми молекулами ответственны хромофорные группы, представляющие собой остатки ароматических аминокислот: прежде всего триптофана, в значительной меньшей степени тирозина и фенилаланина, а также цистина (Артюхов В.Г., 2009). В табл. 20 представлены данные о содержании ароматических аминокислот и цистина в молекулах инулиназ из *Kluuveromyces marxianus* и *Aspergillus niger*, а также фруктан-экзогидролазы из *Cichorium intybus* (эта фруктан-экзогидролаза является ближайшим родственником растительных инулиназ, для инулиназы из *Helianthus tuberosus* аминокислотная последовательность до сих пор не расшифрована). Таким образом, наиболее низкую, по сравнению с

ферментами дрожжевого и растительного происхождения, степень изменения структурно-функциональных свойств инулиназы из *Aspergillus niger* при УФ-облучении можно объяснить меньшим содержанием в ней таких ароматических аминокислот как тирозин и фенилаланин. Более выраженная потеря активности инулиназой из *Helianthus tuberosus* под действием УФ-облучения, вероятно, связана с наличием существенно большего числа остатков цистеина у растительных фруктан-экзогидролаз по отношению к микробным.

Таблица 20

Содержание ароматических аминокислот и цистеина в молекулах инулиназ и фруктан-экзогидролазы

Аминокислота	Инулиназа из <i>Kluuveromyces marxianus</i>		Фруктан-экзогидролаза из <i>Cichorium intybus</i>	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>		
Триптофан	15	15	18	16	17	17
Тирозин	30	32	22	10	13	12
Фенилаланин	36	36	25	18	19	19
Цистеин	2	1	7	2	3	3
Источник литературы	(Wang J.-H., 2001)	(Bergkamp R.J., 1993, Chapman J.W., 1994, Wen T.Q., 2003)	(Van Den Ende W., 2000)	(Wang J.-H., 2002)	(Ohta K., 1998)	(Pel H.J., 2007, Wang Y.-J., 2001)

Известно, что в состав активного центра инулиназы входят карбоксильная группа остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты и имидазольная группа гистидина (Pel H.J., 2007, Жеребцов Н.А., 1999),

поэтому логично предположить, что при действии УФ-облучения фотодеструкции непосредственно активного центра не происходит.

Суммируя полученные данные, можно констатировать, что воздействие УФ-облучения (240-390 нм) в дозе 151 Дж/м<sup>2</sup> не приводит к статистически значимым изменениям структурно-функциональных свойств инулиназ из *Kluveromyces marxianus*, *Helianthus tuberosus* и *Aspergillus niger*. При облучении образцов дозами в диапазоне 755-6040 Дж/м<sup>2</sup> происходит фотомодификация ароматических и серосодержащих аминокислотных остатков белка, приводящая, вероятно, к ассоциации молекул дрожжевой и растительной инулиназы, о чем свидетельствует статистически значимое (~ в 2 раза) увеличение размеров глобул. Для грибной инулиназы в этих условиях наблюдается лишь тенденция к увеличению размеров молекулы, выявляется частичное ее разворачивание и/или ослабление межсубъединичных контактов, выражающееся в незначительном увеличении значений гидродинамического радиуса молекулы, не наблюдается образования межмолекулярных сшивок белка. Для всех инулиназ при УФ-облучении во всем диапазоне исследуемых нами доз, по всей видимости, отсутствуют разрывы пептидных связей и связей между отдельными субъединицами. С увеличением воздействия больших доз УФ-излучения в диапазоне 4530-6040 Дж/м<sup>2</sup> является распространение структурных перестроек на значительные участки белковых глобул, что приводит к снижению каталитической активности инулиназ из дрожжей *Kluveromyces marxianus* и клубней *Helianthus tuberosus*. Инулиназа из микромицета *Aspergillus niger* изменяет свои функциональные свойства лишь при дозе облучения 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

Результаты проведенных экспериментов, а также анализ литературы, посвященной изучению влияния УФ-облучения на олигомерные белки (Артюхов В.Г., 1997), позволили нам предложить следующую схему отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие данного физического агента (рис. 39).

Инулиназы из <i>Kluyveromyces marxianus</i> и <i>Helianthus tuberosus</i>	УФ-облучение (240-390 нм) ↓	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>
151-453 Дж/м <sup>2</sup>	Хромофоры нативных димеров фермента ↓ Возбужденные состояния ↓ Миграция возбужденных состояний внутри молекулы белка ↓ Фотомодификация третичной структуры белка. Появление димеров с измененной пространственной структурой ↓	151-4530 Дж/м <sup>2</sup>
755 Дж/м <sup>2</sup>	Образование тетрамеров ↓	не происходит
4530 Дж/м <sup>2</sup>	Снижение функциональной активности	6040 Дж/м <sup>2</sup>

Рис. 39. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие УФ-облучения: роль процессов миграции возбужденных состояний, фотомодификации третичной структуры белка, образования димеров и тетрамеров в фотоинаktivации фермента

Предложенная нами схема фотопроцессов может быть полезна при обсуждении вопросов регуляции путем УФ-облучения структурного состояния и каталитической активности инулиназ дрожжевого, растительного и грибного происхождения. Ее данные расширяют список белков-ферментов с изученным уровнем фоточувствительности.

## Глава 5. РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ИНУЛИНАЗ. ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРОЦЕССОВ АДСОРБЦИИ ФЕРМЕНТА НА МАТРИЦЕ НЕРАСТВОРИМЫХ НОСИТЕЛЕЙ

### 5.1. Методы иммобилизации инулиназ и их применение

Иммобилизованные ферменты (а также их системы и целые клетки), связанные с нерастворимыми полимерными носителями за счет физических взаимодействий или химических связей, имеют существенные технологические преимущества по сравнению с их предшественниками в растворе: 1) возможность отделить препарат от реакционной среды, получить продукт, не загрязненный энзимом, 2) остановить реакцию в любой момент времени, 3) использовать катализатор повторно, 4) проводить процесс непрерывно (например, в проточных реакторах), 5) регулировать скорость катализируемой реакции (или выход продукта) (Jafarizadeh-Malmiri H., 2012, Ansari S.A., 2012), 6) перспектива изменять свойства фермента: его специфичность (особенно в отношении макромолекулярных субстратов), зависимость активности от pH среды (Vaghari H., 2016, Cipolatti E.P., 2016), 7) стабильность к денатурирующим воздействиям и долговечность препарата, увеличение времени его полужизни (Janecsek S., 1993, Guzik U., 2014, Lei Z., 2007, Ефременко Е.Н., 2007), 8) упрощение и удешевление производственных циклов (Liese A., 2013, Efremenko E.N., 2011, Ефременко Е.Н., 2013).

В некоторых случаях образование комплекса фермент-носитель может осуществляться параллельно с очисткой энзима от ряда примесей и таким образом компенсировать затраты, связанные с этапом иммобилизации (Barbosa O., 2015, Garcia-Galan C., 2011). Многоочечное связывание с нерастворимым полимерным носителем (Mateo C., 2007), особенно в случае олигомерных белков (Fernandez-Lafuente R., 2009), может повысить

жесткость пространственной организации фермента и, таким образом, увеличить его стабильность (Balcao V.M., 2015, Bolivar J.M., 2009, Min K., 2014, Efremenko E.N., 2002). Показано, что изменение жесткости определенных участков молекулы белка и контролируемые модификации его структурной организации, возникающие в результате процесса иммобилизации, в некоторых случаях значительно улучшает активность, селективность или специфичность фермента (Mateo C., 2007, Barbosa O., 2015, Rodrigues R.C., 2013). Таким образом, изучение гетерогенных биокатализаторов (иммобилизованных ферментов и их систем) способствует расширению теоретических знаний о путях регулирования структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств энзимов.

Большое внимание исследователи уделяют разработке новых и усовершенствованию уже существующих методов иммобилизации, проблемам подбора и модификации носителей, изучению кинетических аспектов катализа гетерогенными ферментными системами.

Была осуществлена адсорбция инулиназы из *Kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 на анионите Streamline DEAE (Makino Y., 2005). W.E. Workman и D.F. Day (1984) осуществили иммобилизацию клеток *Kluveromyces fragilis* ATCC 12424, обладающих инулиназной активностью, путем фиксации их глутаровым альдегидом (0,5 %). Установлено, что обработка глутаровым альдегидом не влияет на активность инулиназы, но делает ее более устойчивой к физическим и химическим воздействиям. Показано, что при добавлении глутарового альдегида не происходит ковалентного связывания инулиназы со структурами клетки.

E. Barranco-Florido et al. (2001) иммобилизовали клетки *Kluveromyces marxianus* CDBB-L-278, обладающие инулиназной активностью, на альгинате бария, обработанном глутаровым альдегидом. После 5 циклов гидролиза инулина, иммобилизованные клетки сохраняли 85 % активности. Система была термостабильной в диапазоне 45-65 °C. Параметры ферментативной реакции для иммобилизованной системы следующие:  $K_m' = 0,522$  мМ,  $V_{max}' =$



113,7 мкмоль/мин. Для свободного фермента эти показатели составляли 0,150 мМ и 250 мкмоль/мин соответственно. Лимитирующим фактором оказались диффузионные затруднения проникновению субстрата к активному центру фермента.

Показано, что при иммобилизации клеток *Kluyveromyces marxianus* методами включения в различные гели лучшие результаты по остаточной активности фермента получены с применением 5 %-ого агара, который позволял сохранить до 76 % исходной активности, в то время, как в случае использования смеси полиакриламидного геля и 5 %-ого альгината кальция она не превышала 57 %. Были и другие попытки иммобилизовать клетки *Kluyveromyces marxianus*, однако, инулиназная активность при этом была недостаточно высокой (Абелян В.А., 1998).

При иммобилизации инулиназы из *Aspergillus awamori* на ионообменном полимере АНКБ-2 сохранялось 63, 36 и 47 % активности ферментного препарата при использовании в качестве носителя соответственно Н-Cl, Н-ОН и Na-ОН форм ионита (Шкутина И.В., 2009).

А.К. Gupta et. al. (1990) показали, что инулиназа из *Fusarium oxysporum*, включенная в полиакриламидный гель, сохраняет более 45 % исходной активности при температуре 45 °С и рН 6,2 (оптимумы нативного энзима – 37 °С и рН 6,0). Иммобилизованный фермент проявлял 58 % первоначальной каталитической способности в течение 96 часов хранения при комнатной температуре. Термостабильность гетерогенного препарата возрастала в присутствии инулина (Yun J.W., 1997, Catana R., 2005, Gupta A.K., 1990).

S.J. Kalil et al. (2005) изучали адсорбцию инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 на катионообменной смоле Streamline SP. В.А. Абелян и Л.С. Манукян (1992) также исследовали фермент из *Kluyveromyces marxianus*. Инулиназу ковалентно связывали с матрицей полисахаридных носителей, которые изготавливали на основе крахмала, инулина, а также смеси этих полимеров с β-циклодекстрином в соотношении 1:1. Добавление

$\beta$ -циклодекстрина существенно увеличивало связывающую способность геля и позволяло сохранить более высокий процент активности. Степень присоединения белка составляла около 50 %, а остаточная каталитическая способность была 28 % от исходной. Имобилизованная инулиназа успешно функционировала в интервале температур 37-55 °С и при рН 4,0-5,5 с оптимумом 45 °С, рН 4,5. Препарат обладал достаточной стабильностью при 37 °С и ниже, время полужизни образцов около 25 суток. Следует отметить, что имобилизованная таким образом инулиназа была способна эффективно работать при высоких значениях удельной скорости пропускания субстрата. Выход фруктозы составлял 75-93 % в зависимости от молекулярной массы инулина.

Показано, что ковалентно связанная с синтетическим ионитом инулиназа из *Aspergillus awamori* может сохранять до 75 % активности свободного фермента. Энзим, имобилизованный на анионите АВ-26, проявлял 55 % каталитической способности нативного образца. Для имобилизованной и свободной инулиназы из *Aspergillus awamori* рН-оптимум практически не отличался. Имело место лишь некоторое расширение диапазона значений рН от 4,5 до 5,0. При имобилизации инулиназы на анионите АВ-17-2П четвертичная структура белка сохранялась, но усложнялась кинетика ферментативного катализа. В связи с этим, можно предположить, что при глутаральдегидном методе, по-видимому, происходят небольшие конформационные изменения отдельных субъединиц, влияющие на кооперативность их взаимодействия в процессе расщепления инулина (Ковалева Т.А., 1998).

Термостабильность имобилизованной инулиназы возрастает по сравнению со свободной. Имобилизованный фермент, выделенный из *Aspergillus awamori*, проявляет оптимальную каталитическую активность при температуре 70 °С, а нативный при 50 °С. Показано, что благодаря защитному действию матрицы носителя АВ-26, которая экранирует каталитически важные группы активного центра инулиназы из *Aspergillus*

*awamori* ВКМФ-2250, фермент сохраняет 32,6 % от исходной активности при добавлении к нему раствора мочевины (8 моль/л). Свободный энзим при данной концентрации ингибитора денатурировал полностью и необратимо (Ковалева Т.А., 1998, 2000, Catana R., 2007).

Показано, что для применения иммобилизованной инулиназы, выделенной из *Aspergillus awamori*, в промышленности целесообразно использовать термостатируемые реакторы колончатого типа с температурой 70 °С и пропусканием раствора инулина по восходящему току. При применении реактора колоночного типа активность гетерогенного препарата составляет 45 % каталитической способности свободного фермента, что в два раза больше, чем в реакторе периодического действия. При его 15-кратном использовании активность энзима не изменяется (Ковалева Т.А., 1998).

Инулиназу из бактерий *Arthrobacter species* иммобилизовали на анионообменных смолах. Аналогичную операцию осуществили для рекомбинантных белков из штаммов *Escherichia coli/pMSiftOptR* и *Escherichia coli/pMSiftOptWT*. При адсорбции инулиназы из *Escherichia coli/pMSiftOptR* на гранулах Duolite A568, Amberlite IRA 94S, Duolite A561, Amberlite IRA67 и выявлялся следующий уровень активности: 20,6; 19,8; 4,5 и 1,7 % соответственно. При сорбции фермента из *Escherichia coli/pMSiftOptWT* – 19,3; 19,0; 4,2 и 1,6 %. В опытах с иммобилизованной инулиназой при температурах 30, 60 и 65 °С не происходило термической инактивации, в первые 50 часов инкубации даже наблюдалось увеличение активности препарата. Таким образом, адсорбция позволяет использовать фермент при температурах выше 65 °С. Кинетические параметры –  $K_m$  и  $V_{max}$  – для гетерогенных препаратов из *Escherichia coli/pMSiftOptWT* и *Escherichia coli/pMSiftOptR* составили: 5,6 мМ/л, 200 мкМ/(л×мин) и 4,9 мМ/л, 167 мкМ/(л×мин) соответственно. Значение  $K_m$  для иммобилизованных препаратов выше, чем для свободных, следовательно, для их функционирования требуются большие концентрации инулина. Были попытки включить инулиназы из бактерий *Escherichia coli/pMSiftOptRM* и

*Arthrobacter ureafaciens* ATCC 21124 в альгинатный гидрогель (Letca D., 2004).

M. Beran et al. (2016) иммобилизовали инулиназу из *Aspergillus niger* (препарат Novozym 960) на полигидроксibuтиратные микроволокна и нановолокна. F.R. Silva и C.C. Santana (2000) осуществили сорбционную иммобилизацию инулиназы (из препарата Fructozyme) в ионообменной колонке, используя два типа адсорбентов – катионит и анионит. Включенная в желатин инулиназа из штамма *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* применялась с целью получения фруктозных сиропов при гидролизе сахарозы (Jahnz U., 2003, Silva F.R., 2000, de Paula F.C., 2008).

J. Manso et al. (2008) создали биосенсор для определения содержания инулина в пище на основе инулиназы и фруктозадегидрогеназы, иммобилизованных на золотых наночастицах цистеамина. Сенсор проявлял высокую селективность по отношению к другим углеводам. Минимальная концентрация инулина, определяемая биосенсором –  $6,6 \times 10^{-7}$  моль/л.

Инулиназа из *Aspergillus terreus* была ковалентно иммобилизована в альгинатный гель с добавлением карбоксиметилцеллюлозы. После этого значение  $K_m$  энзима увеличилось от 3,6 до 7,1 мг/мл, а  $V_{max}$  снизилось со 145 до 77,5 ед/г носителя. Возросла термостабильность фермента: свободная инулиназа теряла около 30 % активности после 15 мин инкубации при 50 °С, тогда как иммобилизованный препарат при тех же условиях сохранял 86 % каталитической способности. При 60 °С свободный энзим был наполовину инактивирован, а ковалентно связанный проявлял 63 % первоначальной активности (Ghada E.A. et al., 2017).

J. Allais et. al. (1987) осуществили ковалентное связывание инулиназы с матрицей хитина с помощью глутарового альдегида и получили гетерогенный биокатализатор для производства этанола из инулинсодержащего сырья.

Инулиназа из *Aspergillus ficuum* также была иммобилизована с помощью глутарового альдегида на хитине для получения фруктозы из

клубней топинамбура. В реакторе периодического действия степень гидролиза достигала 90 % через 10 ч, отношение D-фруктоза:D-глюкоза составляло 86:14, выход фруктозы 77,5 г/л в час. В реакторе непрерывного действия максимальный выход достигал 61 г/л в час, гидролиз инулина осуществлялся на 55 %. Моделью реактора непрерывного действия послужила колонка 2,2×40 см, данный биореактор был работоспособным в течение 2 недель с потерей активности лишь в 4,8 %. При обработке нативного растворимого фермента 3 % глутаровым альдегидом при 4 °С в течение 48 часов изменений каталитической активности не наблюдалось. Комплекс инулиназа-хитин проявлял 23 % активности (76,8 ед/г хитина). Оптимальное значение pH для иммобилизованного препарата составило 4,5, температуры – 60 °С, что близко к характеристикам свободной инулиназы. Активность иммобилизованного образца оставалась стабильной при 40 °С (96 % после 50 часов инкубации). Время полужизни иммобилизованной инулиназы – 561 ч (Kim С.Н., 1989, Zittan L., 1981).

Экзоинулиназа из *Aspergillus niger* была включена в Са-альгинатный гель и сополимеризована с помощью глутарового альдегида, выход иммобилизованного фермента составил более 80 % (Rawat Н.К., 2017). Инулиназа из *Aspergillus niger* AUNC 9375 также была иммобилизована в альгинат кальция и использовалась в 10 циклах гидролиза инулина до фруктозы (Housseiny М.М., 2014).

Экзоинулиназы и эндоинулиназы из *Aspergillus niger* 817 были ковалентно связаны с Aminocellulofine (производным пористой целлюлозы). Препарат проявлял активность 160 ед/г носителя. В колоночном реакторе, содержащем 8 мл иммобилизованной инулиназы и 5 % раствора инулина (pH 5,0), субстрат был полностью гидролизован при скорости тока 1 мл/мин и температуре 40 °С через 45 дней. Продуктом являлась смесь 97 % D-фруктозы и 3 % D-глюкозы (Nakamura Т., 1995). Энзим из *Aspergillus niger* был иммобилизован на нанопористом кремнеземе с размером пор 66 нм и был стабилен в течение 10 циклов гидролиза (Karimi М., 2016). Инулиназа из

*Aspergillus niger* также была иммобилизована на полиуретановой пене, препарат сохранял 49 % активности в течение 42 суток и после 24 циклов гидролиза (de Oliveira Kuhn G., 2016).

А.К. Gupta et al. (1994) иммобилизовали инулиназу из *Kluveromyces fragilis* на целлюлозе, используя металлхелатирующий метод, только 40 % фермента связалось с матрицей носителя. Время полужизни препарата составило 5 дней при 25 °С.

С.Н. Kim и S.K. Rhee (1990) получили гетерогенный биокатализатор на основе иммобилизованной инулиназы из *Aspergillus ficuum* и клеток *Zygomonas mobilis*. Для совместной иммобилизации фермента и клеток энзим был предварительно иммобилизован на хитине до включения в шарики альгинатного геля. В качестве сшивающего агента между хитином и инулиназой использовался глутаровый альдегид. При иммобилизации на хитине сохранялось около 26 % активности. Каталитическая способность снижалась еще на 9,4 %, когда фермент был заключен в альгинатный гель вместе с клетками *Zygomonas mobilis*. Однако активность препарата была на 16,4 % выше, если для иммобилизации использовали хитин, предварительно обработанный 3 % глутаровым альдегидом.

Алюминаты меди и кобальта демонстрируют высокую эффективность при иммобилизации инулиназы, что делает их перспективными носителями для иммобилизации ферментов (Abaide E.R., 2015). Инулиназа из *Ulocladium atrum* была иммобилизована на мембранах, содержащих хитозан, что позволяло использовать препарат в течение 38-42 циклов гидролиза (Mohamed T.M., 2014). Инулиназа из *Aspergillus niger* была адсорбирована на углеродных нанотрубках с соотношением сорбент: сорбат, равным 1:460. Препарат был стабилен в течение 5 недель при комнатной температуре, тогда как растворимый энзим сохранял лишь 55 % своей активности (Garlet T.V., 2014). Инулиназа была включена в поры ксерогеля с эффективностью 80 %. Кинетика реакции гидролиза инулина соответствовала кинетике Михаэлиса,

но имело место затруднение процессов массопереноса субстрата. Препарат сохранял активность в 4 циклах реакции по 24 часа (Santa G.L., 2011).

Инулиназа из *Aspergillus fumigatus* C11 была иммобилизована на хитозане с сохранением 38,8 % первоначальной активности. Гетерогенный препарат был более стабилен: после суточной инкубации при 55 °С он сохранял около половины своей каталитической способности, тогда как свободный фермент был полностью инактивирован. Иммобилизованная инулиназа проявляла 81,2 % активности после 10 циклов гидролиза инулина до фруктоолигосахаридов (Chen M., 2015).

Коммерческий препарат эндоинулиназы из *Aspergillus niger* был успешно иммобилизован на хитине. Иммобилизованный препарат был более стабильным в течение длительного периода времени при температуре 60 °С, чем свободный фермент, что является его преимуществом для предотвращения микробного загрязнения. С технологической точки зрения, система, содержащая иммобилизованную эндоинулиназу, использовалась для непрерывного производства олигофруктозы (Nguyen Q.D., 2011).

Была предложена простая и недорогая методика, основанная на использовании микроцентрифужных фильтровальных трубок, для получения биокатализатора путем иммобилизации инулиназы из *Aspergillus niger* на Sepabeads ЕС-ЕА и ЕС-НА. Sepabeads ЕС-НА дает лучшую производительность, чем ЕС-ЕА практически при всех значениях рН, применяемых для иммобилизации. Этот факт может быть обусловлен его более длинными сшивками, которые минимизируют диффузионные ограничения (Fernandez-Arrojo L., 2015). Basso et al. (2010) сообщили об оптимизации процесса иммобилизации инулиназы на Sepabeads на основе моделирования гомологии, молекулярного докинга и молекулярной динамики. Препарат иммобилизованного фермента был протестирован в условиях, близких к промышленным, была предложена и испытана новая конфигурация реактора для производства фруктозы из инулина. Эксперименты проводились в периодических и непрерывных реакторах.

Инулиназа из *Aspergillus* sp. была ковалентно иммобилизована на Sepabeads. Катализатор прошел испытание в периодическом реакторе при различных условиях, представляющих интерес для промышленности, и оказался пригодным для крупномасштабного производства фруктозы (Ricca E., 2010).

Иммобилизация часто является экономически невыгодной для многих ферментов, так как носитель может иметь высокую стоимость, поэтому работы по подбору и модификации носителей, а также разработке методов иммобилизации приобретают особую значимость.

Универсального метода иммобилизации не существует, каждый из способов имеет свои преимущества и недостатки. Если провести сравнительный анализ использования различных методов иммобилизации инулиназы, то можно заключить, что наиболее распространенным способом является включение ферментов в гидрофобные гели, позволяющее сделать возможным получение в иммобилизованном состоянии большинства энзимов. Наиболее сложным и трудоемким методом является ковалентное пришивание, а самым простым и доступным – адсорбция. В целом выбор способа иммобилизации биокатализатора зависит от задач исследования и пути использования получаемого ферментного препарата в той или иной области науки и производства.

## 5.2. Поиск и тестирование методами компьютерного моделирования высокоаффинных лигандов для связывания с инулиназой

Высокопроизводительный компьютерный скрининг, как расчётный перебор молекулярных структур из большого набора модельных соединений, является эффективным методом поиска новых веществ при разработке лекарств или решения фундаментальных задач в области биофизики и биохимии (Heikamp K., 2013, Polgar T., 2011, Wildman S.A., 2013). Этот же подход оказывается целесообразным при изучении субстратной



специфичности ферментов, а также при разработке ингибиторов или активаторов для них (Kotraiah V., 2013, Yang T., 2011, Zheng Z., 2014).

К настоящему времени исследований, посвященных проблеме разработки условий получения и применения гетерогенных катализаторов и биосенсоров на основе инулиназы, достаточно мало. Изучение механизмов иммобилизации инулиназы поможет расширить знания о процессах ферментативного гидролиза полисахаридов и усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы.

Целью данного блока исследований было предложить высокоспецифичный молекулярный агент, который бы прочно связывался с ферментом-инулиназой, не нарушая заметным образом ее каталитической активности. Этот лиганд-носитель мог бы в дальнейшем использоваться как средство для иммобилизации этого фермента – при необходимой длине боковой цепи и «якорной» системе на концах макромолекулы, используемой для сшивки с подложкой.

Молекула инулиназы из *Aspergillus ficuum*, размещенная в банке данных под кодом 3SC7 (рис. 40), состоит из 516 аминокислотных остатков. Структура этой молекулы была получена методом рентгеновской дифракции в 2011 году Pouyez J. et al. (2012) с разрешением 1,5 Å.

Рассчитанные нами величины полных энергий взаимодействия, пространственная локализация комплексов лигандов с молекулой инулиназы и их краткие описания представлены в табл. 21.

Отметим, что молекула кофеина далека по своей структуре и биологическому действию от типичных субстратов, активаторов или матриц носителей для инулиназы и была выбрана для тестового расчета. Расчеты позволили выявить различия в местах связывания лигандов разных типов. Так, для относительно низкомолекулярных лигандов (глюкоза, L- и D-фруктозы, сахароза, манноза и N-ацетилглюкозамин) основным местом связывания были петли на N-домене белка (рис. 41 отражает типичную «зону посадки» на примере манозы, развертка предполагаемых взаимодействий

отражена на рис. 42). В противоположность этому, для высокомолекулярных лигандов (хитозан, полилактат, гликопротеин, а также поликатиониты и полианиониты) было выявлено иное место связывания – торцевая часть « $\beta$ -бочки» в N-доме белка (рис. 43), причем на стороне, противоположной активному центру инулиназы.

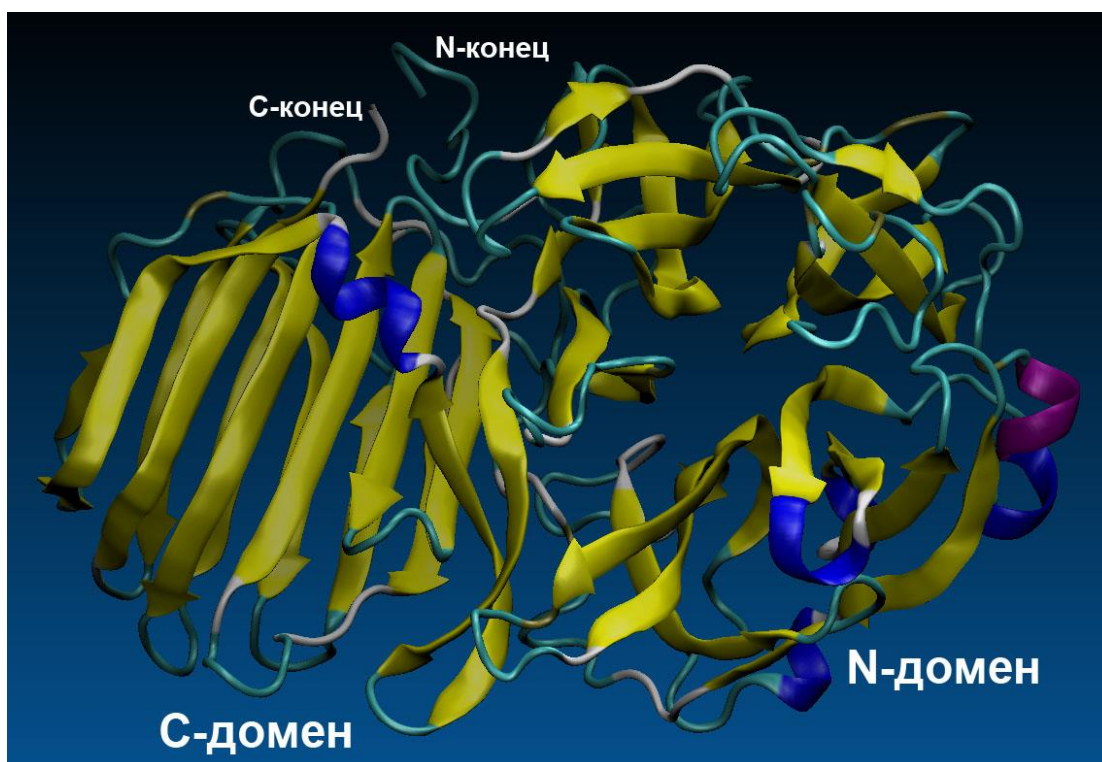


Рис. 40. Пространственная структура инулиназы 3SC7

Согласно литературным данным (Pouyez J., 2012), активность фермента обусловлена каталитическими остатками Glu43 и Glu233. Выявленная нами в расчетах локализация мест связывания матриц для иммобилизации инулиназы дает объяснение известному из эксперимента вполне приемлемому для промышленного использования снижению активности фермента при связывании с подложкой: места «заякоривания» инулиназы не затрагивают активный центр фермента, и даже, возможно, в некоторой степени ориентируют макромолекулу, более эффективно экспонируя ее активный центр к субстрату.

Таблица 21

## Результаты расчетов гибкого молекулярного докинга

Молекула	Статус	Афинность (ккал/моль)	Сайты связывания
Кофеин	калибровка	-5,4	торец N-домена
Фруктоза	продукт реакции	-5,7	петли по бокам N-домена
Глюкоза	ингибитор	-5,9	петли по бокам N-домена
Сахароза	субстрат	-6,1	петли по бокам N-домена
Манноза	активатор	-4,5	одна из петель сбоку N-домена
N-ацетилглюкозамин	активатор	-6,0	петли по бокам N-домена
Инулин	субстрат	-6,3	торец N-домена
Хитозан	носитель для иммобилизации	-7,0	торец N-домена и одна из петель сбоку N-домена
Гликопротеин	тест	-6,2	торец N-домена и одна из петель сбоку N-домена
Гликопротеин +Cys (Cys на N-конце)	тест	-6,2	торец N-домена
Гликопротеин +Cys (Cys на C-конце)	тест	-6,2	петли по бокам N-домена и немного на конце
Гликопротеин +Cys (Cys на N-конце) жесткий	тест	-7,6	петли по бокам N-домена
Гликопротеин +Cys (Cys на C-конце) жесткий	тест	-7,3	петли по бокам N-домена
Полилактат	тест	-5,2	торец N-домена
Phe-Pro-Pro-Pro-Pro	тест	-7,0	торец N-домена
КУ-2 (пять звеньев)	носитель для иммобилизации	-7,3	торец N-домена
АВ-17-2П (пять звеньев)	носитель для иммобилизации	-6,8	торец N-домена (нижняя часть)
КОПАН-90 (пять звеньев)	носитель для иммобилизации	-5,9	торец N-домена
ВИОН АН-1 (пять звеньев)	носитель для иммобилизации	-6,5	торец N-домена
ВИОН КН-1 (пять звеньев)	носитель для иммобилизации	-5,8	торец N-домена

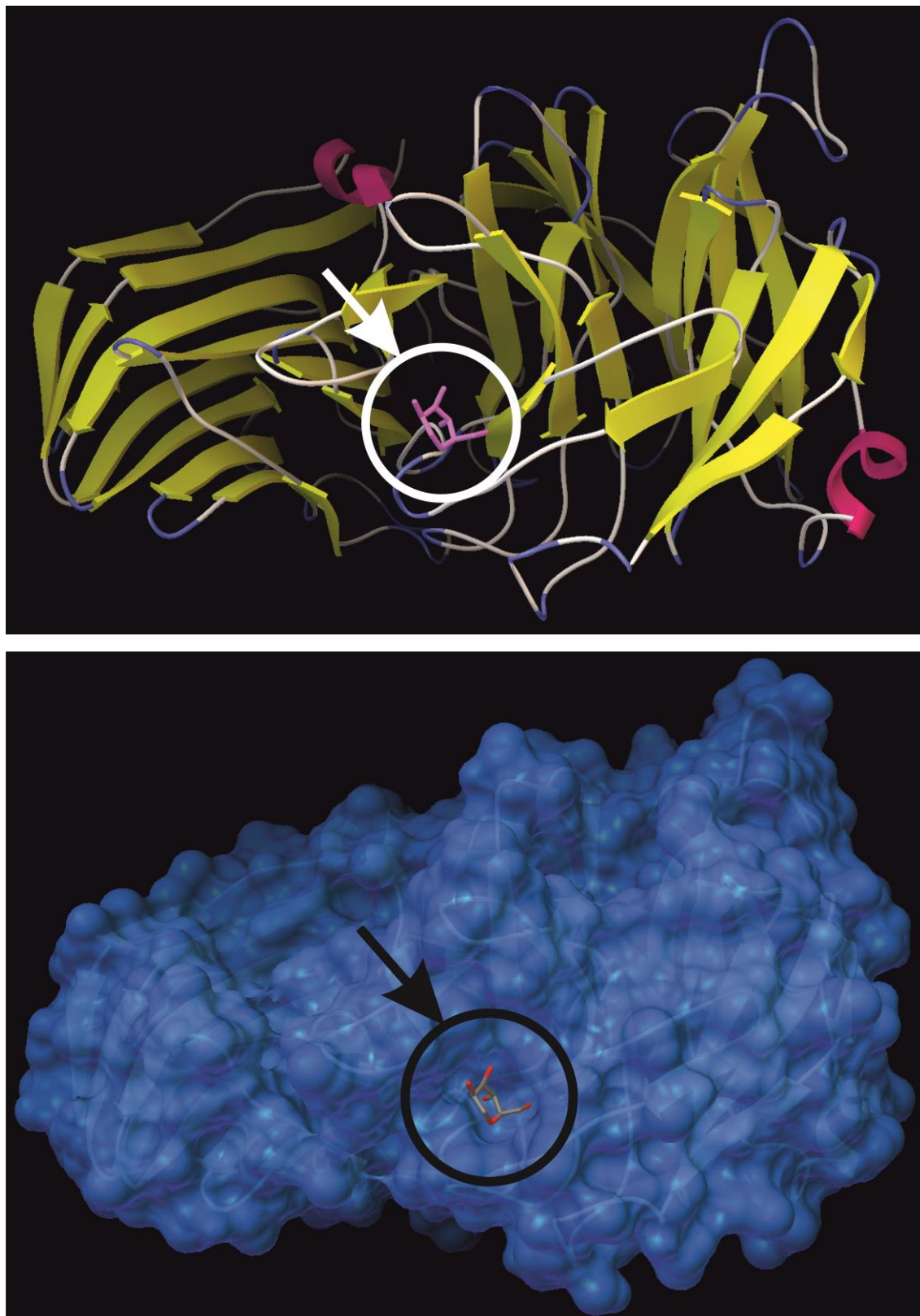


Рис. 41. Локализация наиболее предпочтительного места связывания маннозы на молекуле инулиназы 3SC7

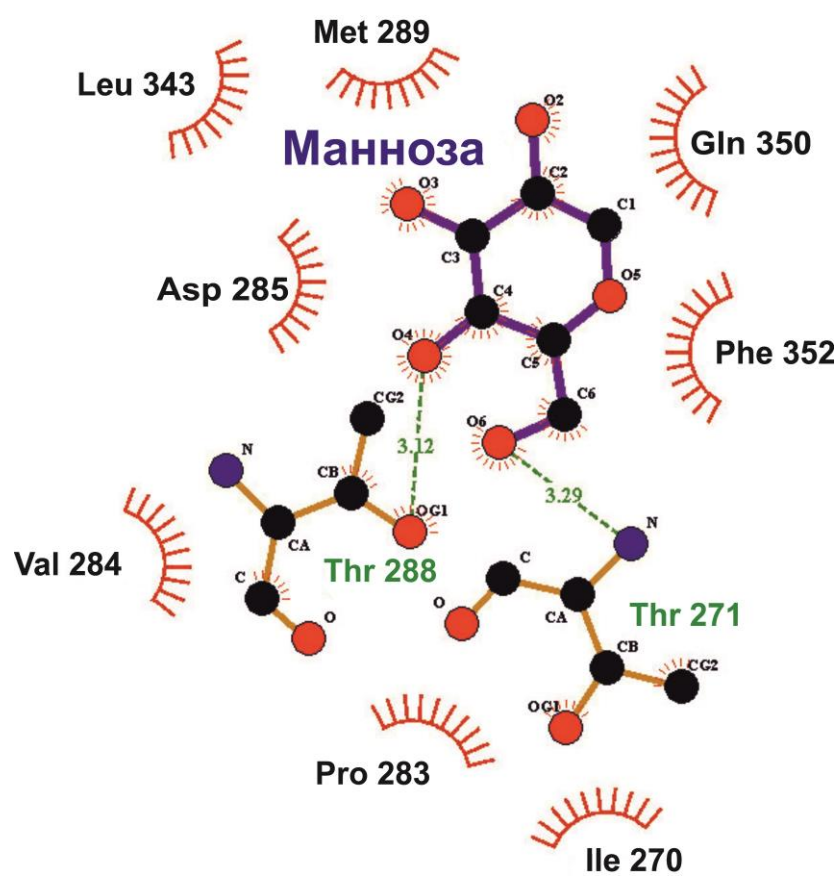


Рис. 42. Развертка процессов взаимодействий при связывании маннозы и инулиназы (пунктиром показаны возможные водородные связи)

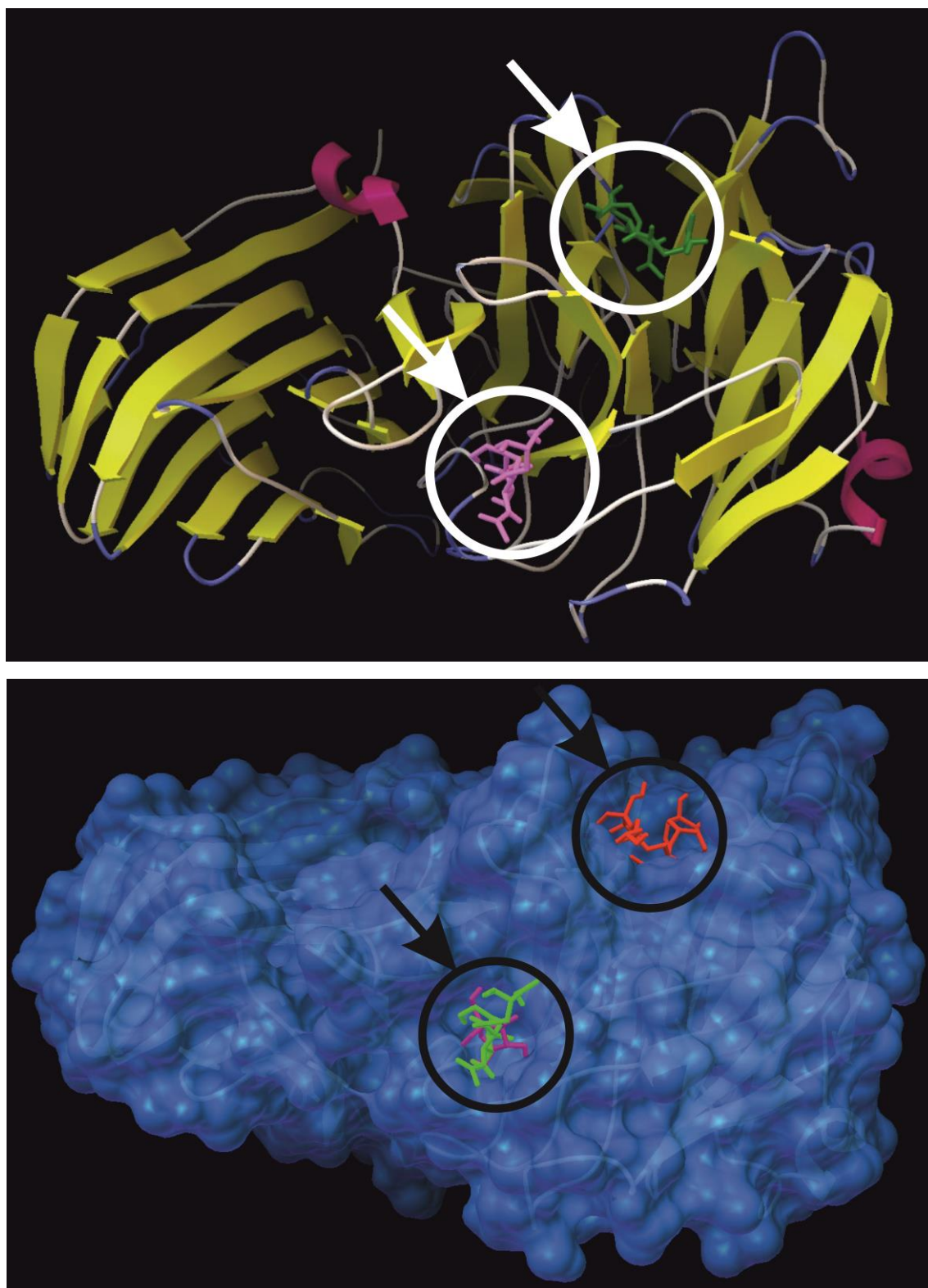


Рис. 43. Локализация зон связывания высокомолекулярных лигандов (на примере гликопротеина) на молекуле инулиназы 3SC7

На основании анализа результатов расчетов стоит отметить следующие важные факты: 1) хитозановая матрица для иммобилизации показала аффинность  $-7$  ккал/моль; 2) тестовая молекула гликопротеина (рис. 44, развертки взаимодействий на рис. 45) продемонстрировала аффинность связывания, сопоставимую с субстратами: сахарозой ( $-6,1$  ккал/моль) и инулином ( $-6,3$  ккал/моль), а именно  $-6,2$  ккал/моль (табл. 21). Указанные параметры, равно как и совпадение мест связывания при образовании комплексов, позволяют считать данные соединения достаточно перспективными для сорбции инулиназы и, вероятно, экспериментальной проверки стабильности и активности таких комплексов.

Дальнейшая модификация этого гликопротеина усилила наше предположение о высоком промышленном потенциале его использования в качестве матрицы для иммобилизации. Молекулярное «пришивание» к гликопротеину остатка цистеина (для образования с подложкой дисульфидных мостиков) не повлияло ни на энергию связывания, ни на локализацию лиганда на ферменте (в варианте гибкого докинга), тогда как использование жесткой конформации цистеинового остатка в этом гликопротеине выявило не только повышение аффинности связывания с мишенью (до  $-7,6$  ккал/моль), но и показало перспективность «пришивания» остатка Cys к N-концу модельного гликопротеина.

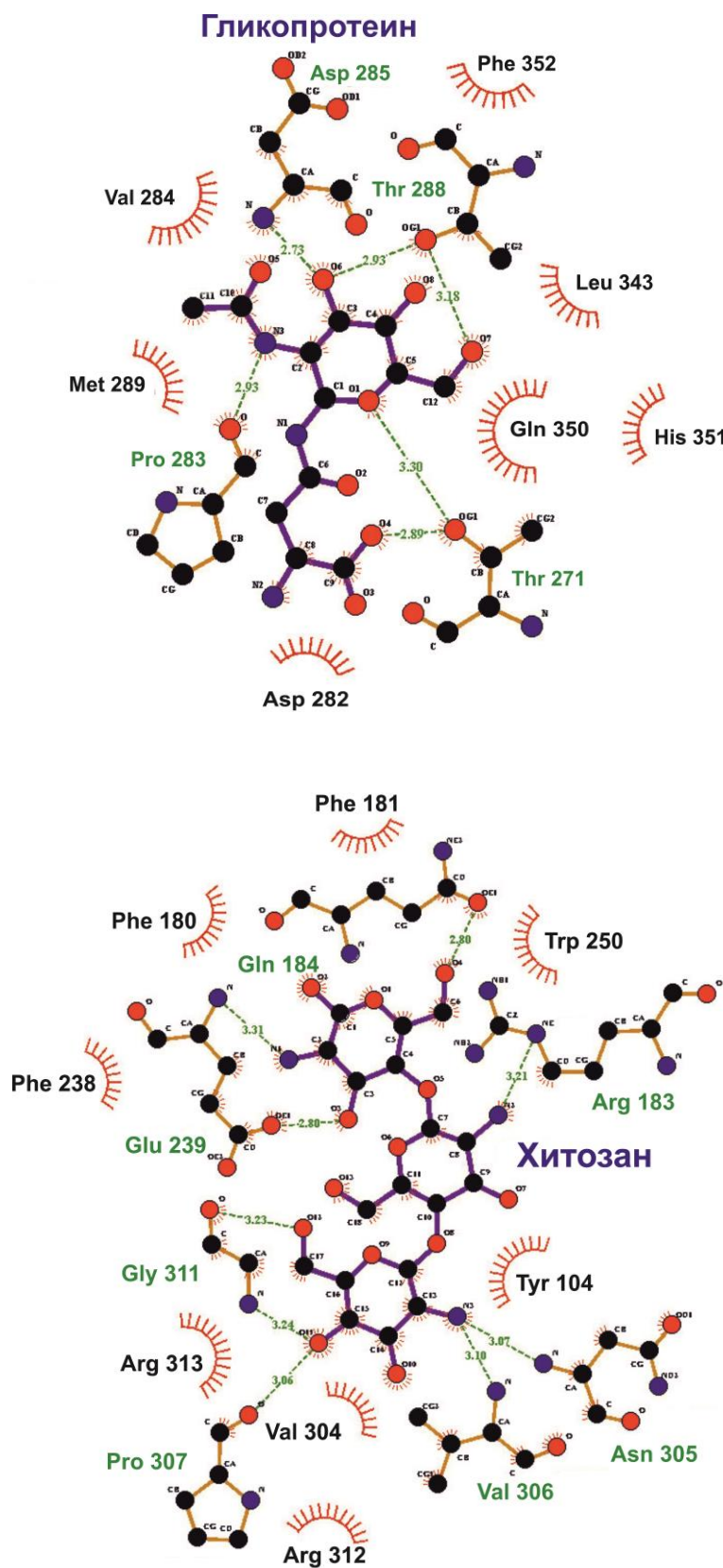


Рис. 44. Развертки процессов взаимодействия при связывании высокомолекулярных лигандов на примере гликопротеина и инулиназы, а также хитозана и инулиназы (пунктиром показаны возможные водородные связи)



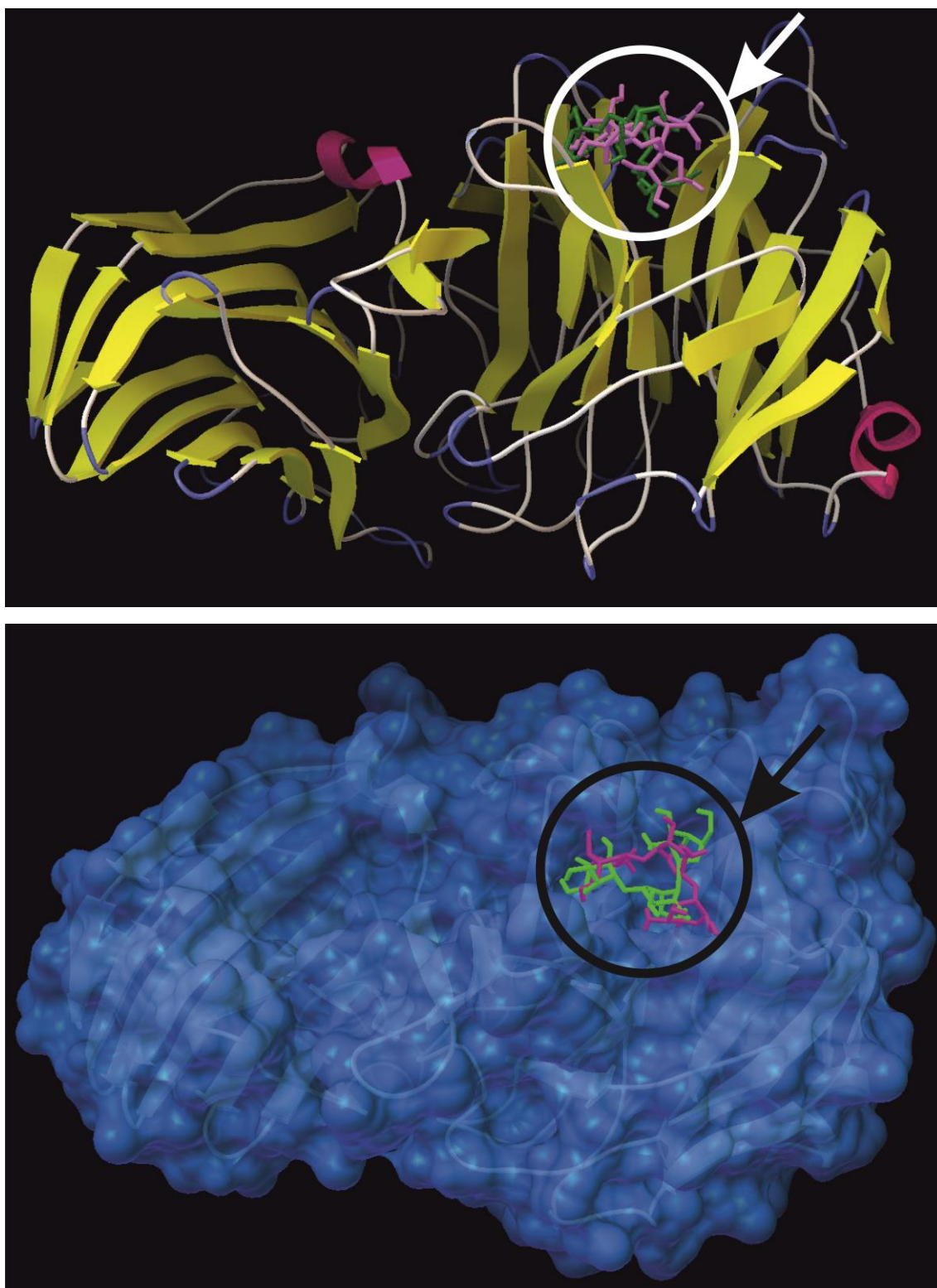


Рис. 45. Локализация компонентов матриц для иммобилизации инулиназы в области торца N-домена при связывании с молекулой фермента

Нами была также рассмотрена возможность использования в качестве иммобилизационных агентов пептидов, содержащих в составе последовательности аминокислот с ароматическими группами и пролин. Конструкция Phe-Pro-Pro-Pro-Pro продемонстрировала аффинность связывания с мишенью в  $-7,0$  ккал/моль, что было сопоставимо, а в ряде случаев и превосходило данный параметр для экспериментально протестированных матриц, в качестве которых выступали ионообменные смолы (КУ-2, АВ-17-2П) и волокна (КОПАН-90, ВИОН-АН 1 и ВИОН-КН 1). Стоит отметить, что в указанном ряду лигандов наибольшей аффинностью к мишени обладала матрица катионообменной смолы КУ-2, расчет показал величину сродства  $-7,3$  ккал/моль. Примечательно также, что все иммобилизационные агенты, по данным расчетов гибкого докинга, связываются с инулиназой в области торца N-домена белка (рис. 45, развертка предполагаемых взаимодействий отражена на рис. 44), что стерически не модифицирует активный центр фермента. Отметим также, что соединение ВИОН-КН 1 (катионообменное волокно) в высокой степени гомологично полилактату, что отражается в близких по величинам аффинностях, которые они демонстрируют по отношению к инулиназе.

Суперпозиция всех исследованных нами лигандов на одной молекуле инулиназы 3SC7 представлена на рис. 46. Отметим, что полученные расчетные результаты хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными (табл. 22): при иммобилизации инулиназы из *Kluveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* процент сохранения активности у гетерогенных препаратов тем выше, чем выше аффинность фермента к матрице носителя.

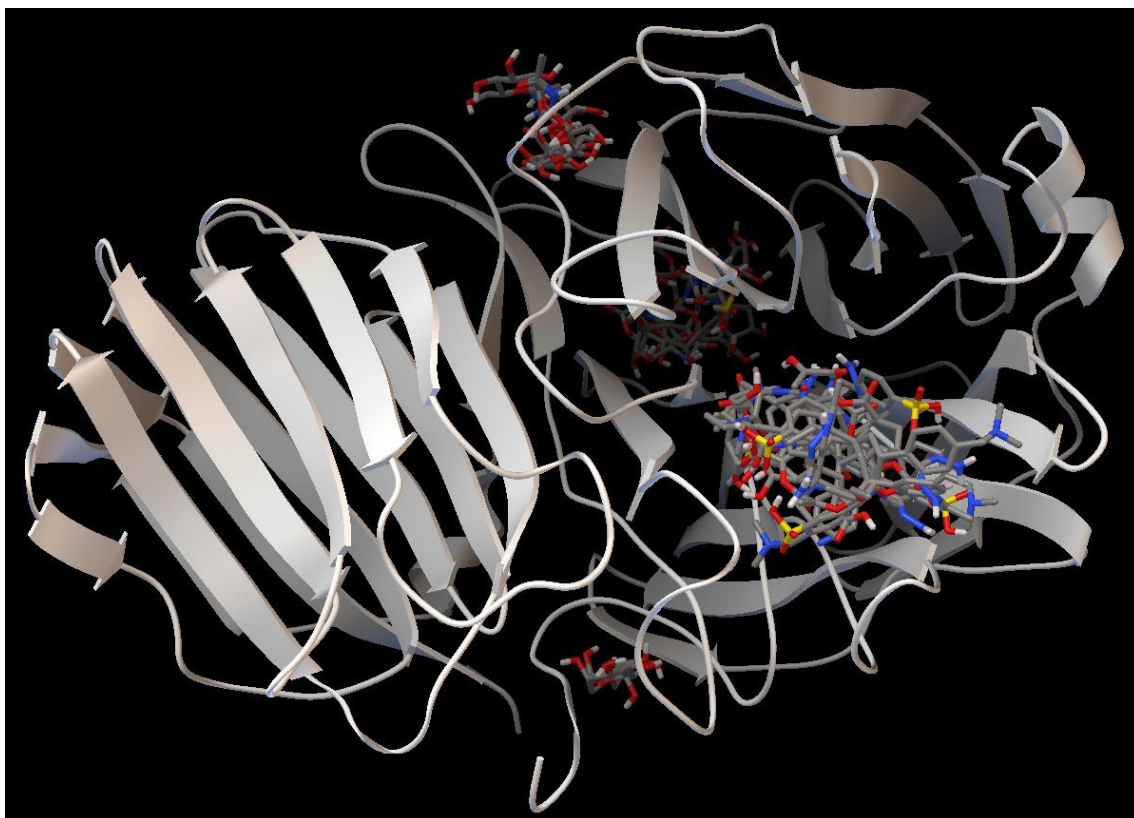


Рис. 46. Суперпозиция всех исследованных нами лигандов (см. табл. 21) на одной молекуле инулиназы 3SC7

Таблица 22

Значения аффинности и процента сохранения активности инулиназы при иммобилизации фермента

Носитель	Аффинность, ккал/моль	Процент сохранения активности инулиназы	
		из <i>Kluveromyces marxianus</i>	из <i>Helianthus tuberosus</i>
КУ-2	-7,3	61,7	80,4
АВ-17-2П	-6,8	75,5	22,5
ВИОН-КН 1	-5,8	27,5	8,7
КОПАН	-5,9	16,9	22,7
ВИОН-АН 1	-6,5	35,8	20,6

В ходе выполненного исследования на модели фермента инулиназы, а также моделях ее лигандов и фрагментах матриц для иммобилизации были определены аффинности связывания и на основании этого сделаны выводы о перспективности экспериментального тестирования некоторых из соединений в качестве иммобилизационных агентов для инулиназы. Основным кандидатом на роль таких агентов выступают гликопротеины, для которых мы предлагаем дополнительное включение в их структуру остатка цистеина с целью создания конструкций с дисульфидными «якорями» к подложке.

### 5.3. Последовательный докинг для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы из *Aspergillus ficuum* на полимерных матрицах

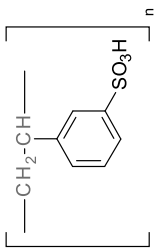
Поглощение аминокислот и белков ионообменными полимерами является сложным процессом, который может протекать как по ионообменному механизму, так и с помощью специфических взаимодействий (диполь-дипольные, гидрофобные взаимодействия и образование водородных связей) (Селеменев В.Ф., 2002). Несмотря на множество практических разработок в области иммобилизации карбогидраз, молекулярные механизмы отдельных стадий этого процесса до конца не изучены. Имеются лишь данные ИК-спектроскопии и электронной микроскопии комплексов фермент-носитель, которые не позволяют составить полную картину о типах, числе и длине связей и взаимодействиях между иммобилизованным ферментным препаратом и матрицей носителя. Отсутствуют исчерпывающие экспериментальные данные об отдельных этапах процесса сорбции карбогидраз на нерастворимых полимерах.

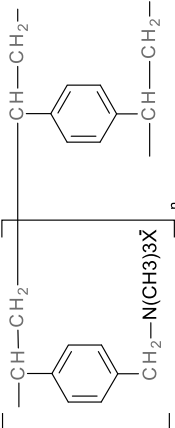
Результаты рентгеноструктурного анализа и молекулярного докинга представлены в открытой печати лишь для комплексов карбогидраз и их низкомолекулярных лигандов. Выявление молекулярных механизмов

получения и применения гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы расширяет наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов, что позволит усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы. В связи с этим нашей задачей было выявление механизма адсорбции инулиназы и сайтов связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой энзима: расчет значений аффинности фермента по отношению к носителям для иммобилизации, определение числа, типов и длин связей и взаимодействий между молекулой инулиназы и носителем на каждой стадии сорбции белковой глобулы.

В качестве тестируемых лигандов (носителей для иммобилизации) применяли хитозан, ионообменные смолы АВ-17-2П, КУ-2 и ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90, краткая характеристика которых представлена в табл. 23. Все эти лиганды были нами апробированы как носители для иммобилизации инулиназ, т.е. все они образуют некие связи или взаимодействия с ее молекулами (рис. 47-82), и этот факт доказан экспериментально. Кроме того, т.к. инулиназа – перспективный фермент для промышленности, все лиганды являются нетоксичными и уже применяются либо в пищевой промышленности, либо в медицине и/или ветеринарии.

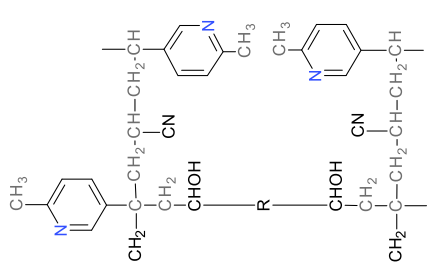
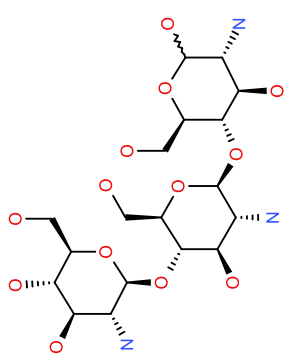
Аминокислотные остатки инулиназы из *Aspergillus ficuum*, формирующие связи и взаимодействия с носителями

Носитель, структура элементарного звена	Номер сайта связывания	Аффинность, ккал/моль	Аминокислотные остатки, формирующие	
			водородные связи, их длина	ван-дер-ваальсовы взаимодействия
1	2	3	4	5
КУ-2, катионит, смола 	1	-7,3	Asn 42, 3,06 и 3,22 Å Gly 68, 3,05 Å	Trp 40, Glu 43, Asn 61, Val 66, Trp 67, Glu 97, Phe 99, Tyr 128, Arg 175, Asn 176, Glu 233, Val 318, Gly 323
	2	-8,0	Tyr 128, 2,95 и 3,07 Å Glu 258, 2,99 Å	Gln 133, Val 66, Arg 175, Ala 257
	3	-7,8	Tyr 105, 2,93 Å Glu 239, 3,12 Å Asn 305, 2,91, и 3,04 Å Gly 311, 2,83 Å	Tyr 104, Pro 107, Phe 181, Arg 183, Gln 184, Met 237, Pro 241, Val 306, Pro 307, Ala 308, Arg 313
	4	-6,8	Val 284, 2,88 Å Asp 285, 2,74 и 3,07 Å Thr 288, 3,04 Å Gln 350, 2,91 Å	Thr 271, Asp 282, Pro 283, Met 289, Lys 345, Gln 349, Phe 352

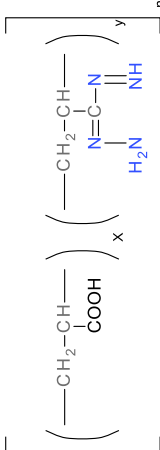
1	2	3	4	5
КУ-2, катионит, смола	5	-6,2	Asp 37, 3,03 Å Met 81, 2,95 Å Trp 83, 2,88 Å Ser 514, 3,08 Å	Arg 29, Pro 30, Ser 31, His 33, Phe 34, Thr 35, His 82, His 85, Ala 84, Leu 515, Glu 516
АВ-17-2П, анионит, смола 	1	-6,8	отсутствуют	Trp 40, Asn 42, Glu 43, Gln 59, Trp 67, Glu 97, Phe 99, Tyr 128, Thr 130, Gln 133, Val 66, Glu 233, Val 234, Thr 255, Asn 265, Asp 298, Asn 320, Gly 323, Lys 332
	2	-7,1		Tyr 128, Gln 133, Gln 135, Val 66, Leu 172, Arg 175, Gly 196, Thr 230, Glu 233, Ala 257, Arg 295, Tyr 322, Ser 321, Ser 324, Asn 325
	3	-5,2		Tyr 104, Phe 180, Arg 183, Phe 238, Glu 239, Pro 241, Glu 246, Thr 248, Trp 250, Asn 305, Val 306, Ala 308, Gly 311, Arg 312, Arg 313
	4	-5,2		Asn 26, Arg 29, Pro 30, Ser 31, Phe 34, Thr 35, His 82, Trp 83, His 85, Thr 388, Ala 389, Val 513, Ser 514, Leu 515, Glu 516
	5	-5,5		Leu 240, Pro 241, Ala 308, Ser 309, Asp 310, Arg 312, Gly 311, Thr 340, Ser 342, Lys 344, Val 353, Gln 355, Pro 356, Thr 358, Arg 393, Arg 462, Gln 476

1	2	3	4	5
ВИОН КН-1, катионит, ВОЛОКНО $\left[ \begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}- \\   \\ \text{COONa} \end{array} \right]_n$	1	-5,8	Arg 313, 3,13 Å Tyr 104, 3,07 Å Glu 239, 3,10 Å Val 306, 2,97, 2,96, 2,76 Å	Phe 180, Phe 238, Leu 240, Pro 241, Trp 250, Asn 305, Pro 307, Ala 308, Gly 311, Arg 312
	2	-5,5	Pro 30, 3,03 Å Thr 35, 2,72 и 3,01 Å Met 81, 3,01 Å Trp 83, 2,86 Å His 85, 3,30 Å	Arg 29, Ser 31, Tyr 32, His 33, His 82, Leu 515
	3	-5,9	Thr 271, 2,96 Å Pro 283, 2,81 Å	Ile 270, Asp 282, Val 284, Asp 285, Thr 288, Leu 343, Gln 349, Gln 350, His 351, Phe 352
	4	-5,2	Asn 42, 3,31 Å Glu 43, 2,84 и 2,86 Å Val 66, 3,07 Å	Gln 59, Trp 67, Ile 70, Gly 97, Phe 99, Tyr 128, Arg 175
	5	-5,6	Asn 42, 2,88 Å Glu 43, 2,97 Å Ser 321, 3,03 Å	Glu 233, Val 234, Thr 255, Asn 265, Asp 298, Val 318, Asn 320, Gly 323
ВИОН АН-1, анионит, ВОЛОКНО	1	-6,5	Asn 42, 3,00 Å	Trp 40, Glu 43, Gln 59, Asn 61, Trp 67, Gly 68, Ile 70, Glu 97, Phe 99, Val 66, Glu 233, Asn 265, Asp 298, Gly 299, Gly 323, Asn 320
	2	-6,4	Gly 196, 2,97 Å Glu 233, 3,05 Å	Tyr 128, Gln 133, Gln 135, Thr 169, Leu 172, Glu 173, Arg 175, Gly 195, Glu 258, Asn 265



1	2	3	4	5
<p><b>ВИОН АН-1, анионит, ВОЛОКНО</b></p> 	3	-7,2	Val 306, 2,92 и 3,07 Å	Tyr 104, Tyr 105, Pro 107, Asn 108, Thr 110, Phe 180, Phe 181, Arg 183, Trp 188, Phe 238, Glu 239, Pro 241, Asn 305, Ala 308, Arg 313
	4	-5,3	Thr 35, 2,94 Å Ser 514, 3,23 Å	Asn 26, Arg 29, Pro 30, Ser 31, Tyr 32, His 33, Phe 34, Asp 37, His 82, Trp 83, His 85, Leu 515
	5	-5,4	Gly 311, 2,86 Å	Leu 240, Pro 241, Glu 243, Gly 244, Glu 246, Thr 248, Arg 312, Arg 313, Leu 341, Ser 342, Lys 344
<p><b>Хитозан</b></p> 	1	-7,0	Arg 183, 3,21 Å Gln 184, 2,80 Å Glu 239, 2,80 и 3,31 Å Asn 305, 3,07 Å Val 306, 3,10 Å Pro 307, 3,06 Å Gly 311, 3,23 и 3,24 Å	Tyr 104, Phe 180, Phe 181, Phe 238, Trp 250, Val 304, Arg 312, Arg 313

1	2	3	4	5
Хитозан	2	-6,8	Thr 271, 3,04 и 3,18 Å Pro 283, 2,93 Å Asp 285, 2,91, 2,96, 3,06 Å Thr 288, 2,94, 3,05, 3,13 Å Gln 350, 2,93 и 2,99 Å	Ile 270, Val 284, Met 289, Gln 349, Phe 352
	3	-6,3	Pro 30, 3,03 Å His 33, 2,97 и 2,92 Å Thr 35, 2,80, 2,81 и 2,89 Å Trp 83, 3,00 и 3,09 Å Asp 466, 2,70 и 3,33 Å Glu 516, 3,01 Å	Ser 31, Tyr 32, His 82, Leu 515
	4	-6,3	Glu 97, 2,92 и 3,21 Å Thr 100, 3,11 и 3,27 Å Arg 175, 3,32 Å Arg 176, 2,71 Å Glu 233, 2,82 Å	Glu 43, Gln 59, Ile 70, Phe 99, Tyr 128, Val 66
	5	-7,7	Asn 42, 3,02 Å Glu 43, 2,82 Å Val 66, 2,94 Å Asp 298, 2,73 Å Asn 320, 2,82 и 3,04 Å	Trp 40, Asn 61, Thr 255, Asn 265, Val 318, Ser 321, Gly 323, Ser 324

1	2	3	4	5
<p>КОПАН-90, амфолит, волокно</p> $\left[ \left( \text{---CH}_2\text{---CH---} \right)_x \left( \text{---CH}_2\text{---CH---} \right)_y \right]_n$ 	1	-5,9	<p>Glu 43, 3,1 Å Gln 59, 2,77 Å Val 66, 2,77 и 2,80 Å Glu 233, 3,07 Å</p>	<p>Asn 42, Trp 67, Ile 70, Glu 97, Phe 99, Tyr 128, Arg 175, Thr 255, Asn 265, Asp 298, Gly 299, Asn 320, Gly 323</p>
	2	-5,6	<p>Met 237, 2,82 Å Glu 239, 3,11 Å Val 306, 3,06 Å Ala 308, 3,09 и 3,27 Å</p>	<p>Tyr 104, Phe 180, Arg 183, Phe 238, Leu 240, Pro 241, Thr 248, Trp 250, Val 304, Asn 305, Pro 307, Gly 311, Arg 312, Arg 313</p>
	3	-5,8	<p>Tyr 128, 3,33 Å Asn 265, 2,85 Å Ser 321, 2,71 Å</p>	<p>Gln 133, Leu 172, Arg 175, Ala 257, Gly 264, Arg 295, Tyr 322</p>
	4	-5,0	<p>Thr 340, 3,28 Å Ser 342, 3,00 и 3,09 Å Pro 356, 2,97 Å Thr 358, 2,99 Å</p>	<p>Glu 243, Asp 310, Gly 311, Arg 312, Arg 313, Leu 341, Lys 344, Gln 355</p>
	5	-5,2	<p>Asn 26, 3,34 Å Thr 35, 2,92, 3,13 и 3,16 Å Trp 83, 3,03 и 3,33 Å His 85, 3,29 и 3,30 Å Glu 516, 3,08 Å</p>	<p>Arg 29, Pro 30, Tyr 32, Ser 31, His 33, Phe 34, Gln 38, His 82, Thr 330, Leu 515</p>

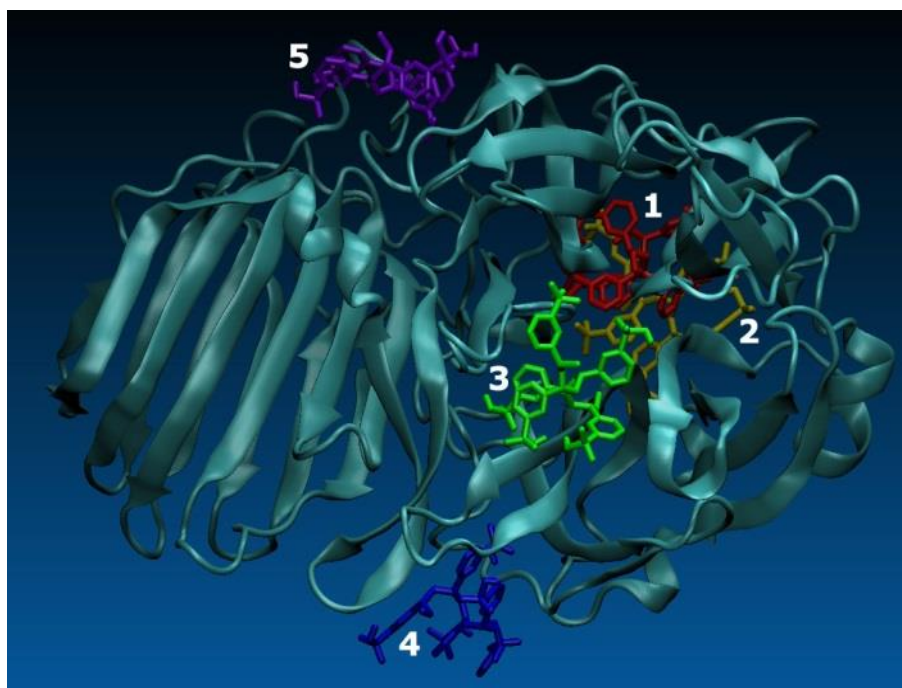


Рис. 47. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с матрицей КУ-2

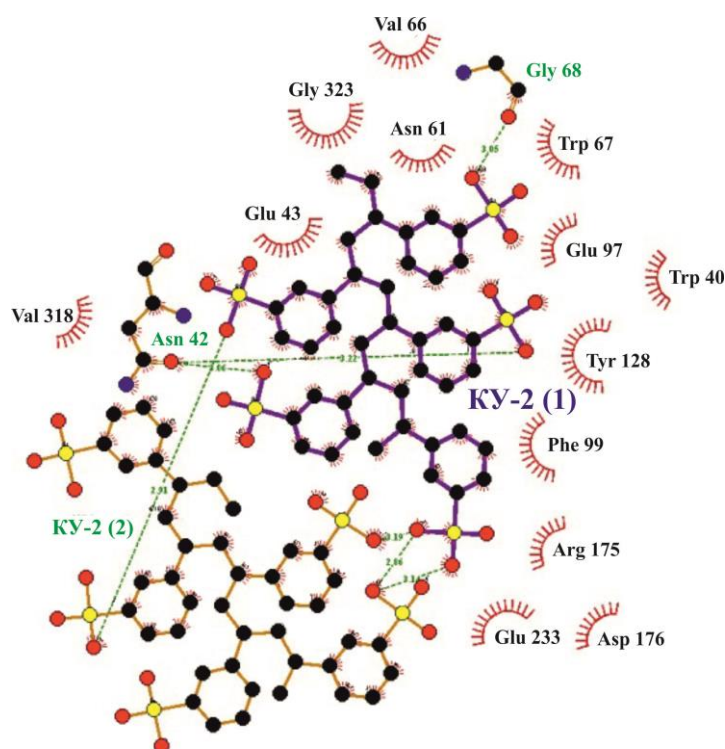


Рис. 48. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания

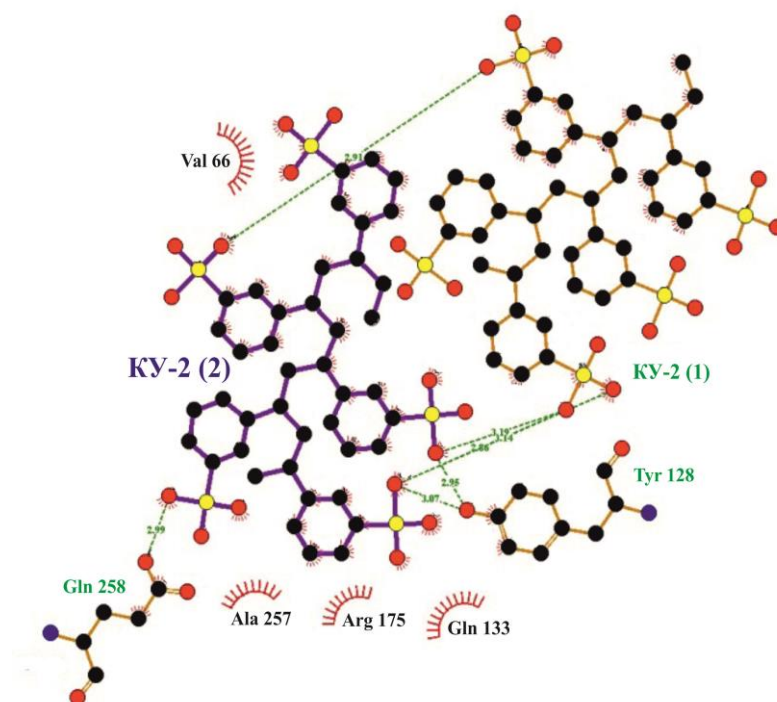


Рис. 49. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

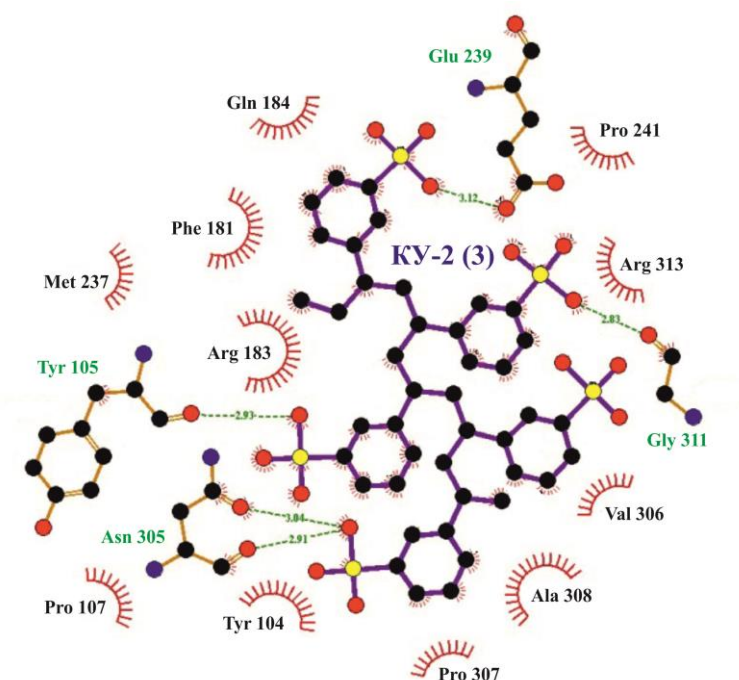


Рис. 50. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

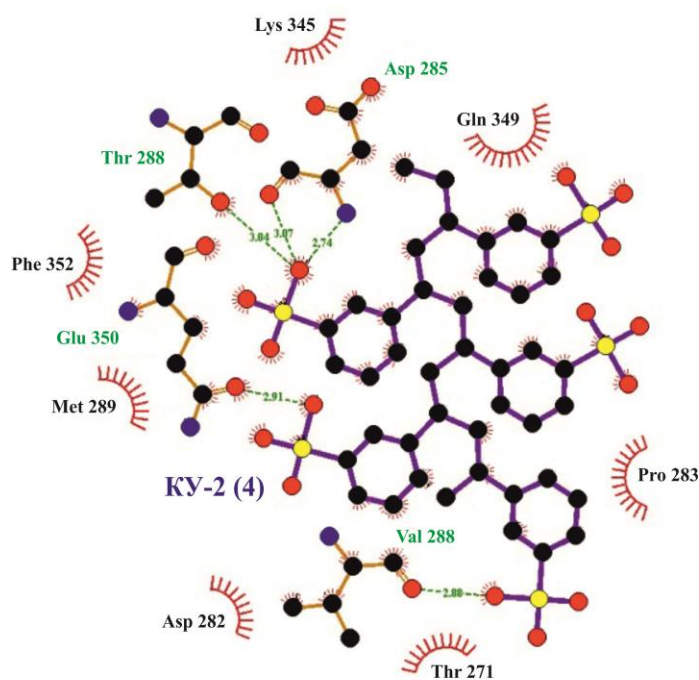


Рис. 51. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

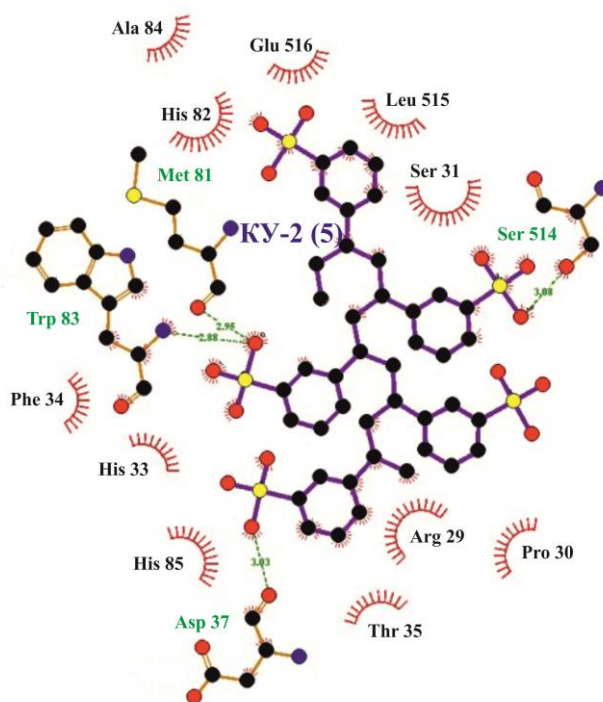


Рис. 52. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

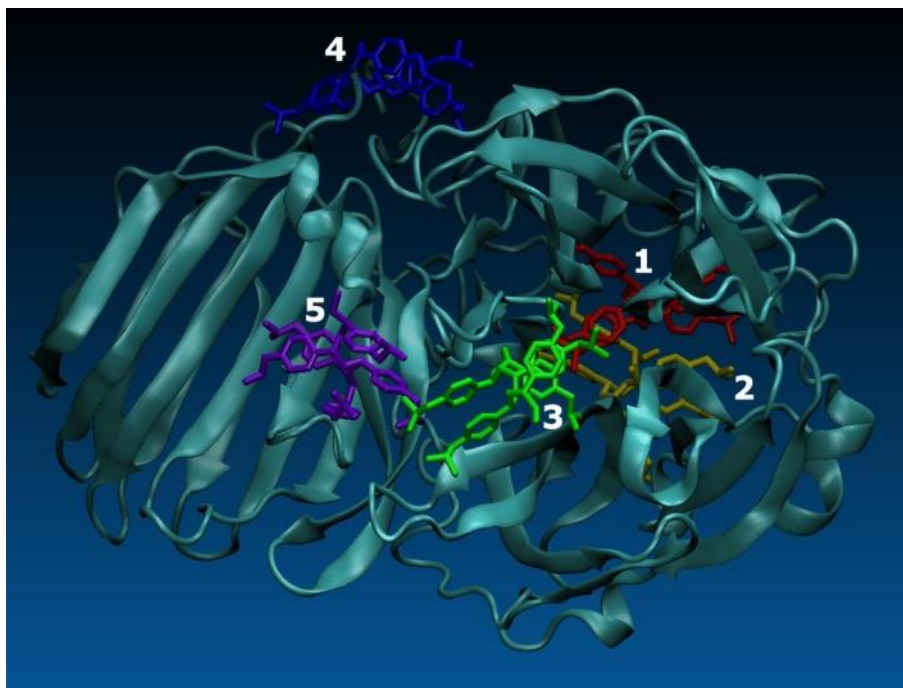


Рис. 53. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с матрицей АВ-17-2П

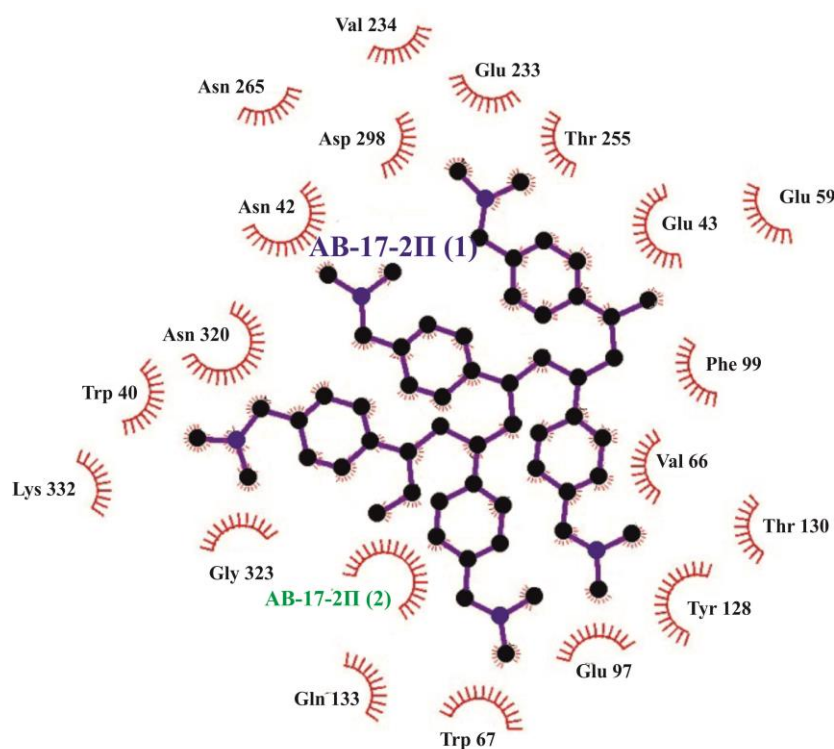


Рис. 54. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей АВ-17-2П в первом сайте связывания

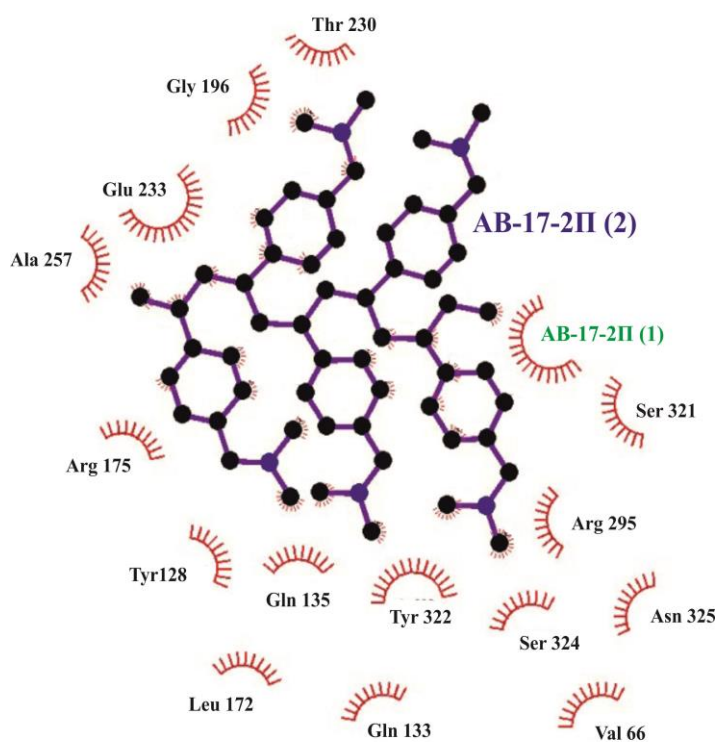


Рис. 55. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей АВ-17-2П во втором сайте связывания

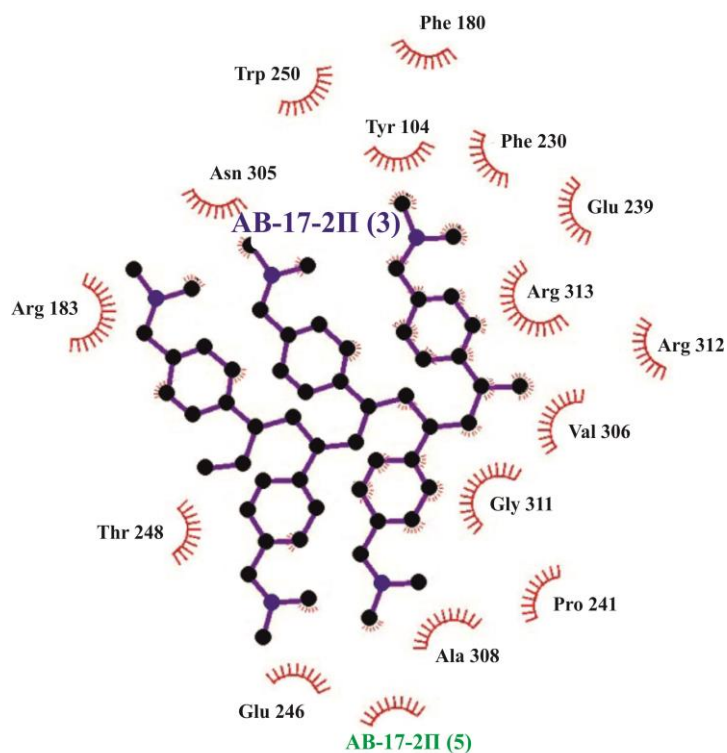


Рис. 56. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей АВ-17-2П в третьем сайте связывания



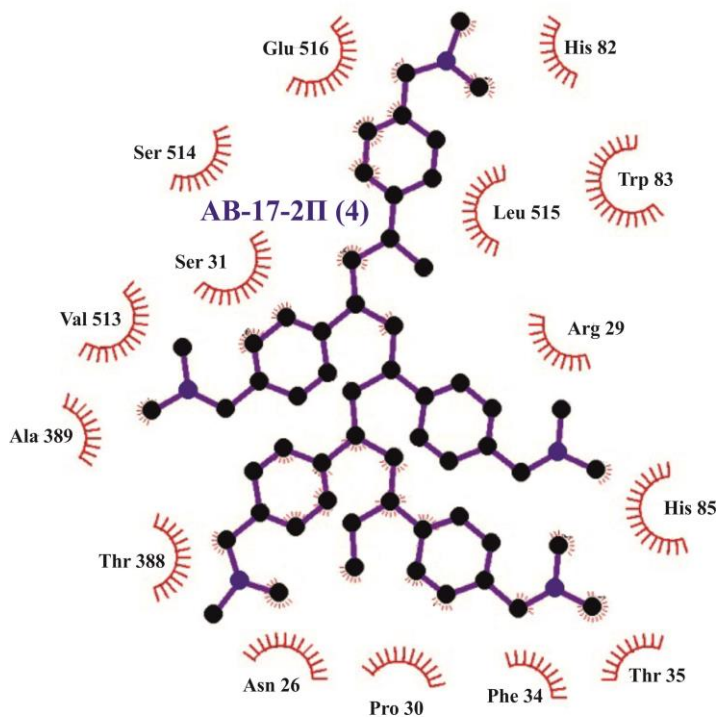


Рис. 57. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей АВ-17-2П в четвертом сайте связывания

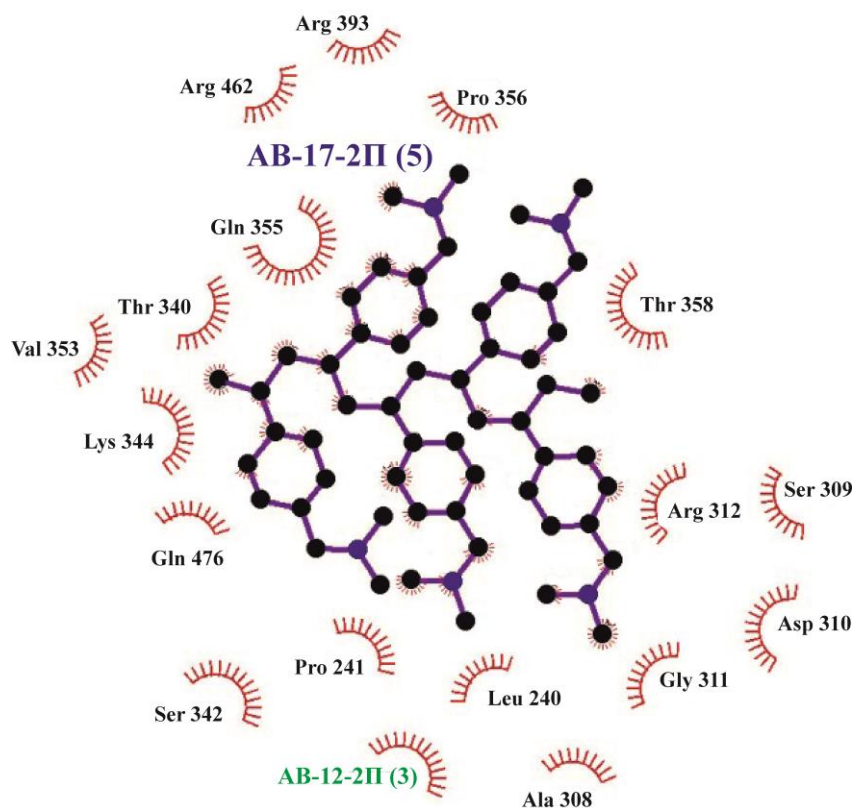


Рис. 58. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей АВ-17-2П в пятом сайте связывания

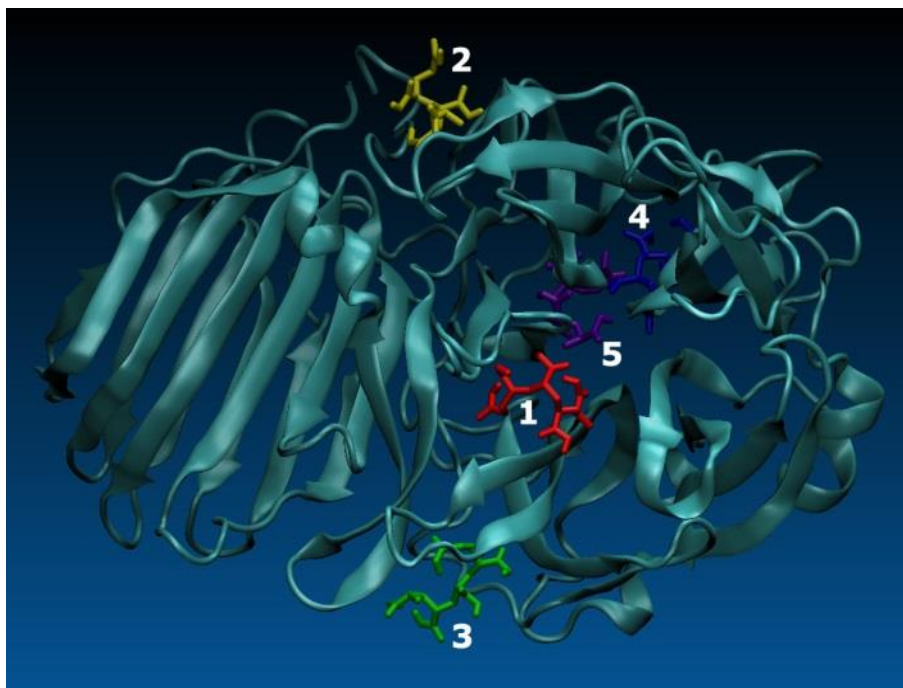


Рис. 59. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с матрицей ВИОН КН-1

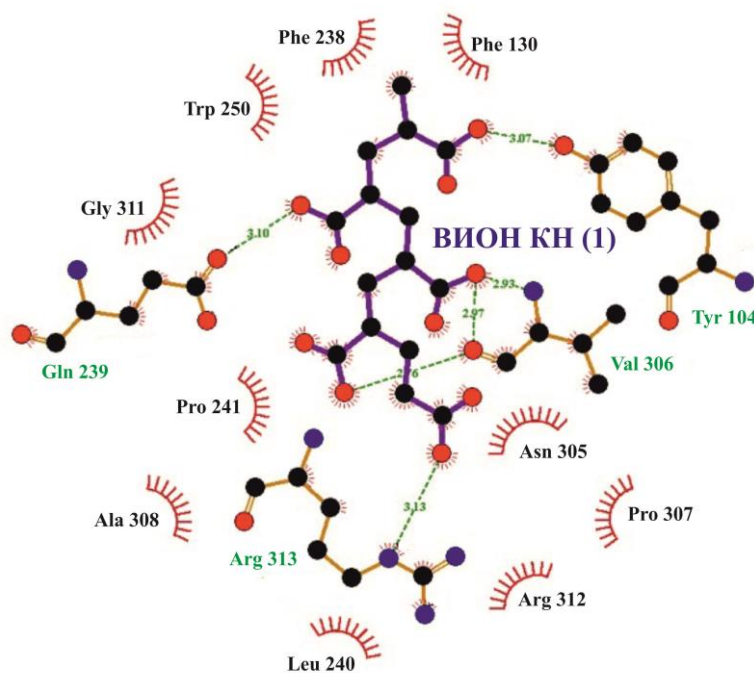


Рис. 60. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания

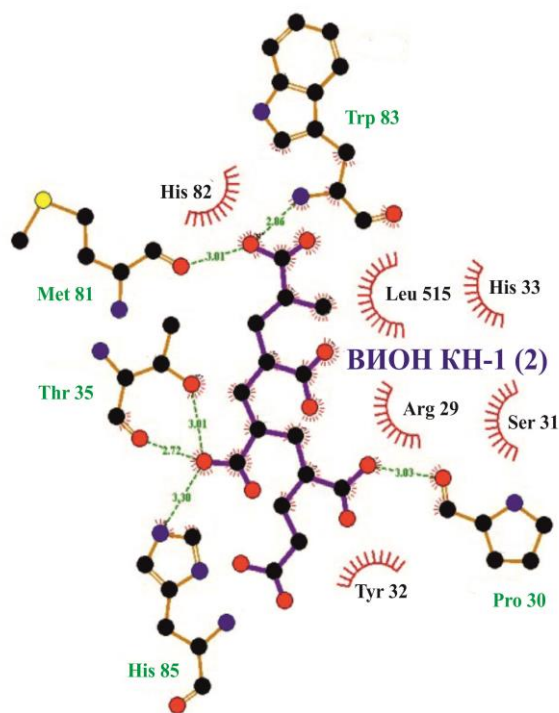


Рис. 61. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

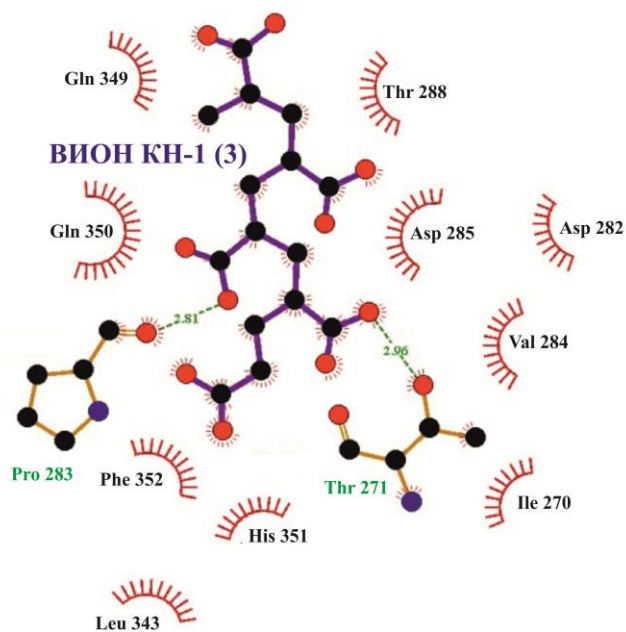


Рис. 62. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

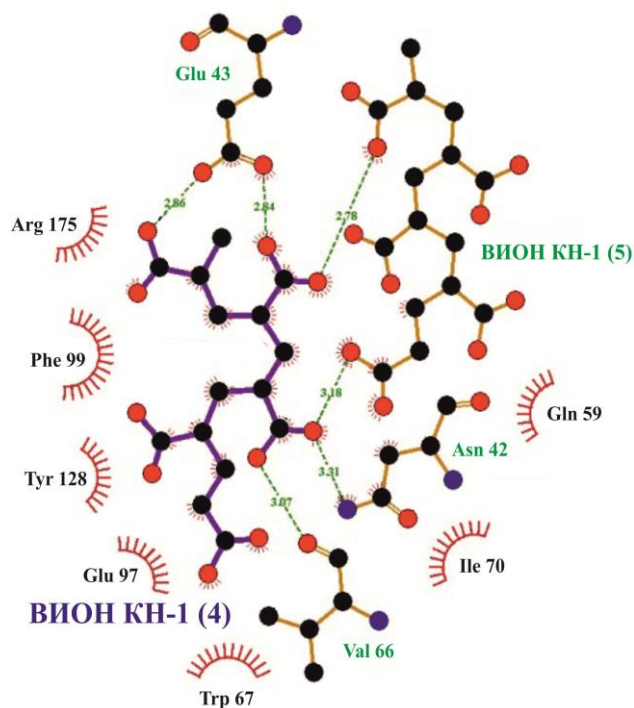


Рис. 63. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

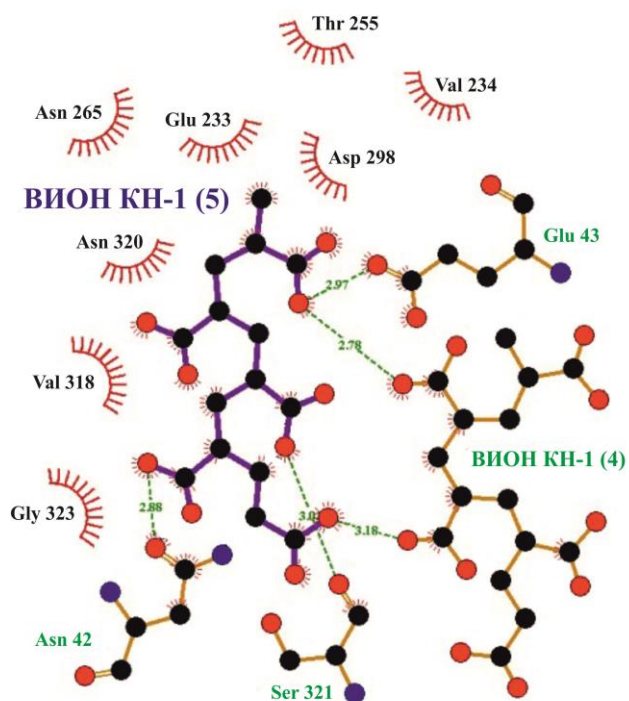


Рис. 64. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

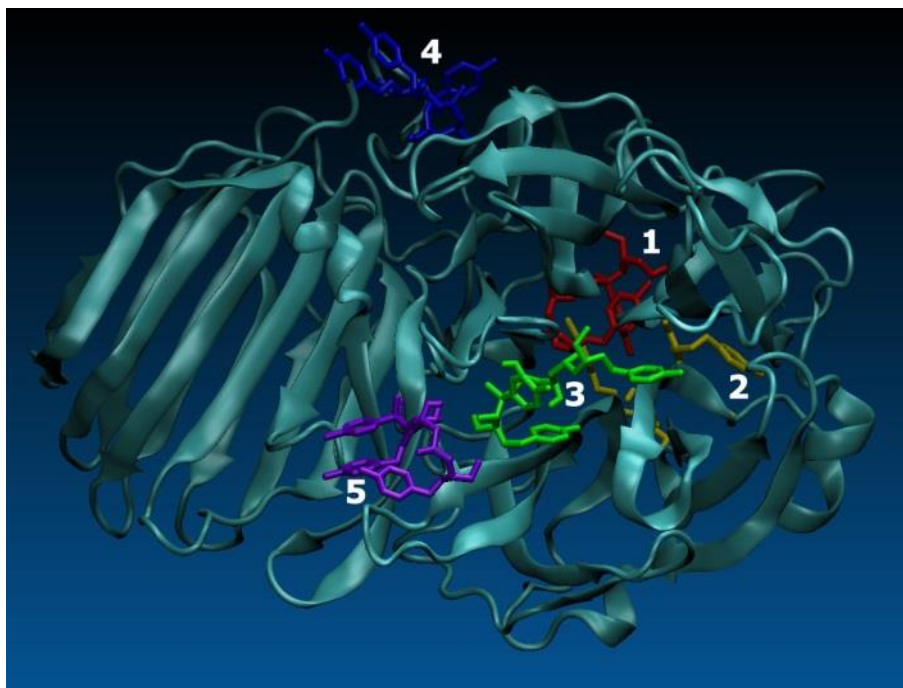


Рис. 65. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с матрицей ВИОН АН-1

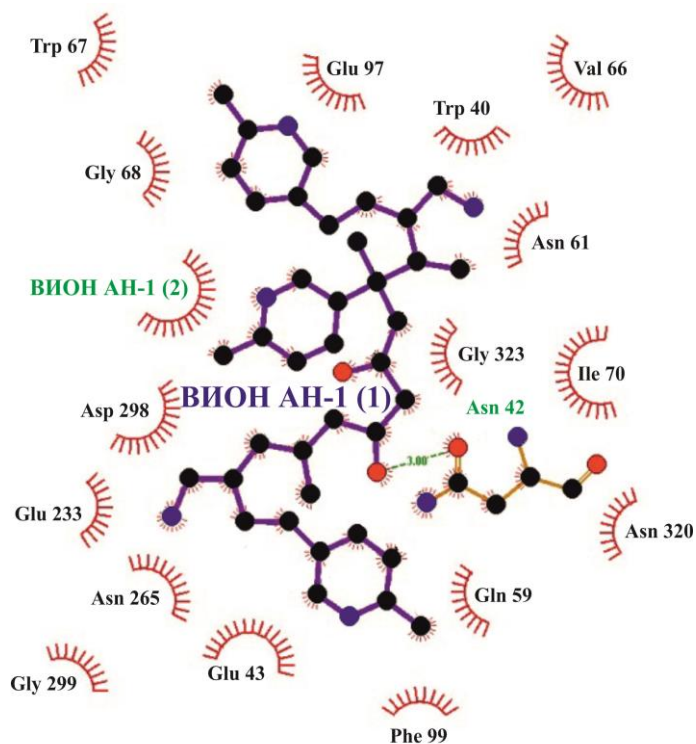


Рис. 66. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания

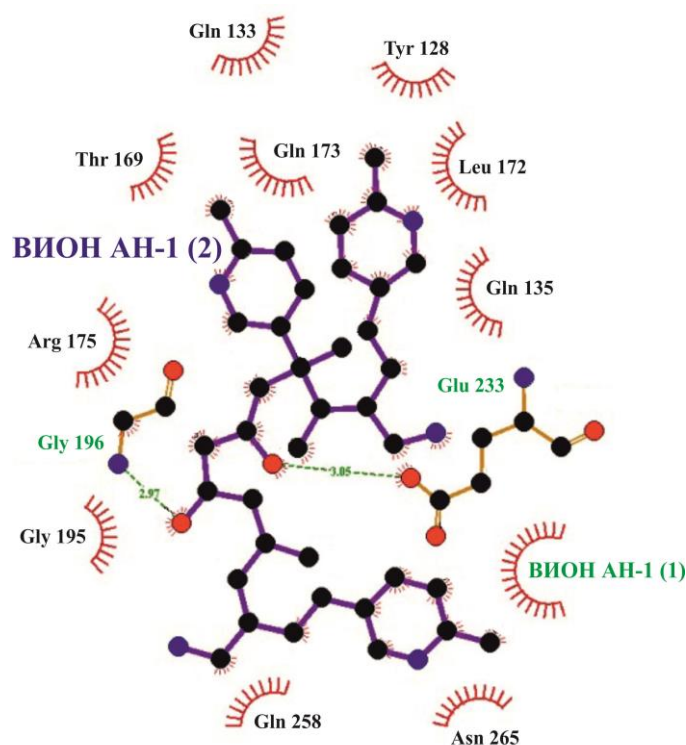


Рис. 67. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

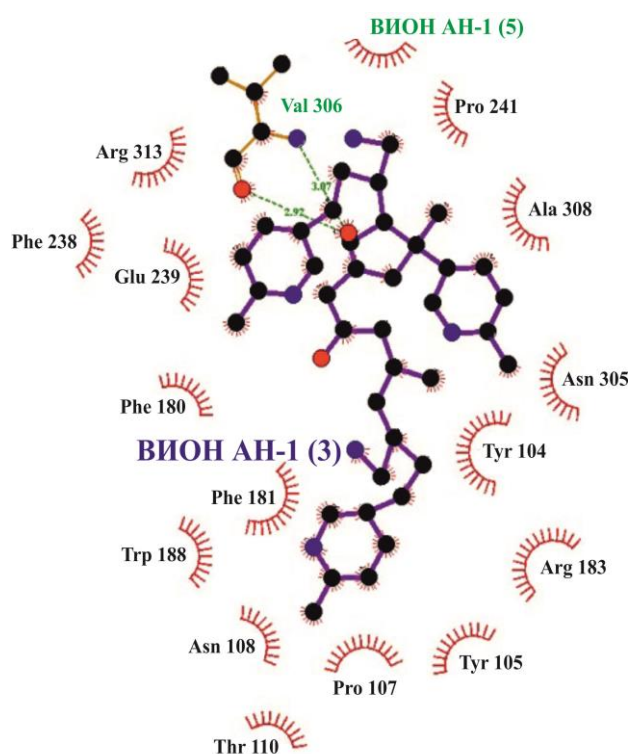


Рис. 68. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

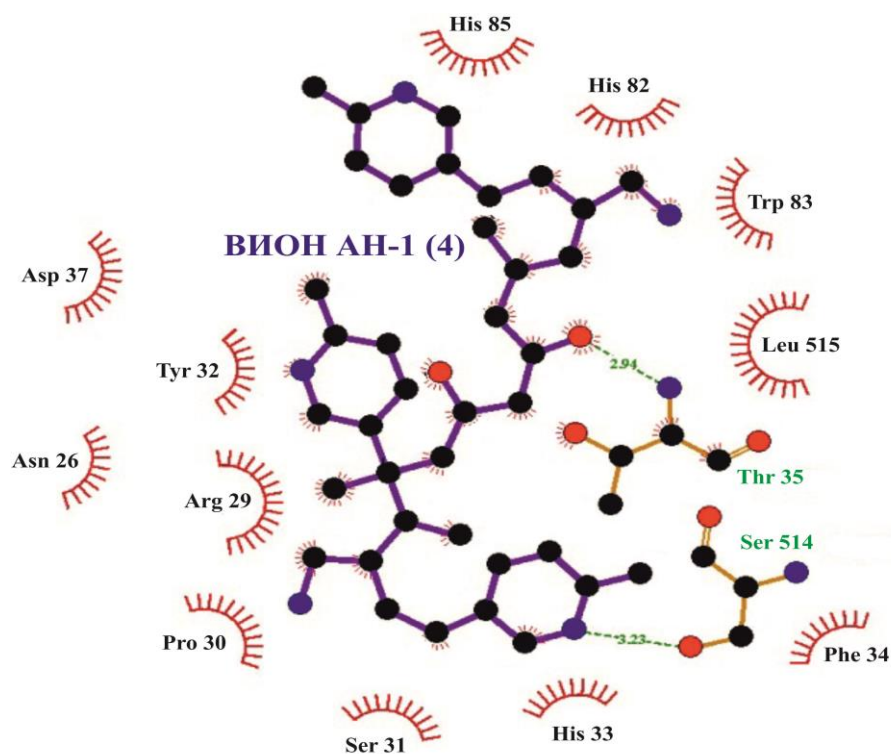


Рис. 69. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

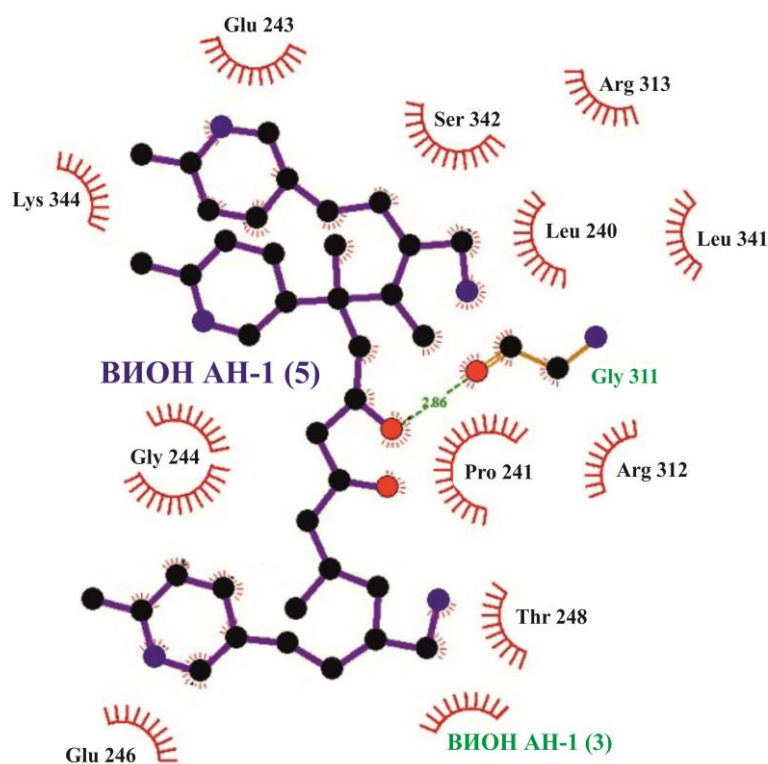


Рис. 70. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

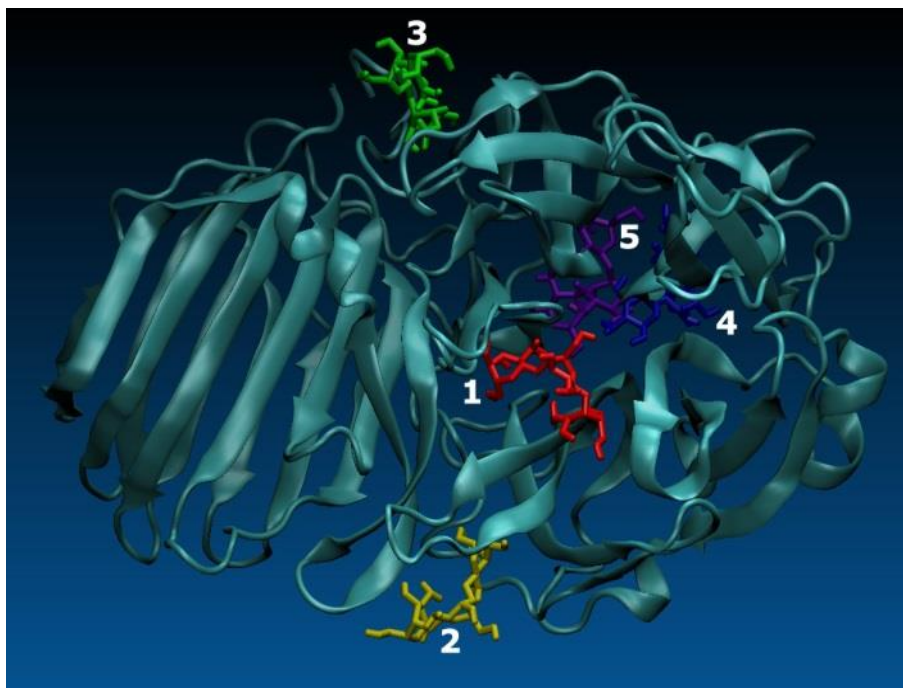


Рис. 71. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с матрицей хитозана

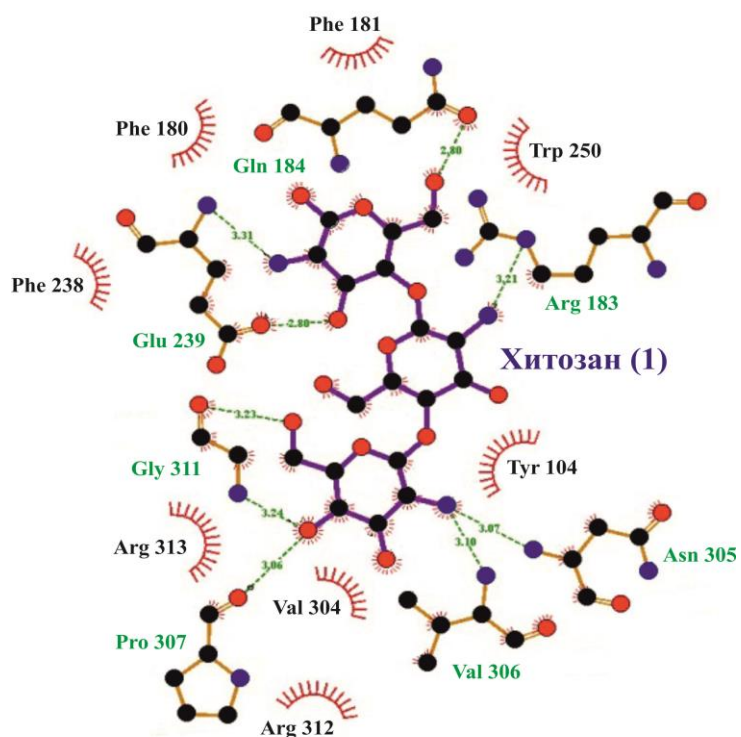


Рис. 72. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания



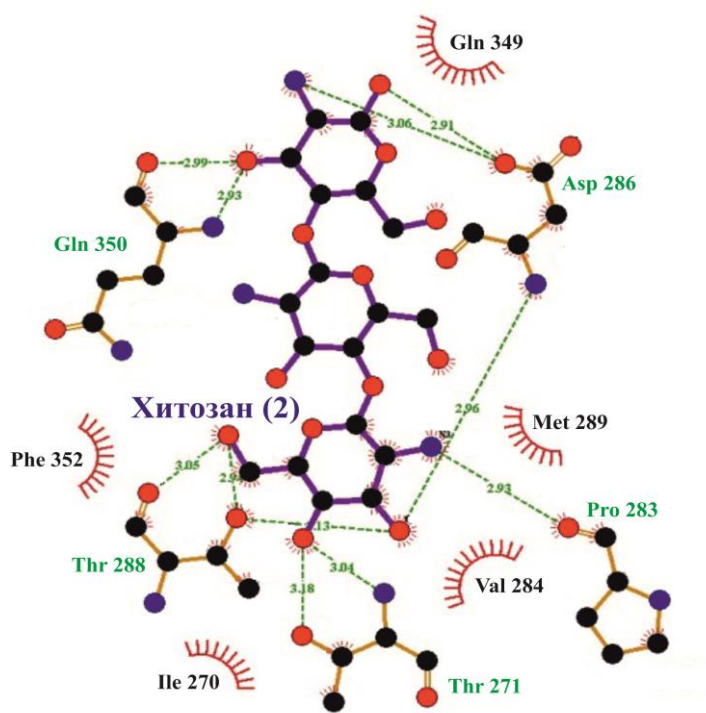


Рис. 73. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

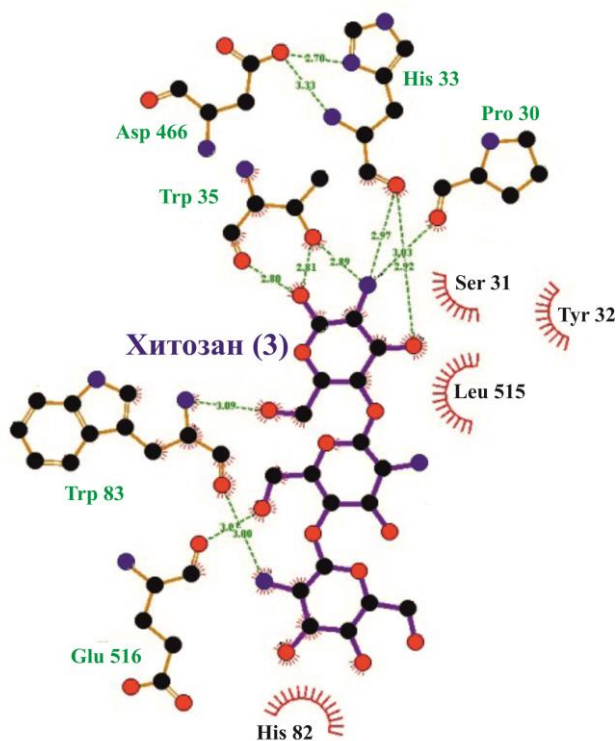


Рис. 74. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

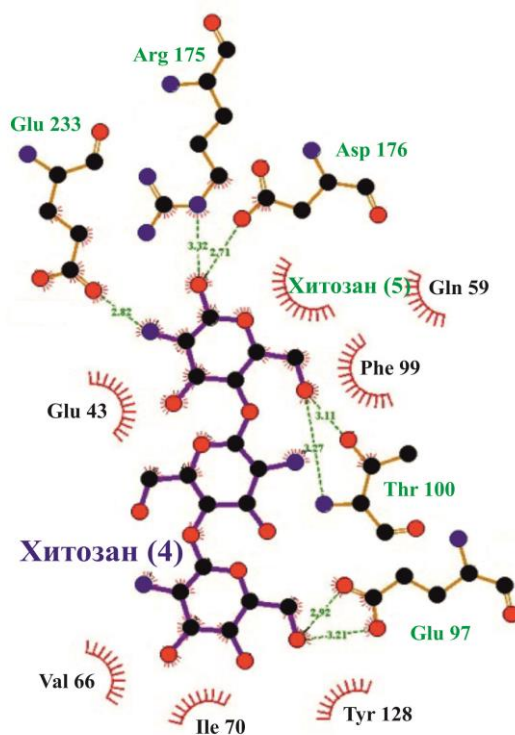


Рис. 75. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

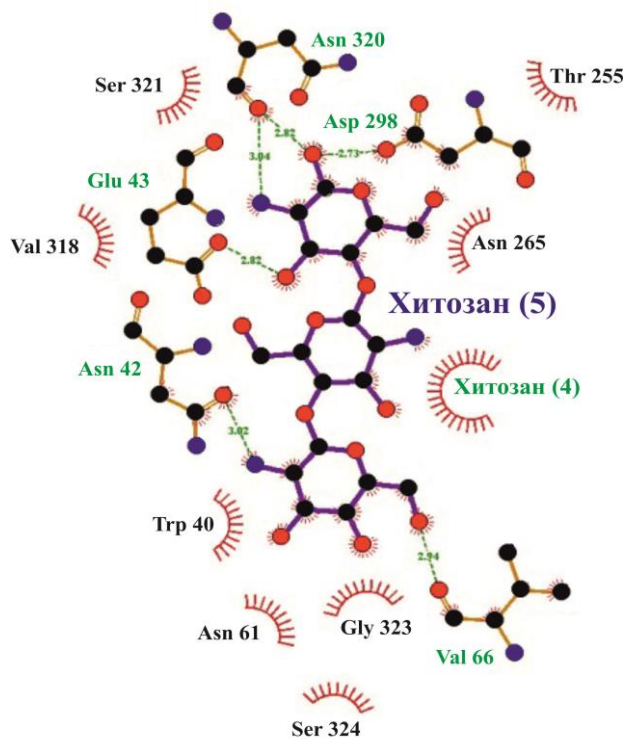


Рис. 76. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

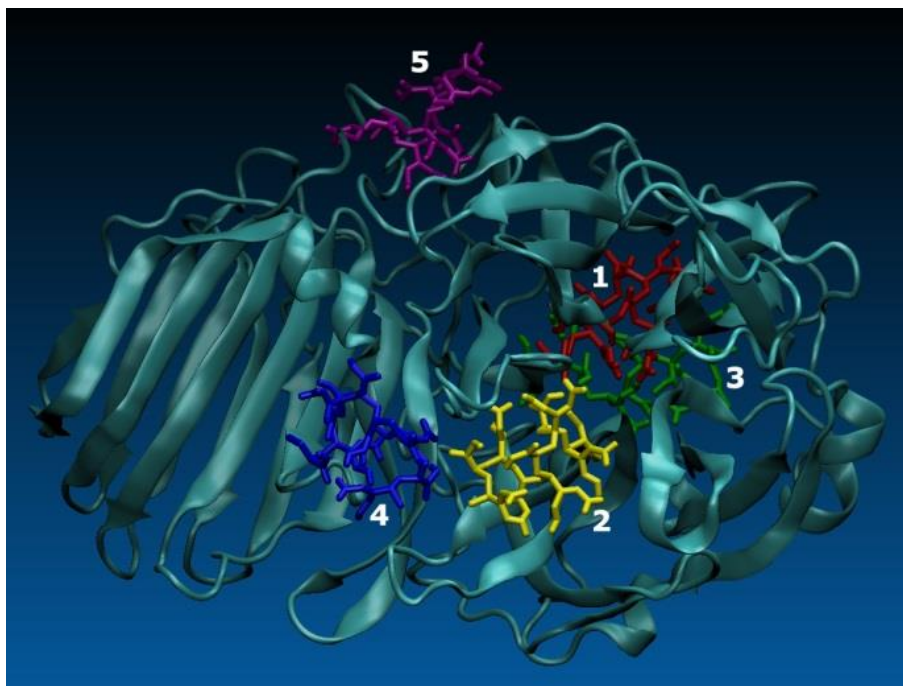


Рис. 77. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с матрицей КОПАН-90

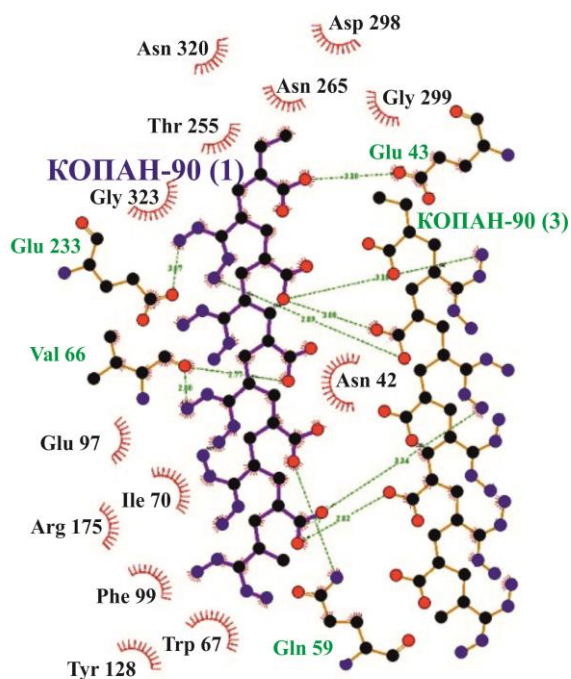


Рис. 78. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания

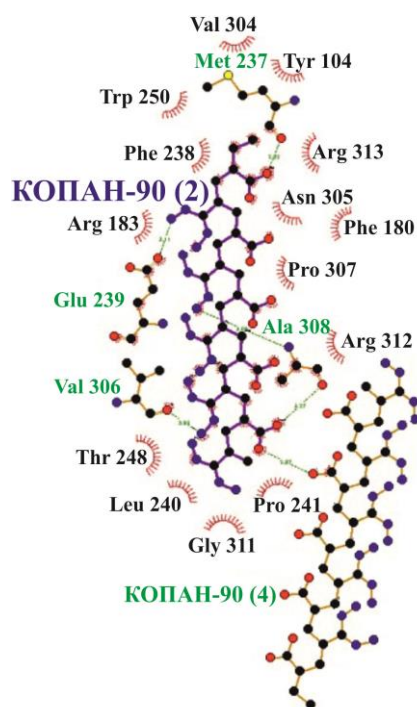


Рис. 79. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

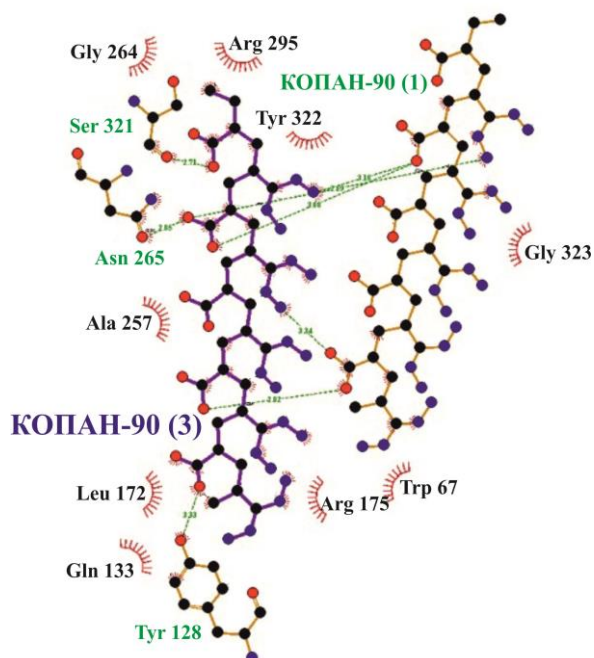


Рис. 80. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

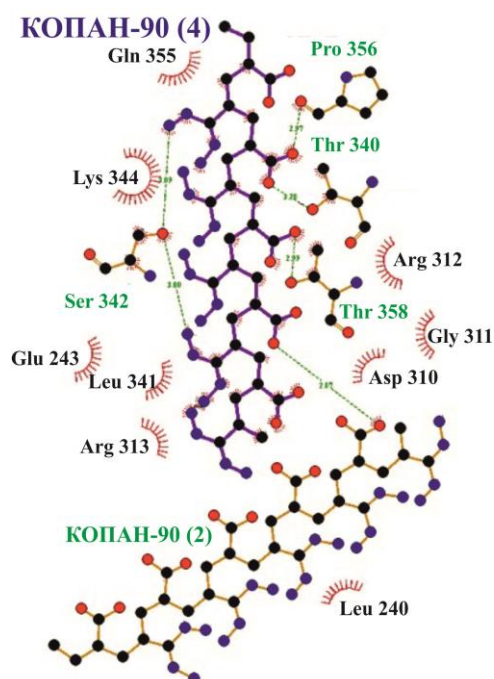


Рис. 81. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

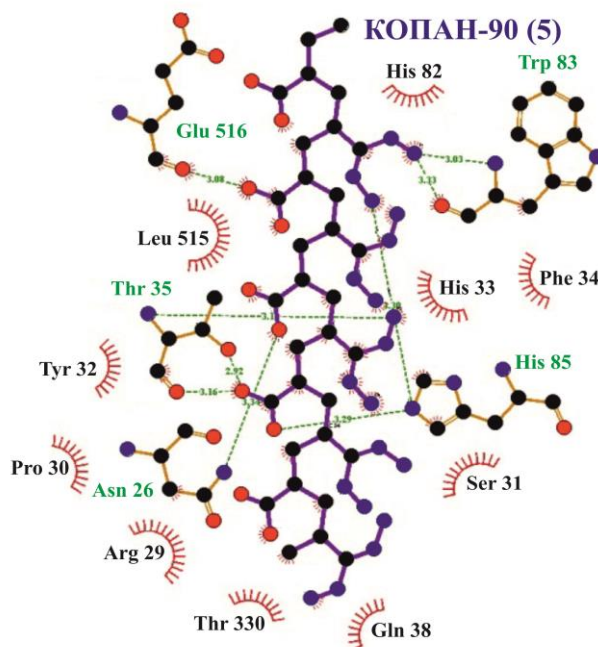


Рис. 82. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

Сульфокатиониты КУ-2, с активными группами  $-\text{SO}_3\text{H}$ , синтезируются на основе стирола и дивинилбензола. Сильноосновный анионит АВ-17-2П с активными группами  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  образуется при взаимодействии хлорметилового сополимера стирола и дивинилбензола с триметиламином. Волокна ВИОН получают с помощью химической модификации волокна «Нитрон». Волокно-амфолит КОПАН-90 содержит одновременно низкоосновные аминогруппы и карбоксильные группы (Лурье А.А., 1972, Бруцкус Т.К., 1975). Иониты КУ-2 и АВ-17-2П используются в производственных циклах в условиях осветления сахара-рафинада, циклах очистки воды или при получении аминокислот (Углянская В.А., 1989). Ионообменные волокна ВИОН – новые высокоэффективные материалы для очистки воздуха от ряда токсичных и агрессивных газов, а также аэрозолей. Волокно ВИОН КН-1 применяется в ветеринарии в качестве дезодорирующего и ранозаживляющего материала, очищает и дезинфицирует рану путем нейтрализации токсических веществ в полости раны (Белобородов В.Л., 2004). Пространственно-структурированные хитозаны пользуются значительным спросом в медицине, наблюдается интенсивное развитие исследований, связанных с их применением в качестве носителей лекарственных субстанций в виде гелей, гранул, микрочастиц, микросфер.

Модели структур полимеров были нарисованы в молекулярном конструкторе HyperChem, последовательно оптимизированы сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в PM3. Для всех полимеров была выбрана длина цепочки в 5 звеньев. Каждый из лигандов в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановка зарядов на молекуле лиганда и ее протонирование/депротонирование осуществлялось автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Для получения результатов *in silico* мы применили последовательный докинг. Иногда его называют каскадным, множественным – мы же используем слово «последовательный» – как отражение, в некоторой степени, сути процесса – последовательного добавления новой копии лиганда после обнаружения и занятия оптимального места связывания. Смысл каскадного докинга – в том, чтобы последовательно исключить вероятные множественные места связывания лигандов, изучив взаимодействия между лигандом и рецептором в случае избытка молекул лиганда.

Процесс заполнения рецептора лигандами (от 1 до 5) выглядел следующим образом. На первой стадии расчета мы брали в качестве рецептора чистый белок (одна глобула из 3SC7) – и рассчитывали докинг на него одной молекулы лиганда (хитозан, ионообменные смолы АВ-17-2П, КУ-2 и ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90). В соответствии с ранжиром по величине свободной энергии (процедура встроена в пакет Autodock VINA) мы анализировали и отбирали конформер лиганда, связанный в некоем месте на поверхности рецептора – и считали это первым положением лиганда. Далее следовала подготовка ко второму расчету. Тот же самый лиганд, в этой же первой конформации, мы делали частью рецептора (прописывая его координаты и частичные заряды на атомах – внутри файла структуры рецептора) – и готовили полученную структуру к докингу в качестве нового рецептора (снова определяли для него размеры ячейки для расчета докинга). В качестве же лиганда снова брали тот же лиганд (хитозан, ионообменные смолы или волокна) что и в первом расчете. Запускали расчет, в ходе которого снова получали разные конформеры лигандов, ранжированные по величинам свободных энергий (но оптимальное место лиганда уже занято в результате первого расчета). Анализировали структуру полученного комплекса и готовили ее для третьего расчета. Для третьего расчета мы брали структуру глобулы со связанным первым лигандом и приписывали к ней связанный второй лиганд.

Получившийся общий комплекс мы готовили как рецептор для третьего расчета. Аналогично находили пять положений лигандов.

Связи и взаимодействия детектировались нами путем сравнительного анализа характера соседствующих атомных группировок, углов и длин межмолекулярных связей. Иллюстрации были отрисованы в соответствии с правилами, заложенными в пакет LigPlot. Возможные взаимодействия лиганда с рецептором были оценены нами до моделирования на основании экспериментальных работ, виртуальные расчеты конкретизируют количественные величины расстояний и точную локализацию лиганда.

Методом ИК-спектроскопии нами было установлено, что сульфогруппы КУ-2 непосредственно участвуют в процессе сорбции инулиназы, определенный вклад в формирование комплекса фермент-носитель вносят водородные связи. Из рис. 47-52 следует, что для всех пяти точек контакта инулиназы с матрицей катионита КУ-2 водородные связи образуются исключительно между сульфогруппами матрицы носителя и молекулой фермента, не затрагивая прочие структуры катионита. Между ионообменными материалами и молекулами фермента при иммобилизации часто возникают электростатические взаимодействия, поэтому следует обратить внимание на распределение положительно заряженных аминокислотных остатков между контактными участками молекулы инулиназы и матрицей катионообменной смолы КУ-2, которая заряжена отрицательно. В формировании первого, второго и четвертого сайтов связывания принимают участие лишь по одному положительно заряженному аминокислотному остатку: Arg 175 одновременно входит в состав первого и второго сайта, Lys 345 – четвертого сайта. В составе третьего сайта мы видим Arg 183 и Arg 313. В образовании последнего взаимодействия принимают участие Arg 29, His 33, His 82, His 85, что составляет ~ 27 % всех аминокислотных остатков в составе зоны контакта носителя и фермента. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что после образования определенного числа связей и взаимодействий (в данном примере двух)



между матрицей катионита КУ-2 и молекулой инулиназы все большую роль будут играть электростатические взаимодействия.

Функциональная группа анионита АВ-17-2П  $-N^+(CH_3)_3$  не имеет протоноакцепторной группировки, необходимой для образования водородной связи, поэтому между четвертичным аммониевым основанием матрицы носителя и его противоионом (участок на поверхности молекулы инулиназы) образуются ионные пары. Связи и взаимодействия между инулиназой и матрицей АВ-17-2П представлены на рис. 53-58, которые демонстрируют наличие только ван-дер-ваальсовых взаимодействий между анионитом и ферментом. Интересно, что отрицательно заряженные аминокислотные остатки превалируют при первом взаимодействии фермента с носителем, по сравнению с другими точками связывания. В частности, в формировании первого сайта связывания принимают участие Glu 43, Glu 97, Glu 233, Asp 298, что составляет 21 % всех аминокислотных остатков в составе контактной области. В образовании второго, четвертого и пятого взаимодействия принимают участие лишь по одному отрицательно заряженному аминокислотному остатку – Glu 233, Glu 516 и Asp 310 соответственно, в третьем сайте связывания присутствуют Glu 239 и Glu 246, т.е. количество потенциально возможных электростатических взаимодействий уменьшается после образования первого контакта между ферментом и анионитом.

На основании данных ИК-спектроскопии нами ранее было установлено, что сорбция белковой глобулы на катионите ВИОН КН-1 происходит за счет связей между карбоксильными группами ионита и положительно заряженными аминокислотными остатками инулиназы. Из расчетных данных (рис. 59-64) следует, что при первом и втором взаимодействии с матрицей носителя соответственно Arg 313 и His 85 образуют водородные связи с карбоксильной группой волокна. В формировании ван-дер-ваальсовых взаимодействий во второй точке связывания принимают участие Arg 29, His 33 и His 82, что составляет 27 %

всех аминокислотных остатков в составе контакта. В составе третьей и четвертой точек присутствуют His 35 и Arg 175 соответственно.

Рис. 65-70 отражают связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей анионита ВИОН АН-1. В формировании ван-дер-ваальсовых взаимодействий первого сайта связывания между матрицей ВИОН АН-1 и инулиназой (как и у анионообменной смолы АВ-17-2П) принимают участие Glu 43, Glu 97, Glu 233, Asp 298, что составляет ~ 24 % всех аминокислотных остатков в составе контактной области. Однако уже во второй точке контакта, в отличие от смолы, Glu 233 образует водородную связь, а остатки Glu 173 и Glu 258 формируют ван-дер-ваальсовы взаимодействия с волокном. В четвертом и пятом месте связывания мы можем констатировать наличие соответственно Asp 37 и остатков Glu 243 и Glu 246.

Хитозан образует с инулиназой наибольшее количество водородных связей из исследуемых нами носителей (44 водородные связи на пять сайтов связывания) (рис. 71-76), на втором месте находится амфолит КОПАН-90 (27 водородных связей на пять сайтов связывания) (рис. 77-82).

Кроме сайтов связывания с инулиназой, на рис. 48, 49 мы видим, что различные звенья полимерной смолы КУ-2 образуют связи с другими звеньями своей матрицы: звенья носителя, взятые нами для первого докинга, формируют водородные связи длиной 2,86, 2,91, 3,14 и 3,19 Å со следующими пятью звеньями катионита, которые участвовали во втором докинге. Катионит ВИОН КН-1 (рис. 63, 64) после образования трех контактных участков между своей матрицей и молекулой фермента формирует две водородные связи длиной 2,78 и 3,18 Å с собственными функциональными группами. Волокно КОПАН-90 (рис. 78-81) сразу образует водородные связи внутри своей матрицы: 2,82, 2,89, 3,08, 3,18 и 3,34 Å, при втором взаимодействии с ферментом образуется еще одна водородная связь – 2,82 Å. Матрицы хитозана (рис. 75, 76) и анионитов АВ-17-2П (рис. 54-56, 58) и ВИОН АН-1 (рис. 66-68, 70) также формируют контактные точки

с собственными функциональными группами, но, в отличие от катионитов КУ-2 и ВИОН КН-1, а также амфолита КОПАН-90, здесь присутствуют не водородные связи, а ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

Следует отметить, что многие аминокислотные остатки на поверхности инулиназы (Arg 175, Arg 313, Asn 305, Asn 42, Glu 233, Glu 239, Glu 43, Glu 97, Gly 311, Gly 323, His 82, Leu 515, Phe 99, Pro 30, Ser 31, Thr 35, Trp 83, Tyr 104, Tyr 128, Val 306, Val 66) входят в состав сайтов связывания при сорбции фермента на всех исследуемых нами носителях, которые отличаются друг от друга по структуре и заряду. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки входят в состав сразу нескольких контактных точек фермента с носителем. Например, Arg 175 образует ван-дер-ваальсовы взаимодействия с первой и второй пятеркой звеньев смолы КУ-2 и первой и третьей пятеркой звеньев волокна КОПАН-90. Tyr 128 входит в состав первого и второго сайтов связывания инулиназы и матриц КУ-2 и АВ-17-2П, первого и третьего сайта для энзима и КОПАН-90. В первый и второй контактный участок для КУ-2 и АВ-17-2П также входит Val 66, который, кроме этого, образует ван-дер-ваальсовы взаимодействия в составе четвертой и пятой точек сорбции фермента на хитозане. Остаток Glu 233 можно увидеть в составе первого и второго сайтов связывания инулиназы и анионитов АВ-17-2П и ВИОН АН-1, остаток Gly 311 – в составе третьего и пятого сайта для АВ-17-2П, второго и четвертого сайта связывания для КОПАН-90. Asn 42 образует водородные связи в двух последних контактах поверхности инулиназы и матрицы катионита ВИОН КН-1, а остаток Glu 43 – водородные связи и ван-дер-ваальсовы взаимодействия в четвертой и пятой точках сорбции фермента на матрицах ВИОН КН-1 и хитозана. Arg 313 наблюдается сразу в третьем и пятом сайтах связывания у ВИОН АН-1, и второго и четвертого сайта у КОПАН-90. Можно заключить, что, если аминокислотные остатки входят одновременно в несколько сайтов связывания при сорбции инулиназы на матрице полимерных носителей, то это чаще – следующие пары контактов: первый-второй и четвертый-пятый (табл. 24).

Таблица 24

Данные о перекрывании аминокислотных остатков инулиназы из *Aspergillus ficium*, формирующих связи и взаимодействия с носителями (самым крупным шрифтом обозначены аминокислотные остатки в составе первого сайта связывания, далее шрифт уменьшается с увеличением номера сайта связывания; обычным шрифтом отражены остатки, участвующие в формировании ван-дер-ваальсовых взаимодействий, жирным шрифтом и подчеркиванием выделены остатки, образующие водородные связи с матрицей носителя)

КУ-2	АВ-17-2П	ВИОН КН-1	ВИОН АН-1	Хитозан	КОПАН- 90
1	2	3	4	5	6
Arg 175 Arg 175 Arg 313	Arg 175  Arg 313	Arg 175  <b>Arg 313</b>	Arg 175  Arg 313 Arg 313	<u>Arg 175</u>  Arg 313	Arg 175 Arg 175 Arg 313 Arg 313
<b>Asn 305</b> <b>Asn 42</b>	Asn 305 Asn 42	Asn 305 <u>Asn 42</u> <u>Asn 42</u>	Asn 305 <b>Asn 42</b>	<b>Asn 305</b> <u>Asn 42</u>	Asn 305 Asn 42
Glu 233	Glu 233 Glu 233 Glu 239 Glu 43	Glu 233  <b>Glu 239</b> <u>Glu 43</u> <b>Glu 43</b>	Glu 233 <b>Glu 233</b> Glu 239 Glu 43	<u>Glu 233</u>  <b>Glu 239</b> Glu 43 <u>Glu 43</u>	<b>Glu 233</b>  <b>Glu 239</b> <b>Glu 43</b>
Glu 97 <b>Gly 311</b>	Glu 97 Gly 311 Gly 311	Glu 97 Gly 311	Glu 97 <u>Gly 311</u>	<u>Glu 97</u> <b>Gly 311</b>	Glu 97 Gly 311 Gly 311
Gly 323 His 82 Leu 515 Phe 99 Pro 30 Ser 31	Gly 323 His 82 Leu 515 Phe 99 Pro 30 Ser 31	Gly 323 His 82 Leu 515 Phe 99 <b>Pro 30</b> Ser 31 <b>Thr 35</b> <b>Trp 83</b> <b>Tyr 104</b> Tyr 128	Gly 323 His 82 Leu 515 Phe 99 Pro 30 Ser 31  <b>Thr 35</b>  Trp 83 Tyr 104 Tyr 128	Gly 323 His 82 Leu 515 Phe 99 <b>Pro 30</b> Ser 31 <b>Thr 35</b> Trp 83 Tyr 104 Tyr 128	Gly 323 His 82 Leu 515 Phe 99 Pro 30 Ser 31  <u>Thr 35</u> <u>Trp 83</u> Tyr 104 Tyr 128 <b>Tyr 128</b> <b>Val 306</b> <b>Val 66</b>
Val 306 Val 66 Val 66	Val 306 Val 66 Val 66	<b>Val 306</b> <u>Val 66</u>	<b>Val 306</b> Val 66	<b>Val 306</b> Val 66 <u>Val 66</u>	<b>Val 66</b>

## Продолжение табл. 24

1	2	3	4	5	6
—	Arg 312 Arg 312 Asn 265  Asn 320 Asp 298 Gln 59 Phe 180 Phe 238	Arg 312  Asn 265  Asn 320 Asp 298  Gln 59 Phe 180 Phe 238	Arg 312  Asn 265 Asn 265 Asn 320 Asp 298 Gln 59 Phe 180 Phe 238	Arg 312  Asn 265  <u>Asn 320</u> <u>Asp 298</u>  Gln 59 Phe 180 Phe 238	Arg 312 Arg 312 Asn 265  <u>Asn 265</u> Asn 320 Asp 298  <u>Gln 59</u> Phe 180 Phe 238
His 33	—	His 33	His 33	<b><u>His 33</u></b>	His 33
Arg 183	Arg 183	—	Arg 183	<b><u>Arg 183</u></b>	Arg 183
Ala 308  Arg 29 His 85 Pro 241 Trp 67	Ala 308 Ala 308 Arg 29 His 85 Pro 241 Pro 241 Trp 67	Ala 308 Arg 29 <b><u>His 85</u></b> Pro 241 Trp 67	Ala 308  Arg 29 His 85 Pro 241 Pro 241 Trp 67	—	<b><u>Ala 308</u></b>  Arg 29 <b><u>His 85</u></b> Pro 241 Trp 67
—	—	Ile 70 Tyr 32	Ile 70 Tyr 32	Ile 70 Tyr 32	Ile 70 Tyr 32
Glu 516	Glu 516	—	—	<b><u>Glu 516</u></b>	<b><u>Glu 516</u></b>
Gln 133  Phe 34	Gln 133 Gln 133 Phe 34	—	Gln 133  Phe 34	—	Gln 133  Phe 34
Trp 40	Trp 40	—	Trp 40	Trp 40	—
—	Ser 321 Trp 250 Thr 255	Ser 321 Trp 250 Thr 255	—	Ser 321 Trp 250 Thr 255	<b><u>Ser 321</u></b> Trp 250 Thr 255
—	Leu 240	Leu 240	Leu 240	—	Leu 240
Pro 307	—	Pro 307	—	<b><u>Pro 307</u></b>	Pro 307
Gln 133  Phe 34	Gln 133 Gln 133 Phe 34	—	Gln 133  Phe 34	—	Gln 133  Phe 34
Trp 40	Trp 40	—	Trp 40	Trp 40	—

Продолжение табл. 24

1	2	3	4	5	6
—	Ser 321 Trp 250 Thr 255	Ser 321 Trp 250 Thr 255	—	Ser 321 Trp 250 Thr 255	<b>Ser 321</b> Trp 250 Thr 255
—	Leu 240	Leu 240	Leu 240	—	Leu 240
Pro 307	—	Pro 307	—	<b>Pro 307</b>	Pro 307
Gln 133 Phe 34	Gln 133 Gln 133 Phe 34	—	Gln 133 Phe 34	—	Gln 133 Phe 34
Trp 40	Trp 40	—	Trp 40	Trp 40	—
<b>Asp 285</b> Gln 349 <b>Gln 350</b> Phe 352 Pro 283 Thr 271  <b>Thr 288</b> <b>Val 284</b>  Val 318	—	Asp 285 Gln 349 Gln 350 Phe 352 <b>Pro 283</b> <b>Thr 271</b> Thr 288 Val 284 Val 318	—	<b>Asp 285</b> Gln 349 <b>Gln 350</b> Phe 352 <b>Pro 283</b> <b>Thr 271</b> <b>Thr 288</b> Val 284 Val 318	—
—	Asn 26 Leu 172 Lys 344 Ser 342 Thr 248	—	Asn 26 Leu 172 Lys 344 Ser 342 Thr 248	—	<b>Asn 26</b> Leu 172 Lys 344 <b>Ser 342</b> Thr 248
<b>Ser 514</b>	Ser 514	—	<b>Ser 514</b>	—	—
Ala 257	Ala 257	—	—	—	Ala 257
Asn 61 Phe 181	—	—	Asn 61 Phe 181	Asn 61 Phe 181	—
Asp 282 <b>Met 81</b>	—	Asp 282 <b>Met 81</b>	—	—	—
<b>Asp 37</b> <b>Glu 258</b> <b>Gly 68</b> Met 289 Pro 107 <b>Tyr 105</b>	—	—	Asp 37 Glu 258 Gly 68 Met 289 Pro 107 Tyr 105	—	—
Gln 184 Asp 176	—	—	—	<b>Gln 184</b> Asp 176	—
Met 237	—	—	—	—	<b>Met 237</b>
—	Val 234	Val 234	—	—	—

Окончание табл. 24

1	2	3	4	5	6
—	Gln 135 Glu 246 Gly 196	—	Gln 135 Glu 246 <b><u>Gly 196</u></b>	—	—
—	Ser 324	—	—	Ser 324	—
—	Arg 295 Asp 310 Gln 355 Pro 356 Thr 340 Thr 358 Tyr 322	—	—	—	Arg 295 Asp 310 Gln 355 <b><u>Pro 356</u></b> <b><u>Thr 340</u></b> <b><u>Thr 358</u></b> Tyr 322
—	—	Ile 270	—	Ile 270	—
—	—	—	Glu 243 Gly 299 Leu 341	—	Glu 243 Gly 299 Leu 341
—	—	—	—	Val 304	Val 304
<b>«Уникальные» аминокислоты</b>					
Ala 84 Lys 345	Ala 389 Arg 393 Arg 462 Asn 325 Gln 476 Lys 332 Ser 309 Thr 130 Thr 230 Thr 388 Val 353 Val 513	His 351 Leu 343	Asn 108 Glu 173 Gly 195 Gly 244 Thr 110 Thr 169 Trp 188	<b><u>Asp 466</u></b> <b><u>Thr 100</u></b>	Gln 38 Gly 264 Thr 330

В процессе сорбции фермента на матрицах АВ-17-2П, ВИОН АН-1, ВИОН КН-1, КОПАН-90 и хитозана принимает участие 7 общих аминокислотных остатков: Arg 312, Asn 265, Asn 320, Asp 298, Gln 59, Phe 180, Phe 238, причем Arg 312 входит в состав первой и третьей точек связывания инулиназы с матрицей АВ-17-2П, второй и четвертой точек для волокна КОПАН-90, а Asn 265 – первой и второй точек для ВИОН АН-1, первой и третьей точек для КОПАН-90.

При иммобилизации инулиназы для носителей – КУ-2, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана – общим является остаток His 33, для

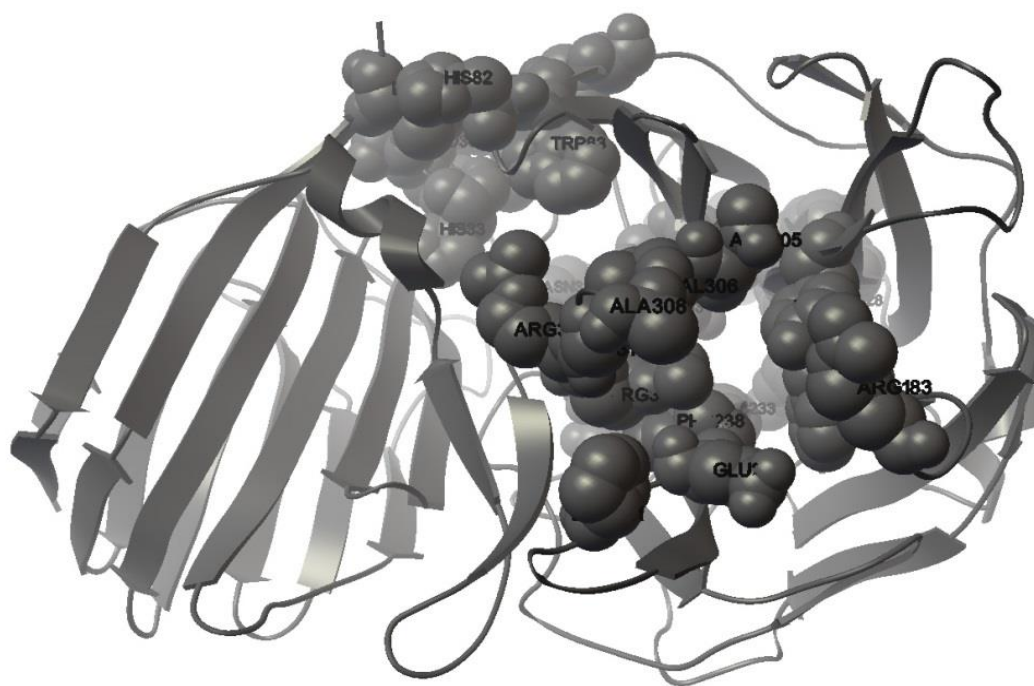
КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана – Arg 183, для матриц КУ-2, ВИОН КН-1, АВ-17-2П, ВИОН АН-1, КОПАН-90 – остатки Ala 308, Arg 29, His 85, Pro 241, Trp 67, причем у ВИОН АН-1 Pro 241 входит в состав третьего и пятого сайтов связывания, а у АВ-17-2П, кроме Pro 241, в их состав включен Ala 308.

Остатки Asp 285, Gln 349, Gln 350, Phe 352, Pro 283, Thr 271, Thr 288, Val 284 составляют 80 % и более от числа аминокислот при четвертом, третьем и втором взаимодействии инулиназы с матрицами КУ-2, ВИОН КН-1 и КОПАН-90 соответственно. Остатки Asp 310, Gln 355, Pro 356, Thr 340, Thr 358 составляют 29 % от числа аминокислот при пятом взаимодействии фермента с АВ-17-2П и 42 % в четвертой контактной точке энзима с матрицей КОПАН-90.

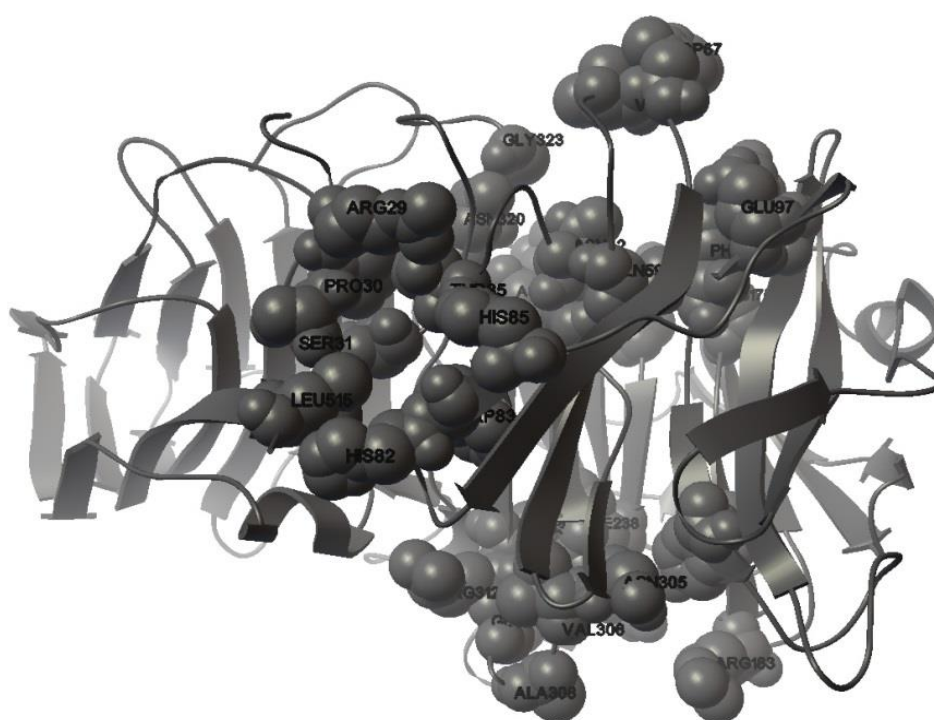
Носители КУ-2, ВИОН КН-1 и хитозан имеют лишь по два «уникальных» (встречающихся в сайтах связывания фермента и носителей только при сорбции на их матрицах) аминокислотных остатка – Ala 84 и Lys 345, His 351 и Leu 343, Asp 466 и Thr 100 соответственно.

На рис. 83 представлены наиболее вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой инулиназы, включающие в себя аминокислотные остатки, которые входят в состав контактных областей при сорбции фермента минимум на пяти из шести исследуемых нами носителей. Наиболее «крупные» из них следующие: 1) Arg 29, Pro 30, Ser 31, His 33, Thr 35; 2) His 82, Trp 83, His 85; 3) Glu 233, Phe 238, Glu 239, Pro 241; 4) Asn 305, Val 306, Ala 308, Gly 311, Arg 312, Arg 313. «Мелкие» сайты связывания включают по 1-2 аминокислотных остатка: Asn 42 и Glu 43, Gln 59, Val 66 и Trp 67, Glu 97 и Phe 99, Tyr 104, Tyr 128, Arg 175, Phe 180, Arg 183, Asn 265, Asp 298, Asn 320, Gly 323, Leu 515.





А



Б

Рис. 83. Вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* (атомы аминокислотных остатков, входящих в их состав, обозначены шарами):

Б – повернутая на 90 градусов вокруг горизонтальной оси форма А

Ряд аминокислотных остатков на поверхности инулиназы входит в состав сайтов связывания при сорбции фермента сразу на всех исследуемых нами носителях – катионитах, анионитах, амфолите и хитозане. Кроме того, некоторые остатки входят в состав нескольких контактных точек фермента с носителем, причем чаще это первый-второй и четвертый-пятый пары контактов. В расчетных данных при формировании практически всех комплексов инулиназы с носителями значительную роль играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и водородные связи. Хитозан образует с инулиназой наибольшее количество водородных связей из исследуемых нами носителей. Анионообменная смола АВ-17-2П – единственный из исследуемых полимеров, который формирует с инулиназой только ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Звенья полимерных носителей образуют связи и взаимодействия с другими звеньями своей матрицы.

Представлены наиболее вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой инулиназы, что позволит в дальнейшем осознанно выбирать матрицу с центрами адсорбции фермента вдали от его активного центра или вблизи него (в зависимости от задач исследователя), но при этом существенно не изменяя пространственную ориентацию отвечающих за катализ аминокислотных остатков.

Приведенные материалы могут быть использованы для более глубокого изучения молекулярных механизмов взаимодействия инулиназы с матрицей ряда синтетических ионитов и природных полимеров; их необходимо принимать во внимание при разработке новых способов оценки и регулирования структурного состояния белковых молекул в условиях их иммобилизации на различных типах носителей.

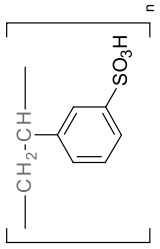
#### 5.4. Последовательный докинг для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на полимерных матрицах

Аналогичные описанным выше серии расчетов были проведены нами для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, пространственная структура которой была реконструирована на основе структуры инвертазы из *Saccharomyces cerevisiae* (PDB-ID: 4EQV) (табл. 25, рис. 84-119).

Из рис. 84-89 следует, что для всех пяти точек контакта инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (как и у инулиназы из *Aspergillus ficuum*) с матрицей КУ-2 водородные связи образуются только между сульфогруппами носителя и молекулой белка, не затрагивая прочие структуры катионита. Распределение положительно заряженных аминокислотных остатков между контактными участками молекулы дрожжевой инулиназы и матрицей катионообменной смолы КУ-2 отличается от такового у грибного фермента: в формировании всех пяти сайтов связывания принимают участие лишь пять положительно заряженных аминокислотных остатков (Arg 135, Lys 146, Arg 181, Lys 244, Arg 303), тогда как у инулиназы из *Aspergillus ficuum* их восемь (Arg 29, His 33, His 82, His 85, Arg 175, Arg 183, Arg 313, Lys 345).

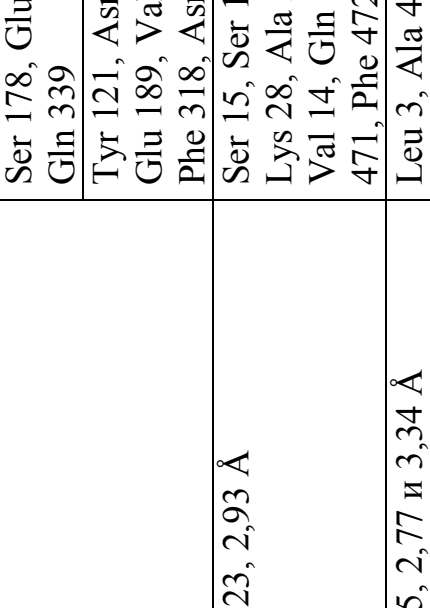
Между матрицей анионита АВ-17-2П и инулиназой из *Kluyveromyces marxianus* мы наблюдаем наличие лишь ван-дер-ваальсовых взаимодействий и отсутствие водородных связей (рис. 90-95), как в случае с грибным энзимом. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки также превалируют при первом взаимодействии фермента с носителем, по сравнению с другими контактными точками. В первом сайте связывания участвуют Asp 53, Asp 182, Glu 238, что составляет 19 % от общего числа аминокислотных остатков в контактной области. В формировании второго, третьего и четвертого взаимодействий принимают участие лишь по одному отрицательно заряженному остатку – Asp 325, Glu 238 и Asp 306 соответственно.

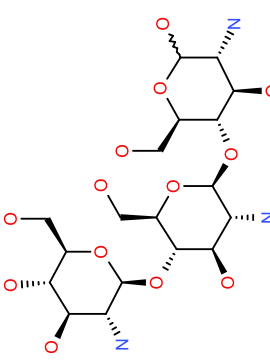
Аминокислотные остатки инулиназы из *Cluiveromucos tarhianus*, формирующие связи и взаимодействия с носителями

Носитель, структура элементарного звена	Номер сайта связывания	Аффинность, ккал/моль	Аминокислотные остатки, формирующие	
			водородные связи, их длина	ван-дер-ваальсовы взаимодействия
1 	2	3	4	5
КУ-2, катионит, смола	1	-8,5	Met 1, 3,03 Å Ser 145, 3,07 Å Gln 236, 3,11 Å Glu 238, 2,83 Å	Leu 3, Ala 16, Ile 78, Trp 79, Thr 81, Asp 109, Phe 113, Lys 146, Gly 147, Arg 181, Asn 273, Pro 274, Trp 335, Gln 339
	2	-8,8	Asn 122, 2,81 и 3,11 Å Lys 244, 3,05 Å Asp 325, 2,76 Å	Ile 119, Tyr 121, Arg 135, Phe 186, Trp 187, Glu 189, Val 243, Phe 318, Asn 319, Thr 320, Pro 321, Val 326
	3	-7,6	Ser 362, 2,83 и 3,02 Å Gly 424, 2,95 Å Gly 459, 2,86 Å Thr 486, 2,92 Å Asn 487, 3,18 Å Val 489, 2,97 Å Ser 490, 2,94 Å Thr 493, 3,09 Å	Thr 363, Asn 364, Pro 365, Phe 422, Tyr 454, Thr 456, Asn 457, Pro 488, Tyr 492, Asn 495

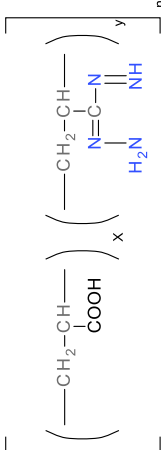
1	2	3	4	5
КУ-2, катионит, смола	4	-7,9	Phe 304, 2,93 Å Met 307, 2,75 Å	Pro 277, Leu 278, Val 282, Thr 302, Arg 303, Phe 361, Thr 363, Val 371, Ala 484, Pro 488, Thr 486, Val 517
	5	-8,4	Asp 299, 2,72 Å Asp 369, 2,93 и 2,96 Å Thr 486, 2,91 Å	Gln 301, Thr 363, Asn 364, Ser 367
АВ-17-2П, анионит, смола	1	-8,0	отсутствуют	Met 1, Leu 3, Ser 17, Asn 52, Asp 53, Trp 79, Phe 113, Ser 114, Ser 145, Asp 182, Glu 238, Asn 273, Pro 274, Trp 335, Gln 336, Gln 339
	2	-6,9		Tyr 121, Asn 122, Lys 184, Phe 186, Trp 187, Glu 189, Val 243, Lys 244, Thr 316, Phe 317, Phe 318, Asn 319, Thr 320, Pro 321, Asp 325
	3	-6,4		Met 1, Leu 3, Thr 81, Asp 109, Gly 147, Arg 181, Gln 236, Glu 238, Asn 273
	4	-6,1		Leu 278, Val 282, Gln 301, Thr 302, Arg 303, Phe 304, Asp 306, Met 307, Phe 361, Thr 363, Asn 480, Gln 482, Leu 483, Ala 484, Thr 486
	5	-6,2		Thr 363, Asn 364, Tyr 454, Thr 456, Gly 459, Phe 497, Thr 486, Asn 487, Pro 488, Val 489, Ser 490, Asn 495

1	2	3	4	5
ВИОН КН-1, катионит, ВОЛОКНО $\left[ \begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}- \\   \\ \text{COONa} \end{array} \right]_n$	1	-5,6	Ala 251, 3,24 Å Ser 255, 2,99 Å Lys 359, 2,93 Å Ser 367, 3,05 и 3,17 Å Ala 368, 2,86, 3,08 и 3,09 Å Val 370, 3,01 Å	Tyr 247, Ser 249, Val 250, Ser 254, Asp 360, Asp 369
	2	-6,0	Ser 15, 2,89 Å Ser 17, 3,03 Å Ile 19, 3,02 Å	Tyr 21, Lys 22, Leu 37, Val 14, Gln 340, Pro 342, Arg 347, Ile 470, Pro 471, Phe 472, Glu 475
	3	-5,8	Glu 238, 3,15 Å	Asn 52, Asp 53, Gln 71, Trp 79, Phe 113, Ser 114, Ser 145, Gln 150, Cys 239, Tyr 312, Trp 335
	4	-5,6	Tyr 59, 2,85 и 2,99 Å Trp 66, 2,90 и 3,18 Å Lys 91, 2,95 Å Asp 92, 2,97 Å Pro 321, 2,97 Å Glu 323, 2,99 Å	Glu 64, Leu 93, Asn 322, Val 377, Leu 378, Asn 379
	5	-5,5	Tyr 285, 3,07 и 3,11 Å Phe 304, 2,77 Å Thr 363, 2,89 Å	Arg 303, Leu 305, Met 307, Phe 361, Val 371, Thr 486, Pro 488, Asn 516, Val 517

1	2	3	4	5
<p><b>ВИОН АН-1, анионит,</b> <b>ВОЛОКНО</b></p> 	1	-7,8	отсутствуют	Ala 16, Ser 17, Asn 52, Ile 78, Trp 79, Phe 113, Ser 114, Ser 145, Lys 146, Gly 147, Gln 150, Ser 178, Glu 238, Asn 273, Trp 335, Gln 336, Gln 339
	2	-7,3		Tyr 121, Asn 122, Lys 184, Phe 186, Trp 187, Glu 189, Val 243, Val 244, Pro 246, Phe 317, Phe 318, Asn 319, Asp 325, Val 326
	3	-7,4	Arg 23, 2,93 Å	Ser 15, Ser 17, Ile 19, Tyr 21, Lys 22, Ser 27, Lys 28, Ala 29, Phe 35, Ser 36, Leu 37, Val 14, Gln 340, Pro 342, Arg 347, Ile 470, Pro 471, Phe 472, Thr 527
	4	-6,5	Tyr 5, 2,77 и 3,34 Å Asn 73, 3,22 Å	Leu 3, Ala 4, Ser 6, Leu 7, Ala 75, Ala 76, Ile 78, Trp 79, Gly 80, Thr 81, Pro 82, Asp 108, Asp 109
	5	-5,5	Asn 457, 3,00 Å	Phe 422, Gly 424, Thr 456, Pro 488, Ser 490, Asn 495, Pro 365, Tyr 454, Gly 458, Gly 459, Thr 486, Asn 487, Val 489
Хитозан	1	-7,8	Ser 254, 2,10 и 2,86 Å Ser 255, 2,8 и 2,86 Å Asp 360, 2,84 Å Ser 367, 2,77 и 3,30 Å Ala 368, 2,76, 3,32 и 2,86 Å Asp 369, 3,05 Å	Tyr 247, Val 250, Asp 252, Ser 253, Ile 298, Asp 299, Lys 359, Val 370

1	2	3	4	5
<p>Хитозан</p> 	2	-6,5	<p>Ser 36, 2,87 Å            Leu 37, 2,70 Å,            Arg 39, 3,27 Å            Pro 40, 3,03 Å            Thr 45, 2,70 и 2,94 Å            Trp 96, 2,70 Å            Asp 98, 3,15 Å            Asp 344, 3,04 Å</p>	<p>Thr 34, Phe 35, His 43, Pro 345, Trp 346</p>
	3	-6,4	<p>Tyr 454, 3,13 Å            Thr 456, 2,88 и 3,00 Å            Asn 457, 3,19 Å            Gly 458, 3,08 Å            Gly 459, 2,77 Å            Thr 486, 2,85 и 3,33 Å            Asn 487, 3,13 Å            Asn 495, 3,17 Å</p>	<p>Phe 422, Ser 490, Phe 497</p>
	4	-6,5	<p>His 48, 3,33 Å            Pro 74, 2,80 и 2,92 Å            Ala 75, 2,96 и 3,12 Å            Pro 345, 2,69 Å</p>	<p>Ser 6, Leu 8, Asn 32, Thr 33, Gly 49, Ala 76,            Thr 77</p>
	5	-6,6	<p>Ser 41, 3,01 и 3,04 Å            Thr 94, 3,13 Å            Ser 95, 3,27 Å            Trp 96, 2,71, 3,05 и 3,09 Å            Asn 555, 3,19 Å            Val 556, 3,09 Å</p>	<p>отсутствуют</p>



1	2	3	4	5
<p>КОПАН-90, амфолит, волокно</p> $\left[ \left( \text{---CH}_2\text{-CH---} \right)_x \left( \text{---CH}_2\text{-CH---} \right)_y \right]_n$ 	1	-5,8	<p>Glu 238, 3,26 Å          Trp 335, 3,07 Å          Gln 336, 3,16 Å</p>	<p>Asp 53, Trp 79, Phe 113, Ser 114, Arg 181, Asp 182, Gln 236, Asn 273, Pro 274, Tyr 312, Gln 339</p>
	2	-5,8	<p>Leu 37, 2,96 Å          Arg 39, 3,07 Å          Ser 41, 3,25 Å          Asp 98, 3,23 Å</p>	<p>Asn 38, Pro 40, Thr 45, Pro 46, Ser 47, Ser 95, Trp 96, Trp 346, Leu 383, Lys 505, Val 556</p>
	3	-5,7	<p>Tyr 454, 2,82 Å          Thr 456, 3,28 Å          Asn 457, 3,07 Å          Gly 459, 3,07 Å          Thr 486, 3,05 Å          Ser 490, 3,22 Å</p>	<p>Asn 364, Pro 365, Phe 422, Gly 458, Asn 487, Pro 488, Val 489, Thr 493, Asn 495, Phe 497</p>
	4	-6,0	<p>Ile 119, 2,87 Å          Trp 187, 2,99 и 3,07 Å          Glu 189, 3,08 Å          Lys 244, 3,30 Å          Ser 264, 2,95 и 3,28 Å</p>	<p>Tyr 121, Phe 186, Trp 198, Val 243, Pro 262, Phe 318, Asn 319, Lys 324, Asp 325, Val 326</p>
	5	-5,2	<p>Asn 26, 3,34 Å          Thr 35, 2,92, 3,13 и 3,16 Å          Trp 83, 3,03 и 3,33 Å          His 85, 3,29 и 3,30 Å          Glu 516, 3,08 Å</p>	<p>Arg 29, Pro 30, Tyr 32, Ser 31, His 33, Phe 34, Gln 38, His 82, Thr 330, Leu 515</p>

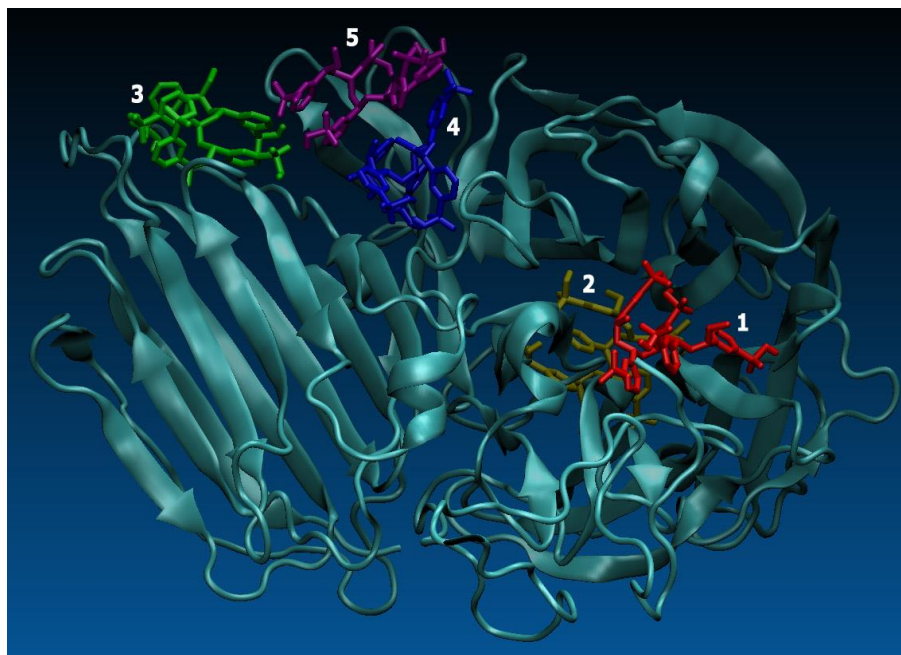


Рис. 84. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с матрицей КУ-2

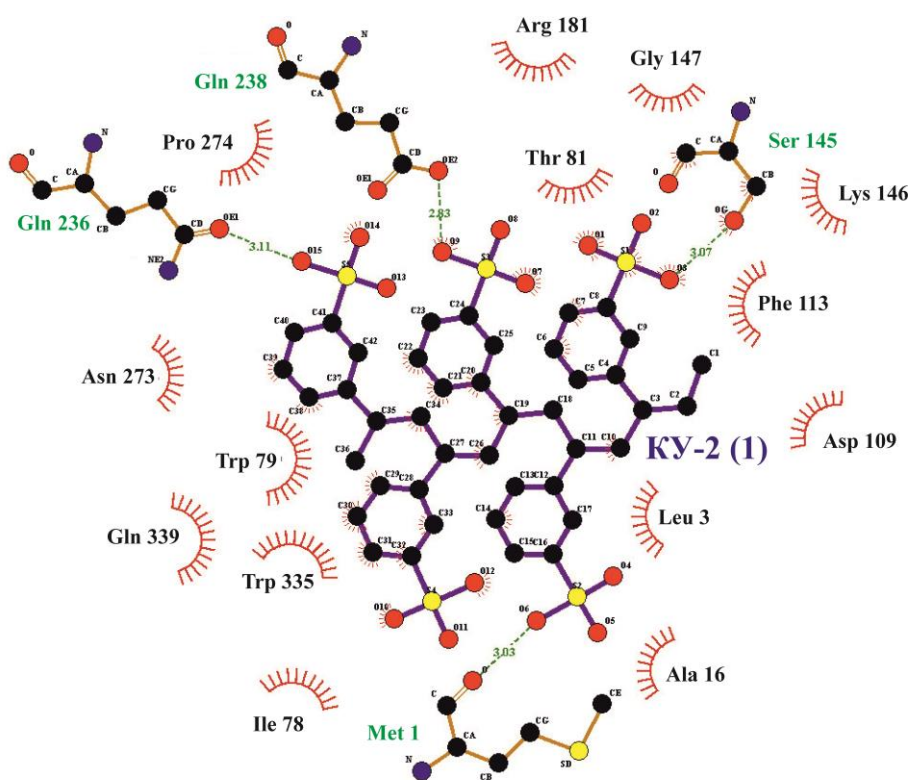


Рис. 85. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания

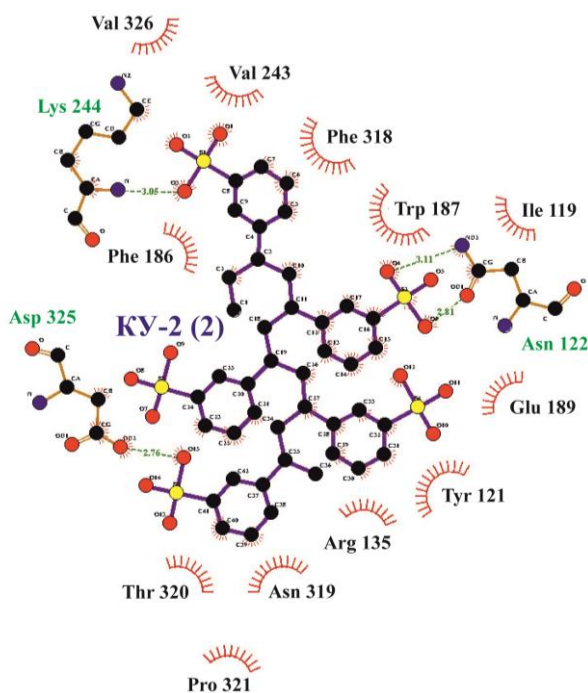


Рис. 86. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей KY-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

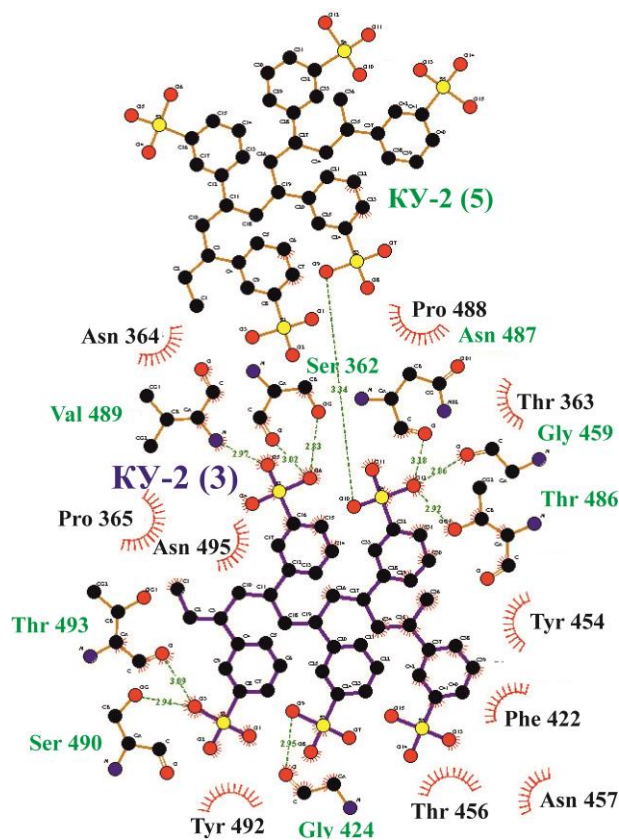


Рис. 87. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей KY-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

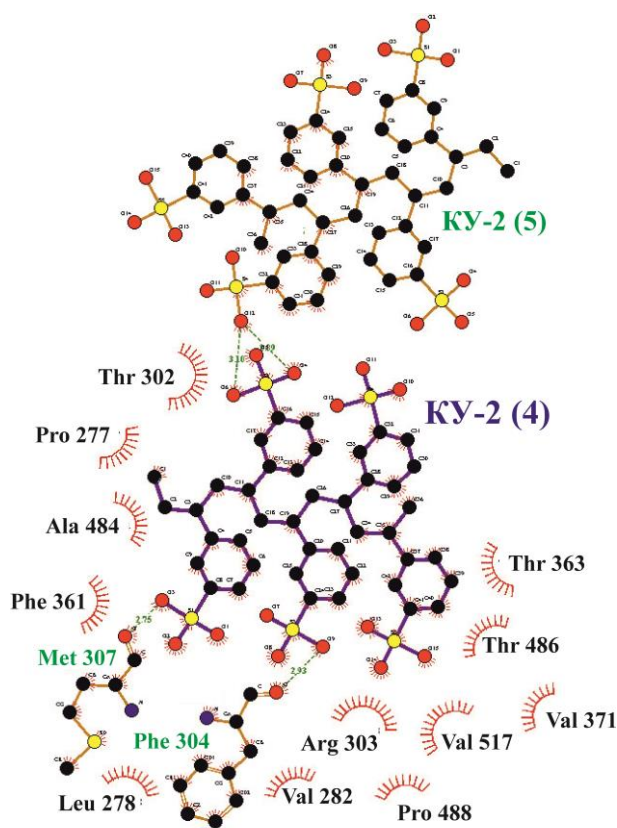


Рис. 88. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

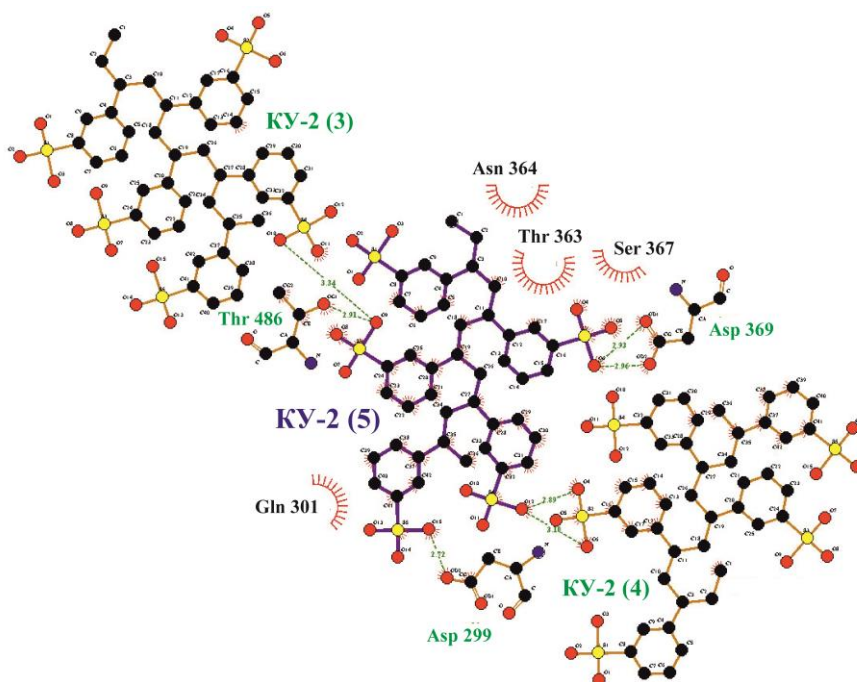


Рис. 89. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

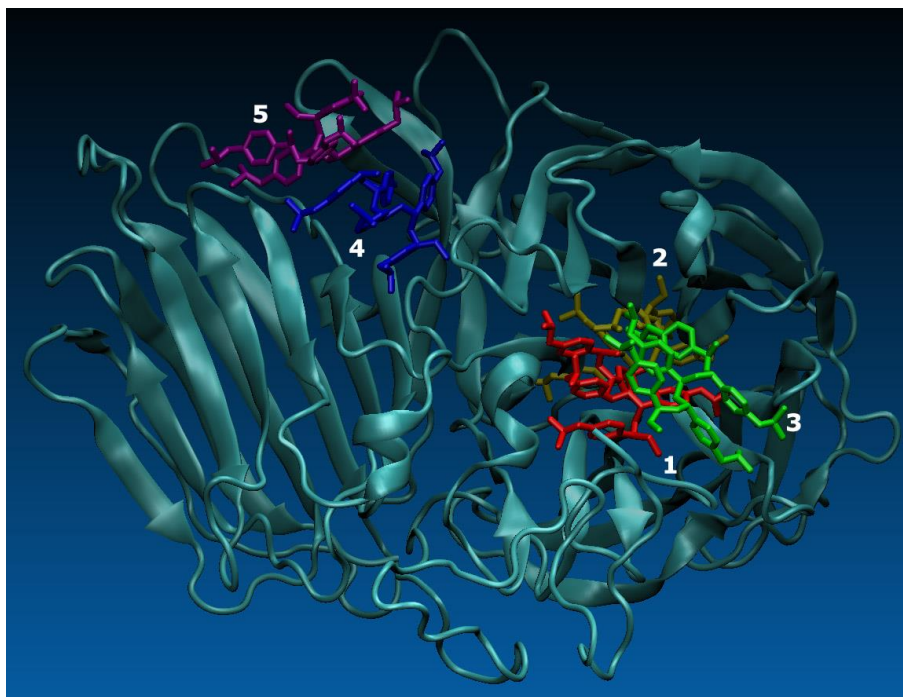


Рис. 90. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с матрицей АВ-17-2П

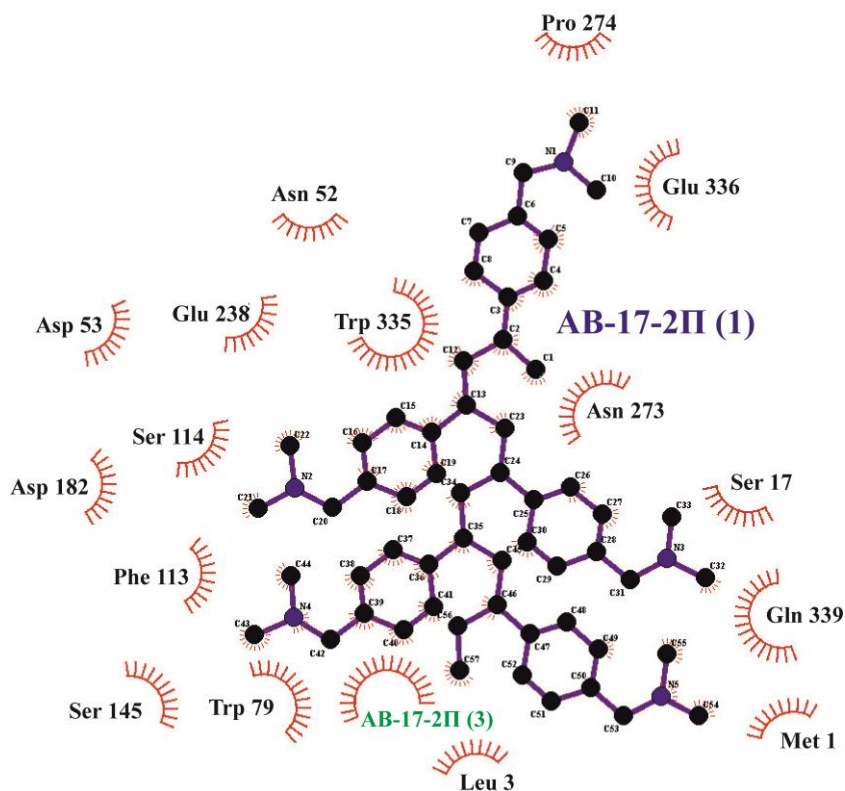


Рис. 91. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей АВ-17-2П в первом сайте связывания

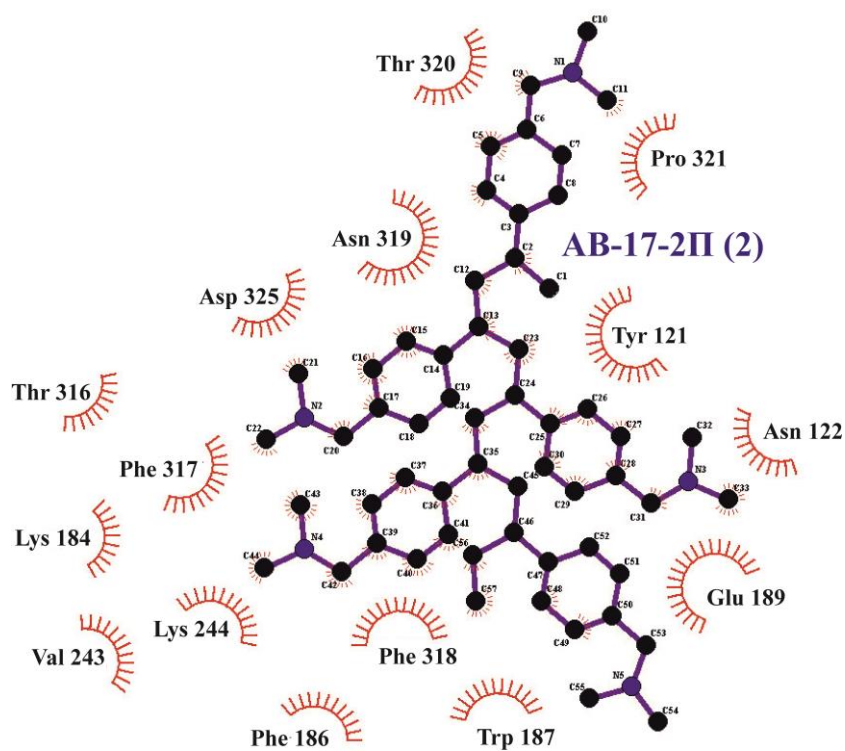


Рис. 92. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей АВ-17-2П во втором сайте связывания

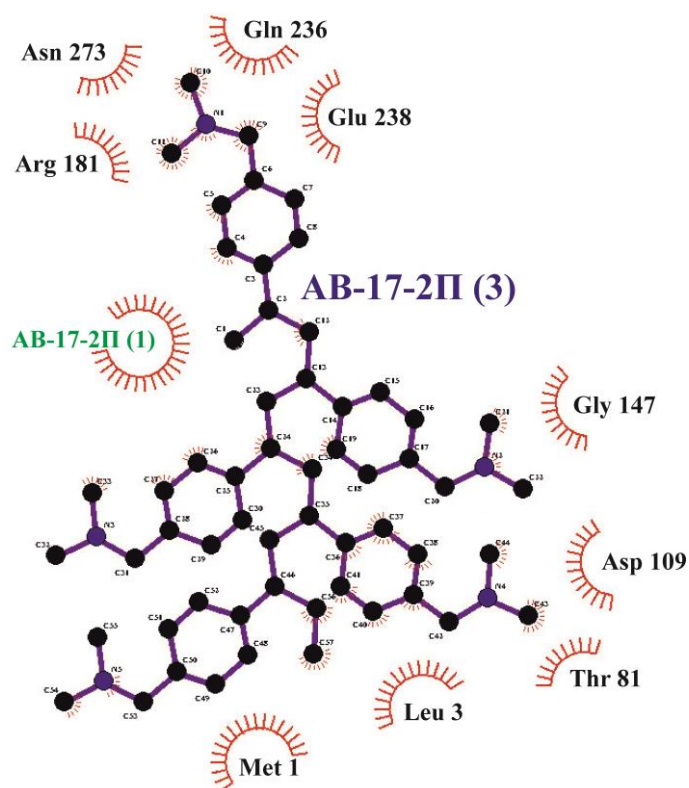


Рис. 93. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей АВ-17-2П в третьем сайте связывания

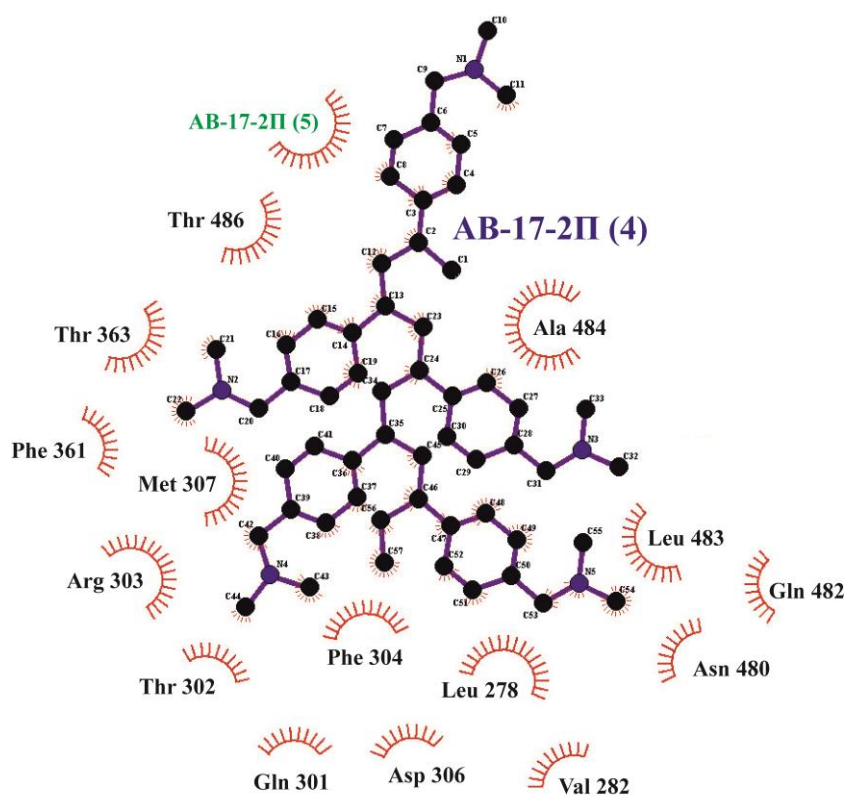


Рис. 94. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей АВ-17-2П в четвертом сайте связывания

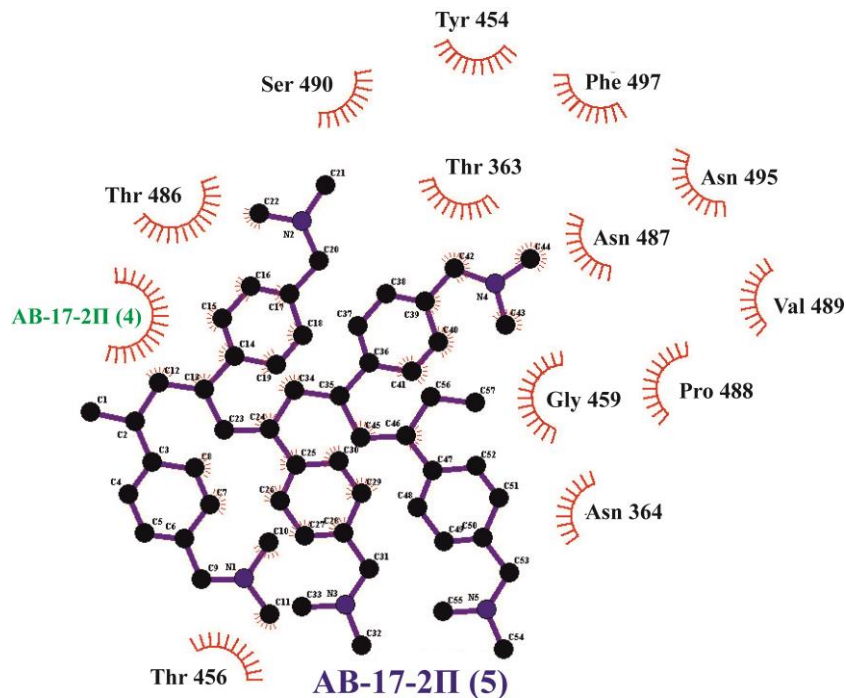


Рис. 95. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей АВ-17-2П в пятом сайте связывания

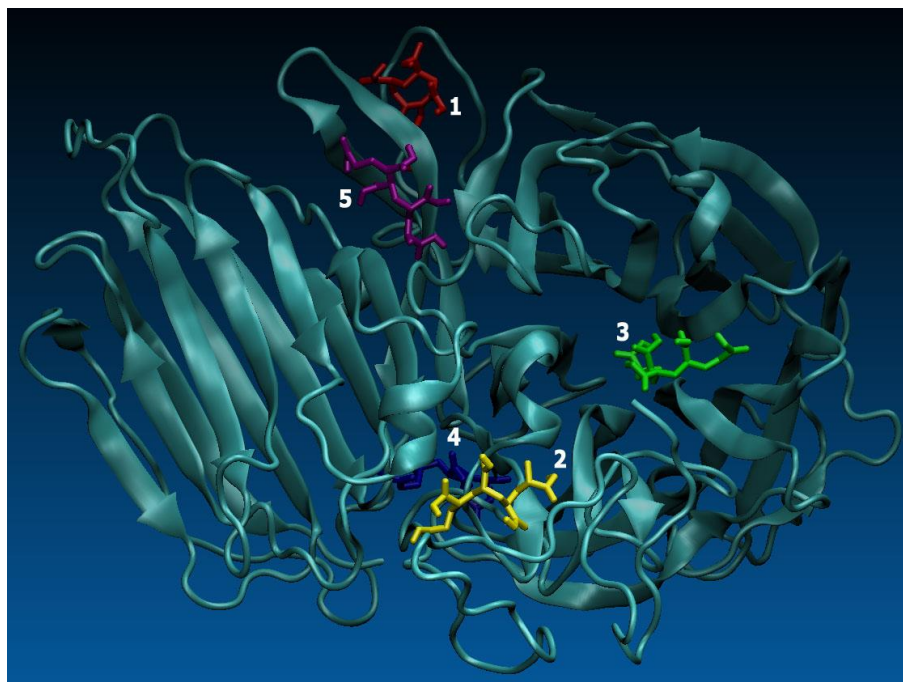


Рис. 96. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с матрицей ВИОН КН-1

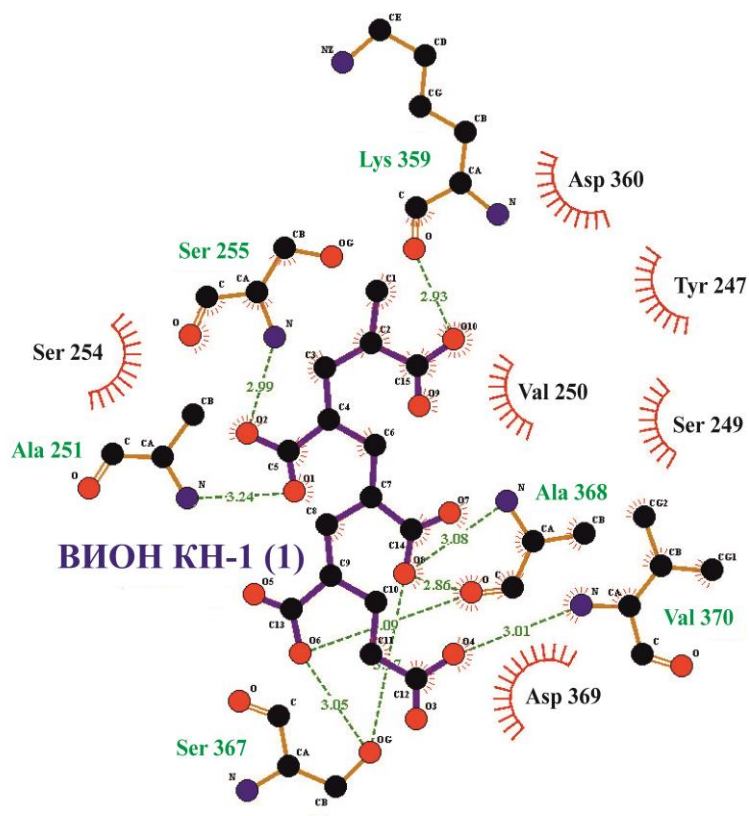


Рис. 97. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания



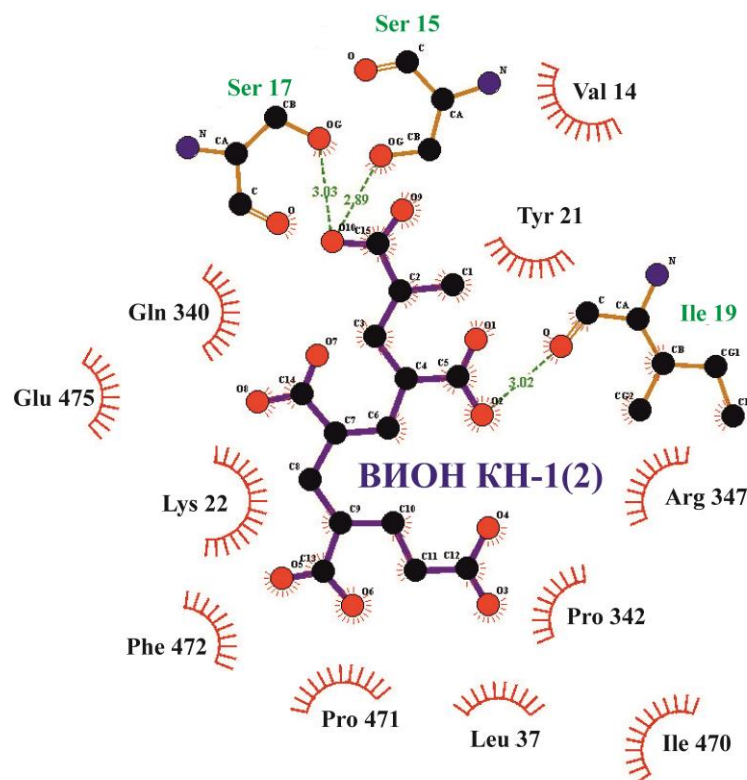


Рис. 98. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

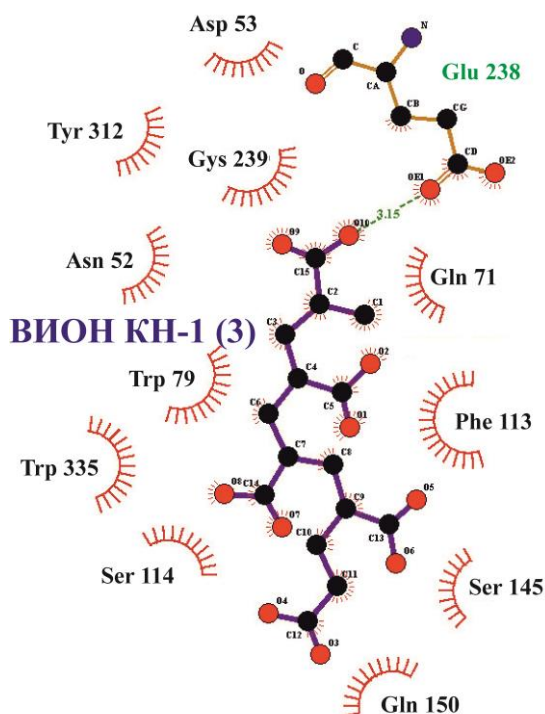


Рис. 99. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

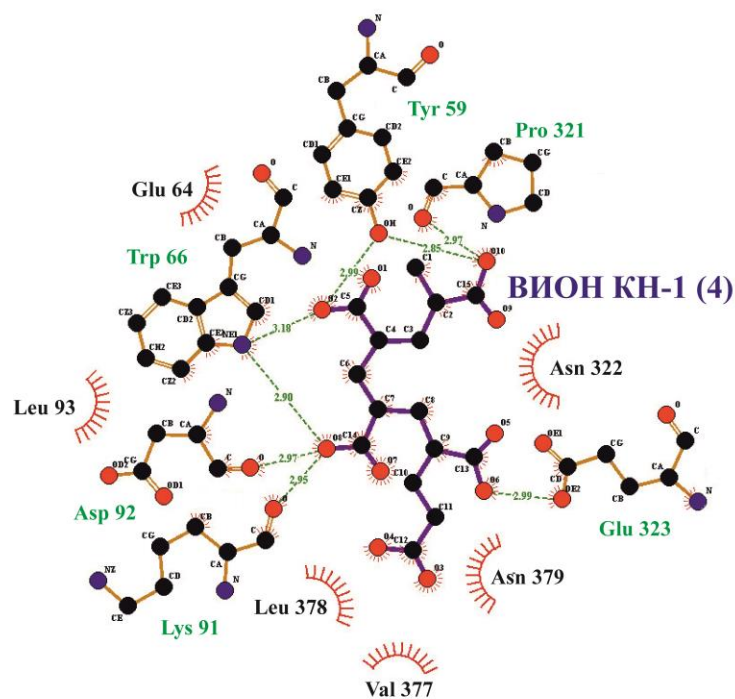


Рис. 100. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

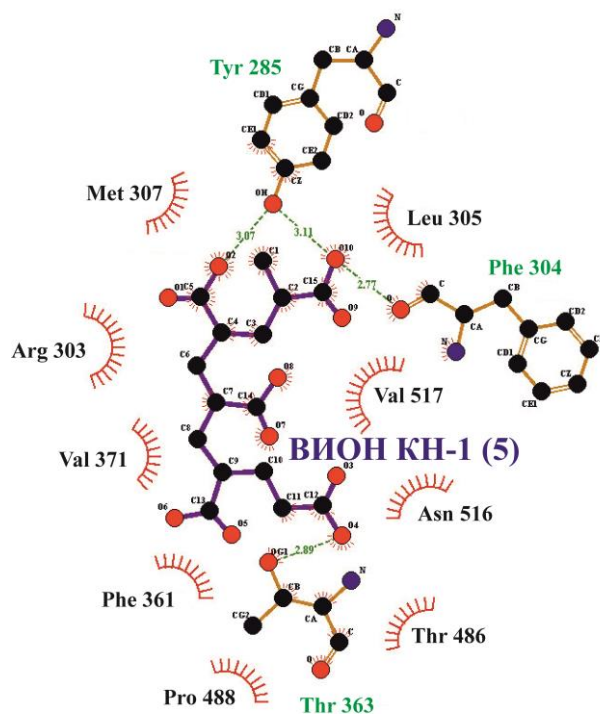


Рис. 101. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

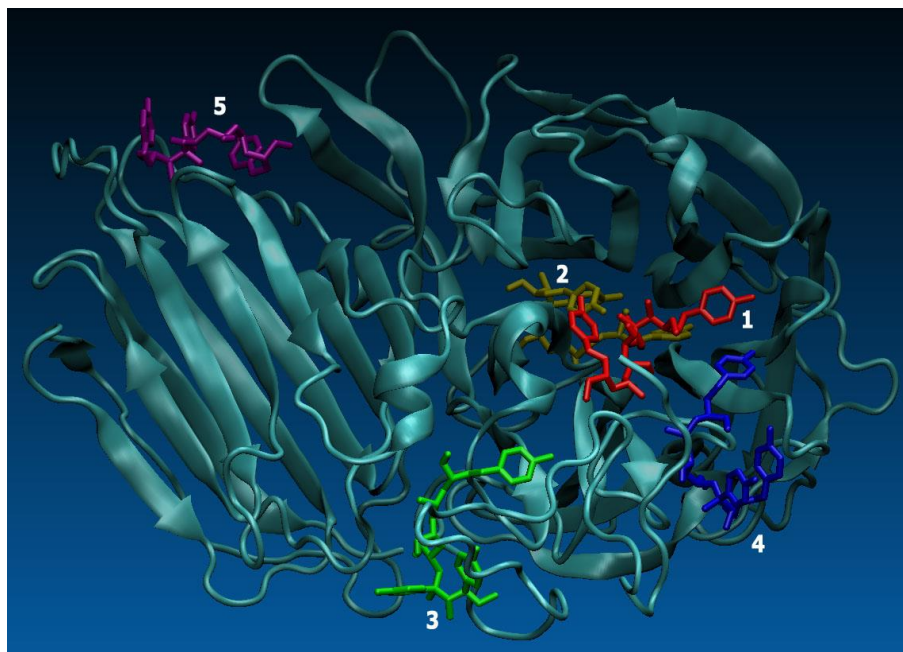


Рис. 102. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с матрицей ВИОН АН-1

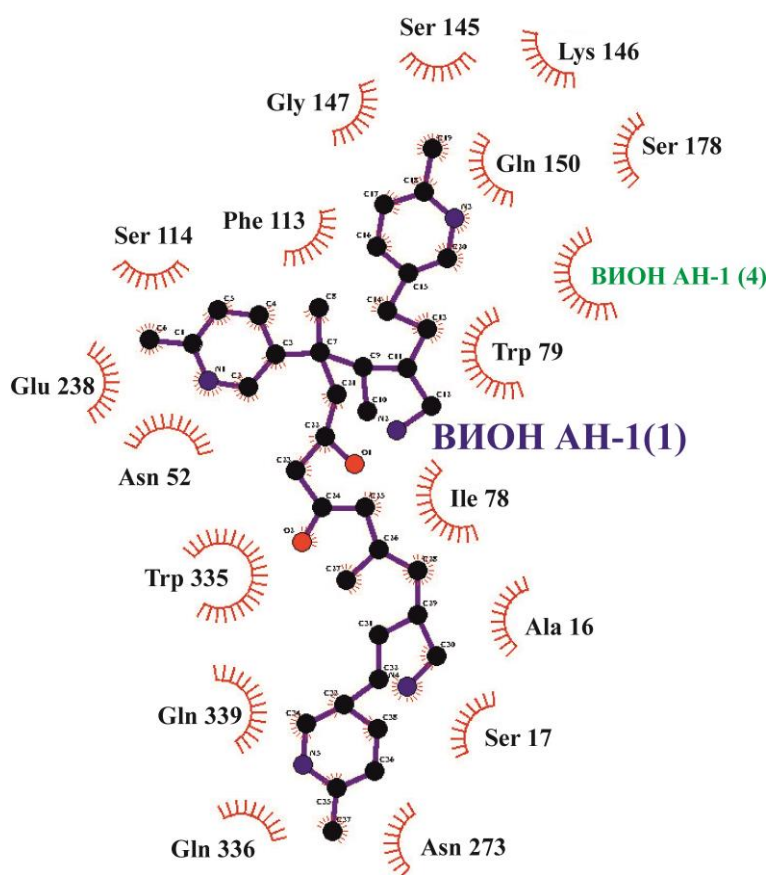


Рис. 103. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН АН-1 в первом сайте связывания

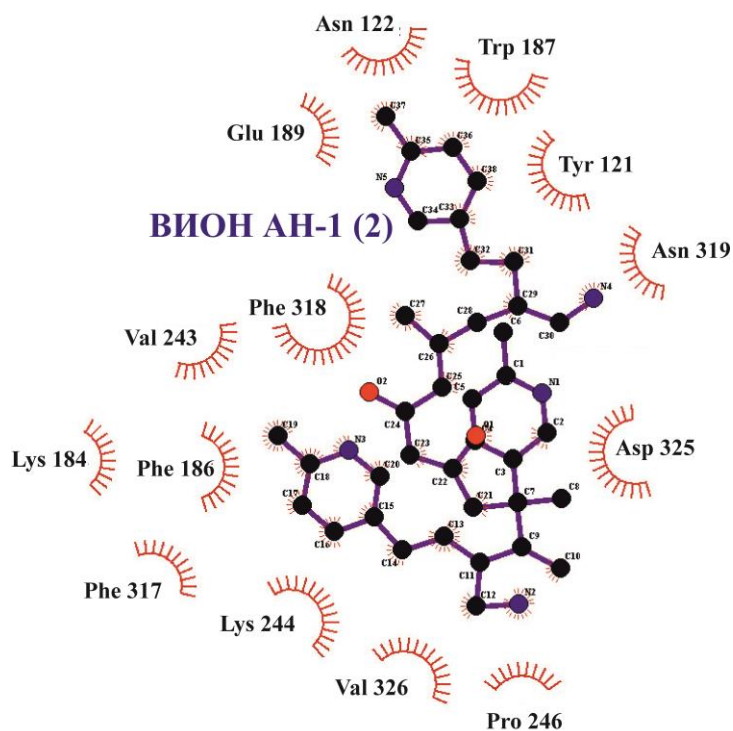


Рис. 104. Взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН АН-1 во втором сайте связывания

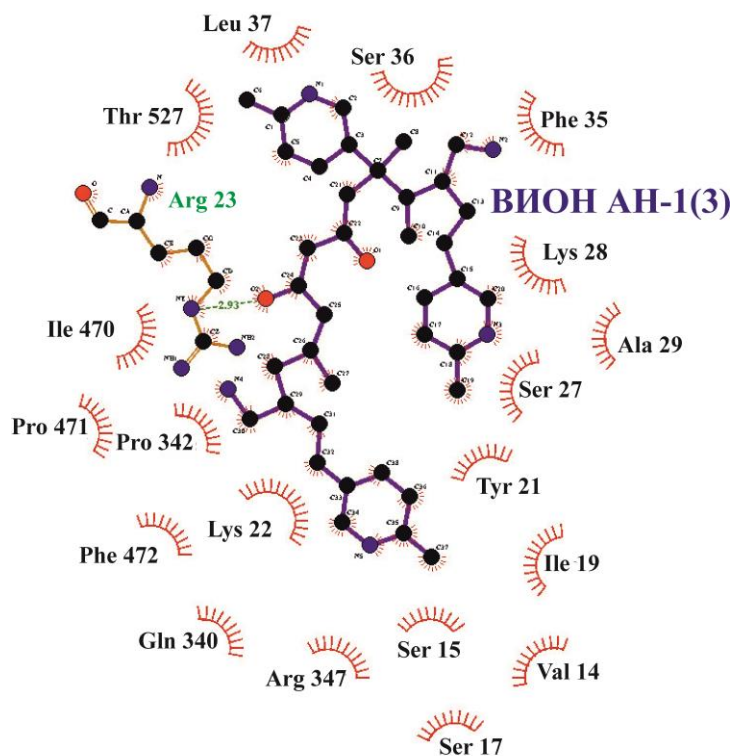


Рис. 105. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

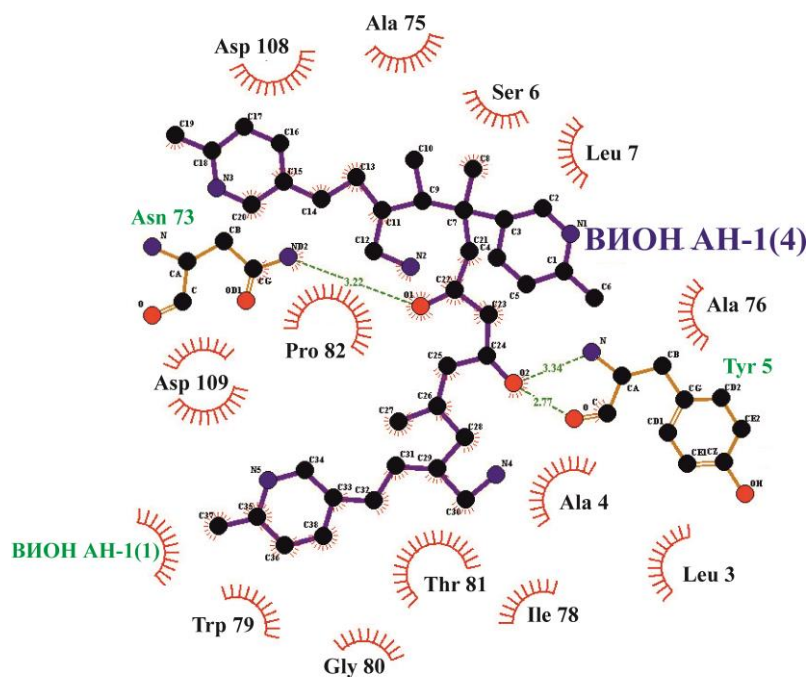


Рис. 106. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

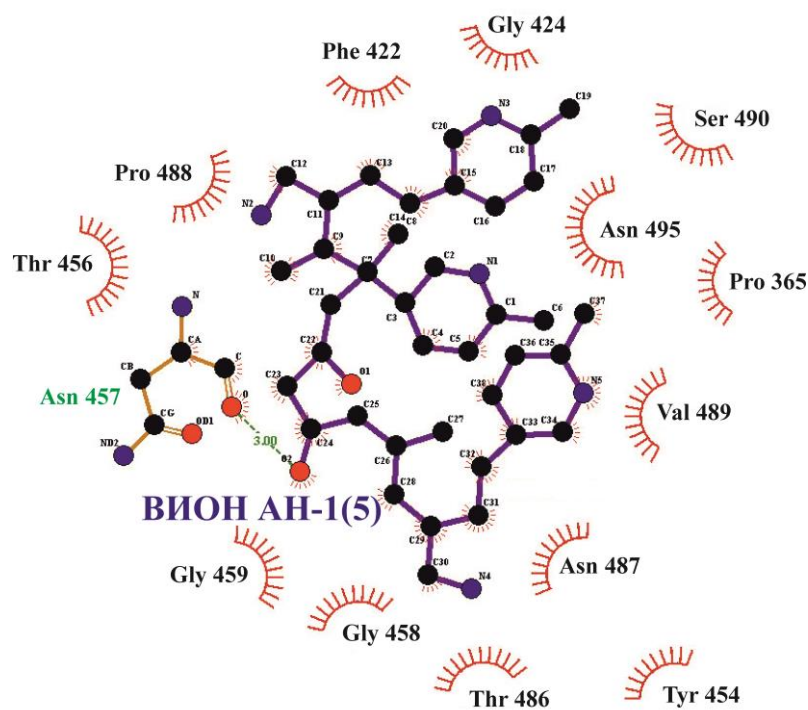


Рис. 107. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

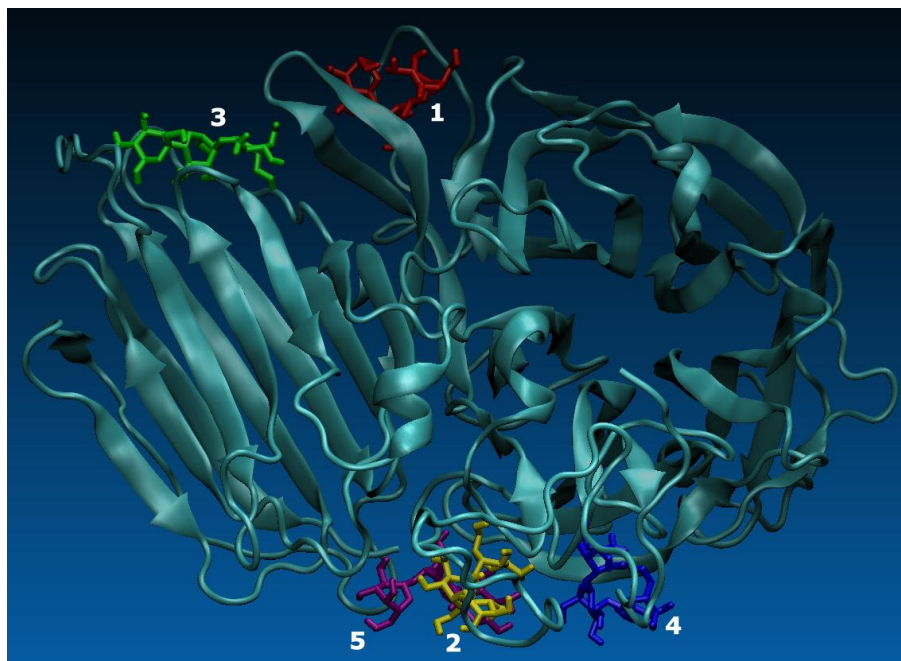


Рис. 108. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с матрицей хитозана

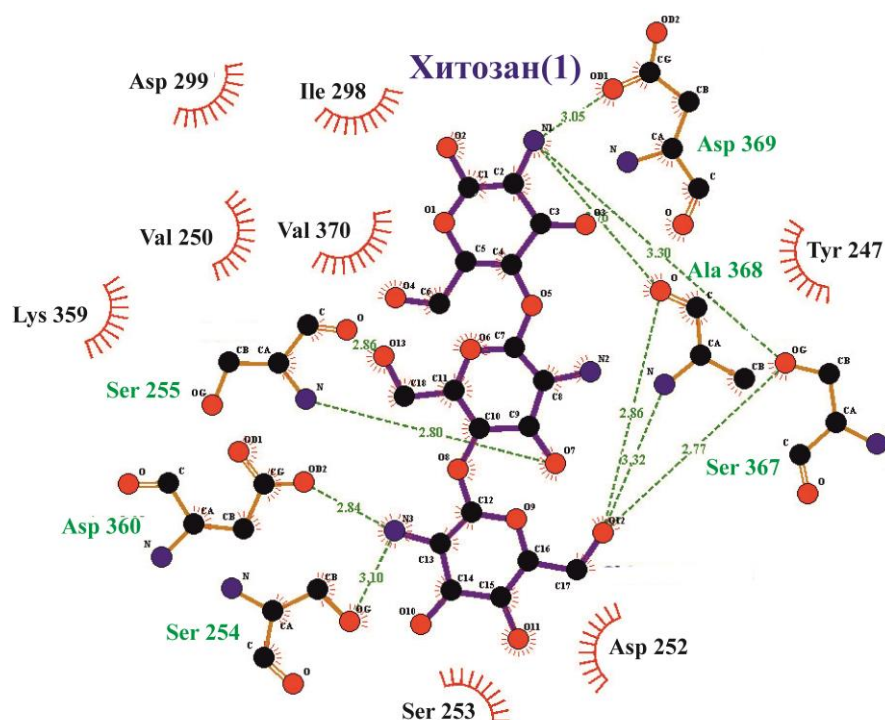


Рис. 109. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания

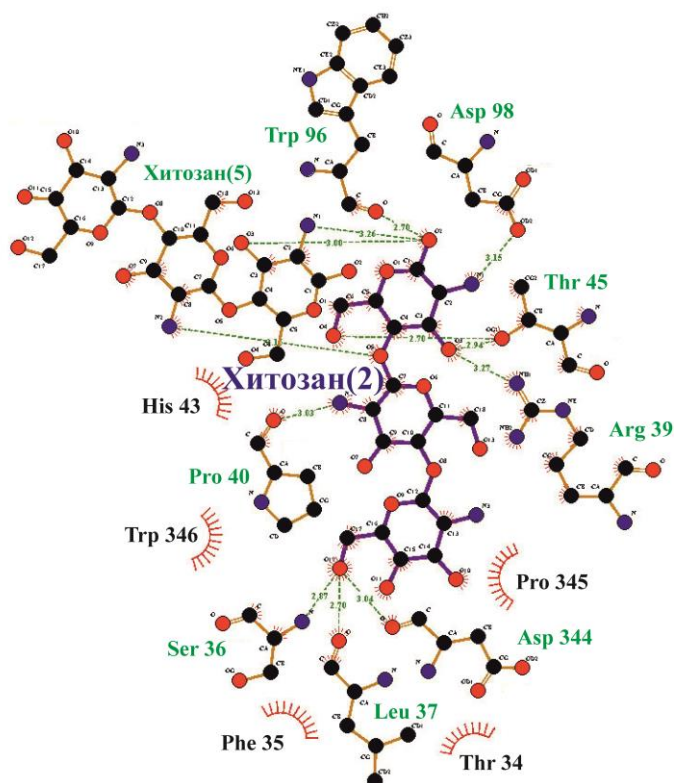


Рис. 110. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

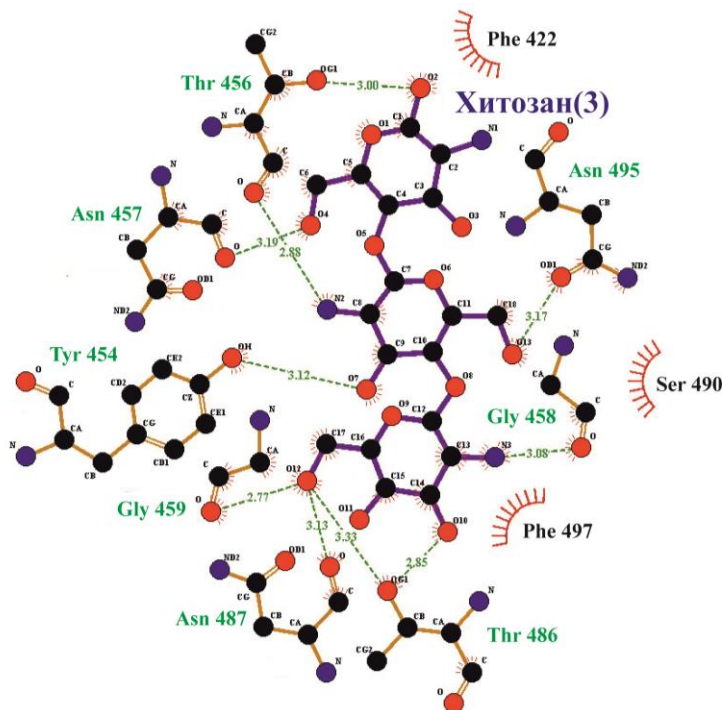


Рис. 111. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

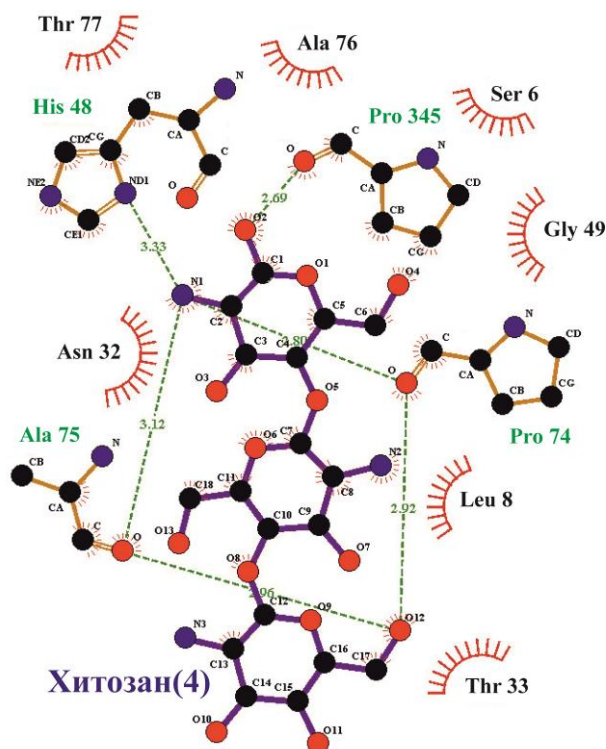


Рис. 112. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluveromyces marxianus* и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

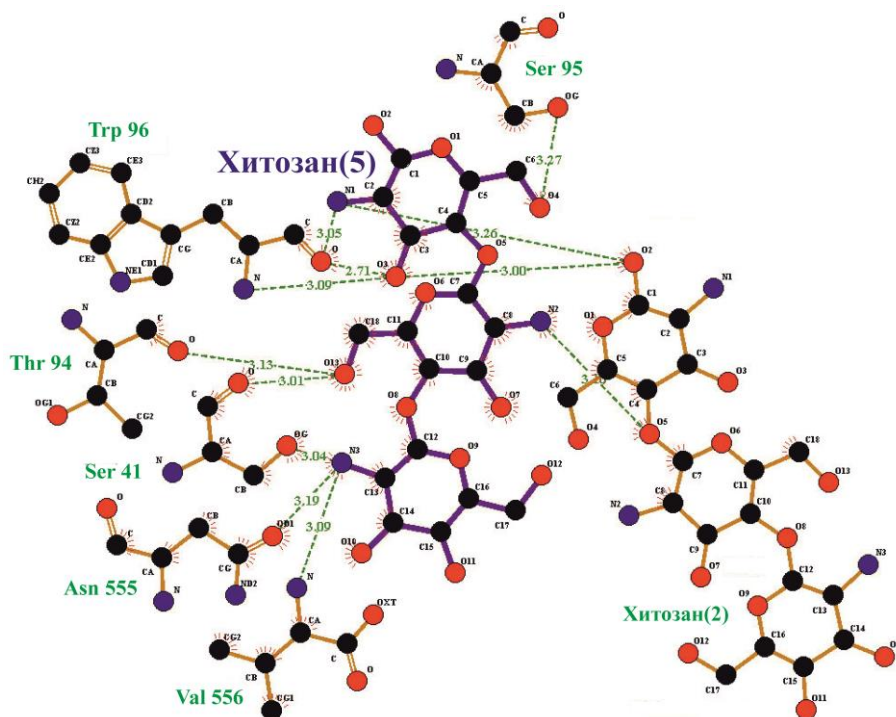


Рис. 113. Водородные связи (обозначены пунктирными линиями) между молекулой инулиназы из *Kluveromyces marxianus* и матрицей хитозана в пятом сайте связывания



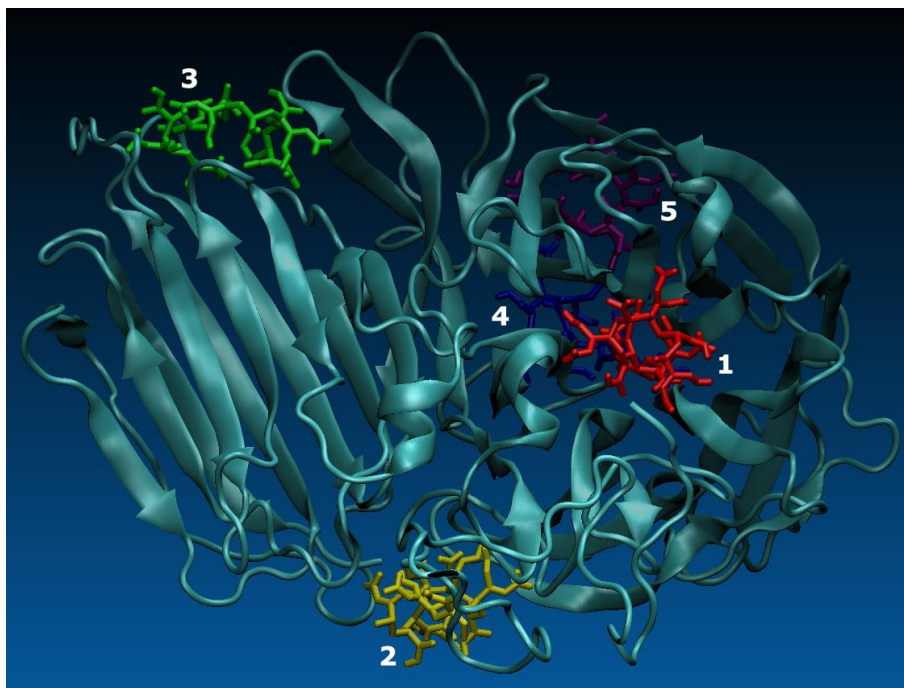


Рис. 114. Суперпозиция сайтов связывания (1-5) молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с матрицей КОПАН-90

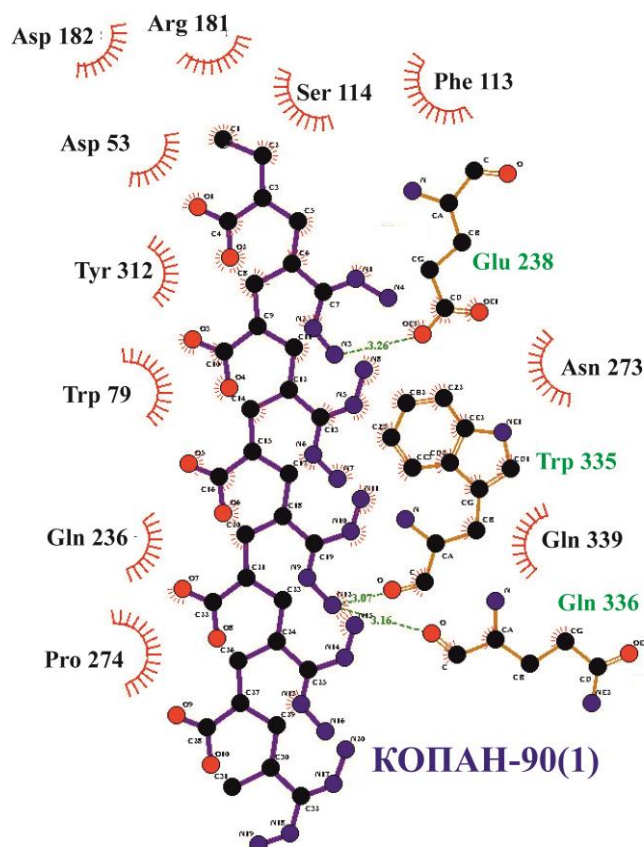


Рис. 115. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в первом сайте связывания

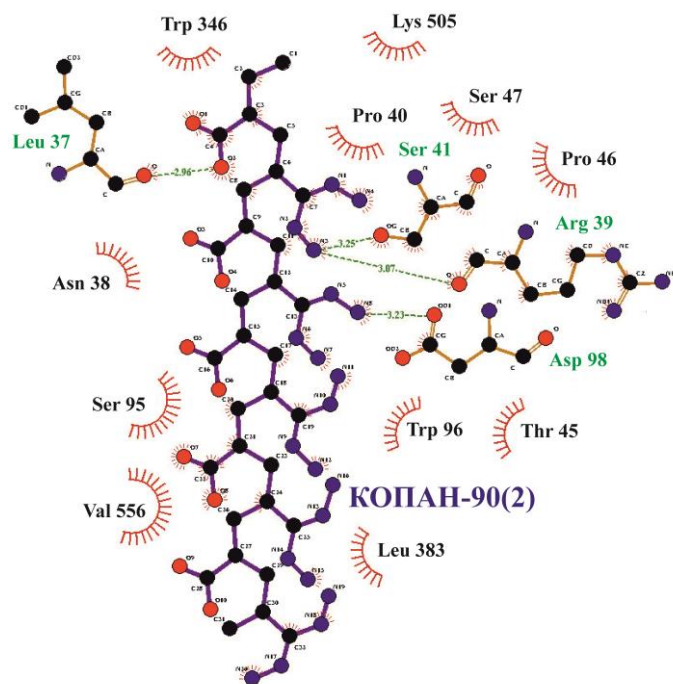


Рис. 116. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) во втором сайте связывания

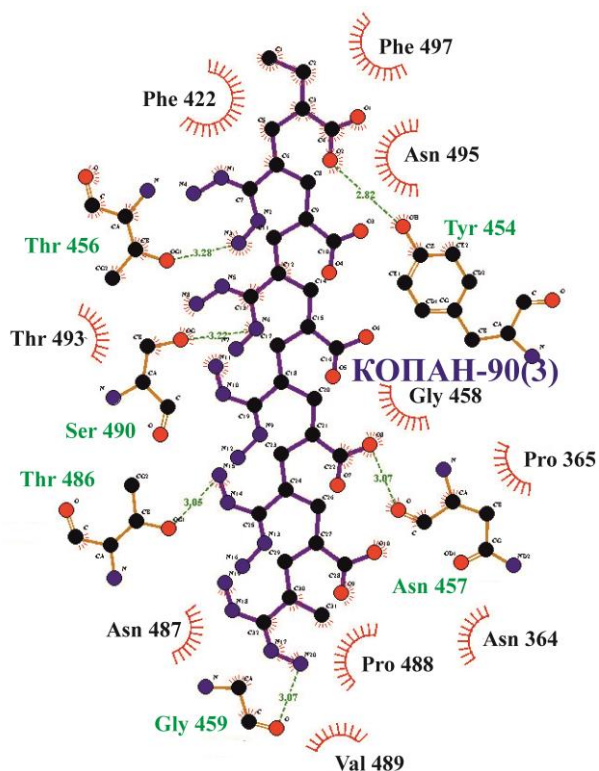


Рис. 117. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в третьем сайте связывания

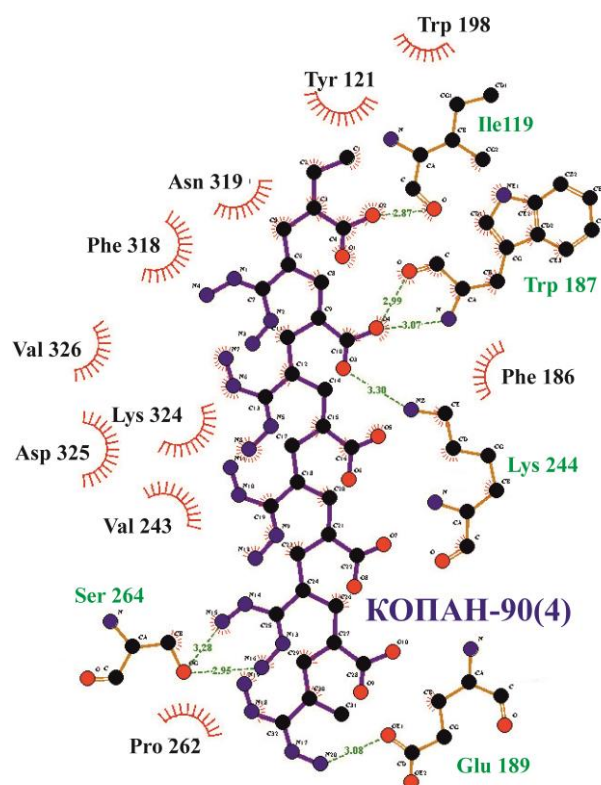


Рис. 118. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в четвертом сайте связывания

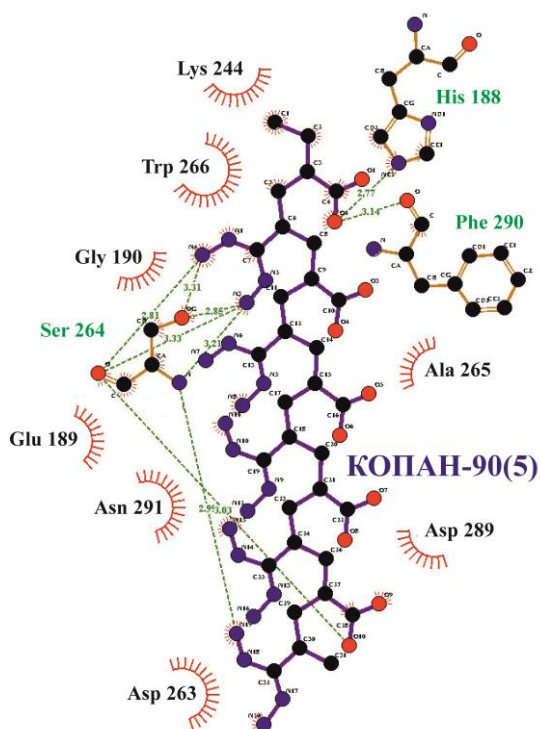


Рис. 119. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи) в пятом сайте связывания

При сорбции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на матрице катионита ВИОН КН-1 (рис. 96-101) при первом взаимодействии Lys 359 образует водородную связь с карбоксильной группой волокна, Lys 22 и Arg 347 формируют ван-дер-ваальсовы взаимодействия во второй точке контакта, Lys 91 – водородную связь в четвертой контактной группе и Arg 303 – ван-дер-ваальсовы взаимодействия в пятом сайте связывания. Таким образом, как грибная, так и дрожжевая инулиназа имеют по две водородные связи с матрицей ВИОН КН-1 на пять контактных групп.

В отличие от инулиназы из *Aspergillus ficuum*, фермент из *Kluyveromyces marxianus* не образует водородных связей с матрицей ВИОН АН-1 в первых двух контактных точках (рис. 102-107), зато количество ван-дер-ваальсовых взаимодействий во всех пяти сайтах связывания суммарно превышает таковое у грибной инулиназы (76 и 64 соответственно).

Хитозан образует с инулиназой из *Kluyveromyces marxianus* наибольшее количество водородных связей из исследуемых нами носителей (45 водородных связей на пять контактных групп) (рис. 108-113), на втором месте находится амфолит КОПАН-90 (29 водородных связей на пять сайтов связывания) (рис. 114-119).

Кроме сайтов связывания с дрожжевой инулиназой, различные звенья смолы КУ-2 образуют водородные связи с сульфогруппами других звеньев своей матрицы: звенья носителя, взятые нами для пятого докинга, формируют водородную связь длиной 3,34 Å с пятью звеньями катионита, которые участвовали в третьем докинге, и две связи длиной 2,89 и 3,10 Å – со звеньями из четвертого докинга (рис. 86-88). Матрица хитозана формирует водородные связи длиной 3,00, 3,16 и 3,26 Å между второй и пятой пятеркой звеньев, используемых нами при расчетах (рис. 109, 113). Аниониты АВ-17-2П и ВИОН АН-1 также образуют сайты связывания с собственными функциональными группами, но уже за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий: для волокна между первой и четвертой пятерками звеньев, а для смолы – между первой и третьей, четвертой и пятой.

Как и в расчетных данных для инулиназы из *Aspergillus ficuum*, для фермента из *Kluyveromyces marxianus* можно заключить, что многие аминокислотные остатки на поверхности молекулы входят в состав контактных групп при сорбции фермента сразу на нескольких носителях, которые существенно отличаются друг от друга по структуре и заряду. Однако в отличие от грибного энзима, у которого 21 аминокислотный остаток входит в состав сайтов связывания со всеми исследуемыми нами носителями, у дрожжевой инулиназы такой остаток только один – Thr 486 (табл. 26).

Таблица 26

Данные о перекрывании аминокислотных остатков инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, формирующих связи и взаимодействия с носителями (самым крупным шрифтом обозначены аминокислотные остатки в составе первого сайта связывания, далее шрифт уменьшается с увеличением номера сайта связывания; обычным шрифтом отражены остатки, участвующие в формировании ван-дер-ваальсовых взаимодействий, жирным шрифтом и подчеркиванием выделены остатки, образующие водородные связи с матрицей носителя)

КУ-2	АВ-17-2П	ВИОН КН-1	ВИОН АН-1	Хитозан	КОПАН- 90
1	2	3	4	5	6
<b>Thr 486</b> Thr 486 <b>Thr 486</b>	Thr 486 Thr 486	Thr 486	Thr 486	<b>Thr 486</b>	<b>Thr 486</b>
<b>Asn 487</b> Asn 495 <b>Gly 459</b> <b>Ser 490</b> Thr 456 Tyr 454	Asn 487  Asn 495 Gly 459  Ser 490 Thr 456  Tyr 454	–	Asn 487  Asn 495 Gly 459  Ser 490 Thr 456  Tyr 454	<b>Asn 487</b> <b>Asn 495</b> <b>Gly 459</b> Ser 490 <b>Thr 456</b> <b>Tyr 454</b>	Asn 487 Asn 495 <b>Gly 459</b> <b>Ser 490</b> <b>Thr 456</b> <b>Tyr 454</b>
<b>Glu 238</b>  Phe 113 Pro 488 Pro 488 Trp 335 Trp 79	Glu 238 Glu 238 Phe 113 Pro 488  Trp 335 Trp 79	<b>Glu 238</b>  Phe 113 Pro 488  Trp 335  Trp 79	Glu 238  Phe 113 Pro 488 Trp 335 Trp 79 Trp 79	–	<b>Glu 238</b>  Phe 113 Pro 488 <b>Trp 335</b> Trp 79

Продолжение табл. 26

1	2	3	4	5	6
<b><u>Ser 145</u></b>	Ser 145	Ser 145	Ser 145	–	–
Asn 273 Asn 319 Gln 339 Phe 186 Phe 318 Trp 187 Tyr 121 Val 243 <b><u>Val 489</u></b>	Asn 273 Asn 319 Gln 339 Phe 186 Phe 318 Trp 187 Tyr 121 Val 243 Val 489	–	Asn 273 Asn 319 Gln 339 Phe 186 Phe 318 Trp 187 Tyr 121 Val 243 Val 489	–	Asn 273 Asn 319 Gln 339  Phe 186 Phe 318  <b><u>Trp 187</u></b> Tyr 121 Val 243 Val 489
Asn 457 Phe 422	–	–	<b><u>Asn 457</u></b> Phe 422	<b><u>Asn 457</u></b> Phe 422	<b><u>Asn 457</u></b> Phe 422
–	Ser 114	Ser 114	Ser 114	–	Ser 114
–	–	Leu 37	Leu 37	<b><u>Leu 37</u></b>	<b><u>Leu 37</u></b>
Arg 303 <b><u>Met 307</u></b> <b><u>Phe 304</u></b> Phe 361 Pro 321 Thr 363 Thr 363 Thr 363	Arg 303 Met 307 Phe 304 Phe 361 Pro 321 Thr 363 Thr 363	Arg 303 Met 307  <b><u>Phe 304</u></b> Phe 361 <b><u>Pro 321</u></b>  <b><u>Thr 363</u></b>	–	–	–
<b><u>Asn 122</u></b> Asp 109 Gly 147 Leu 3 Thr 81	Asn 122 Asp 109 Gly 147 Leu 3 Leu 3 Thr 81	–	Asn 122 Asp 109 Gly 147 Leu 3  Thr 81	–	–
Arg 181 Asn 364 Asn 364 <b><u>Gln 236</u></b> <b><u>Lys 244</u></b>  Pro 274	Arg 181 Asn 364  Gln 236 Lys 244  Pro 274	–	–	–	Arg 181 Asn 364  Gln 236 <b><u>Lys 244</u></b> Lys 244 Pro 274
<b><u>Asp 369</u></b> Ser 367	–	Asp 369 <b><u>Ser 367</u></b>	–	<b><u>Asp 369</u></b> <b><u>Ser 367</u></b>	–
<b><u>Asp 325</u></b> Pro 365 Glu 189 Val 326	–	–	Asp 325 Pro 365 Glu 189 Val 326	–	Asp 325 Pro 365 <b><u>Glu 189</u></b> Glu 189 Val 326

Продолжение табл. 26

1	2	3	4	5	6
–	Asn 52 Ser 17	Asn 52 <b><u>Ser 17</u></b>	Asn 52 Ser 17 Ser 17	–	–
–	<b>Gln 336</b>	–	<b>Gln 336</b>	–	<b><u>Gln 336</u></b>
–	Phe 497	–	–	Phe 497	Phe 497
–	–	–	Gly 458	<b><u>Gly 458</u></b>	Gly 458
Ala 484 Gln 301 Leu 278 <b><u>Met 1</u></b>  Thr 302 <b>Thr 320</b> Val 282	Ala 484 Gln 301 Leu 278 <b>Met 1</b> <b>Met 1</b> Thr 302 <b>Thr 320</b> Val 282	–	–	–	–
Val 371 Val 517	–	Val 371 Val 517	–	–	–
<b>Ala 16</b> <b><u>Gly 424</u></b> <b>Ile 78</b>	–	–	<b>Ala 16</b>  Gly 424 <b>Ile 78</b> Ile 78	–	–
<b><u>Asp 299</u></b>	–	–	–	<b>Asp 299</b>	–
<b>Ile 119</b> <b><u>Thr 493</u></b>	–	–	–	–	<b><u>Ile 119</u></b> <b>Thr 493</b>
–	Lys 184 Phe 317	–	Lys 184 Phe 317	–	–
–	Asp 182 Asp 53	–	–	–	Asp 182 Asp 53
–	–	Arg 347 Gln 150 Gln 340 <b><u>Ile 19</u></b> Ile 470 Lys 22 Phe 472 Pro 342 Pro 471 <b><u>Ser 15</u></b> Tyr 21 Val 14	Arg 347 Gln 150 Gln 340 Ile 19 Ile 470 Lys 22 Phe 472  Pro 342 Pro 471 Ser 15 Tyr 21 Val 14	–	–

Окончание табл. 26

1	2	3	4	5	6
–	–	<b><u>Ala 368</u></b> Asp 360 <b><u>Lys 359</u></b> Ser 254 <b><u>Ser 255</u></b> Tyr 247 Val 250 <b><u>Val 370</u></b>	–	<b><u>Ala 368</u></b> <b><u>Asp 360</u></b> Lys 359 <b><u>Ser 254</u></b> <b><u>Ser 255</u></b> Tyr 247 Val 250 Val 370	–
–	–	Tyr 312	–	–	Tyr 312
–	–	–	Ala 75 Ala 76 Phe 35 Ser 36 Ser 6	<b><u>Ala 75</u></b> Ala 76 Phe 35 <b><u>Ser 36</u></b> Ser 6	–
–	–	–	–	<b><u>Arg 39</u></b> <b><u>Asp 98</u></b> <b><u>Pro 40</u></b> Ser 41 Ser 95 <b><u>Thr 45</u></b> Trp 346 <b><u>Trp 96</u></b> Trp 96 Val 556	<b><u>Arg 39</u></b> <b><u>Asp 98</u></b> Pro 40 <b><u>Ser 41</u></b> Ser 95 Thr 45 Trp 346 Trp 96 Val 556
<b>«Уникальные» аминокислоты</b>					
Arg 135 Lys 14 Pro 277 <b><u>Ser 362</u></b> Tyr 492	Asn 273 Asn 480 Asp 306 Asp 325 Gln 482 Glu 189 Leu 483 Thr 316	<b><u>Ala 251</u></b> Asn 322 Asn 379 Asn 516 Asp 53 <b><u>Asp 92</u></b> Cys 239 Gln 71 <b><u>Glu 323</u></b> Glu 475 Glu 64 Leu 305 Leu 378 Leu 93 <b><u>Lys 91</u></b> Ser 249 <b><u>Trp 66</u></b> <b><u>Tyr 285</u></b> <b><u>Tyr 59</u></b> Val 377	Ala 29 Ala 4 <b><u>Arg 23</u></b> <b><u>Asn 73</u></b> Asp 108 Gly 80 Leu 7 Lys 146 Lys 28 Pro 246 Pro 82 Ser 178 Ser 27 Thr 527 <b><u>Tyr 5</u></b> Val 244	Asn 32 <b><u>Asn 555</u></b> Asp 252 <b><u>Asp 344</u></b> Gly 49 His 43 <b><u>His 48</u></b> Ile 298 Leu 8 Pro 345 <b><u>Pro 345</u></b> <b><u>Pro 74</u></b> Ser 253 Thr 33 Thr 34 Thr 77 <b><u>Thr 94</u></b>	Ala 265 Asn 291 Asn 38 Asp 263 Asp 289 Gly 190 <b><u>His 188</u></b> Leu 383 Lys 324 Lys 505 <b><u>Phe 290</u></b> Pro 262 Pro 46 <b><u>Ser 264</u></b> <b><u>Ser 264</u></b> Ser 47 Trp 198 Trp 266



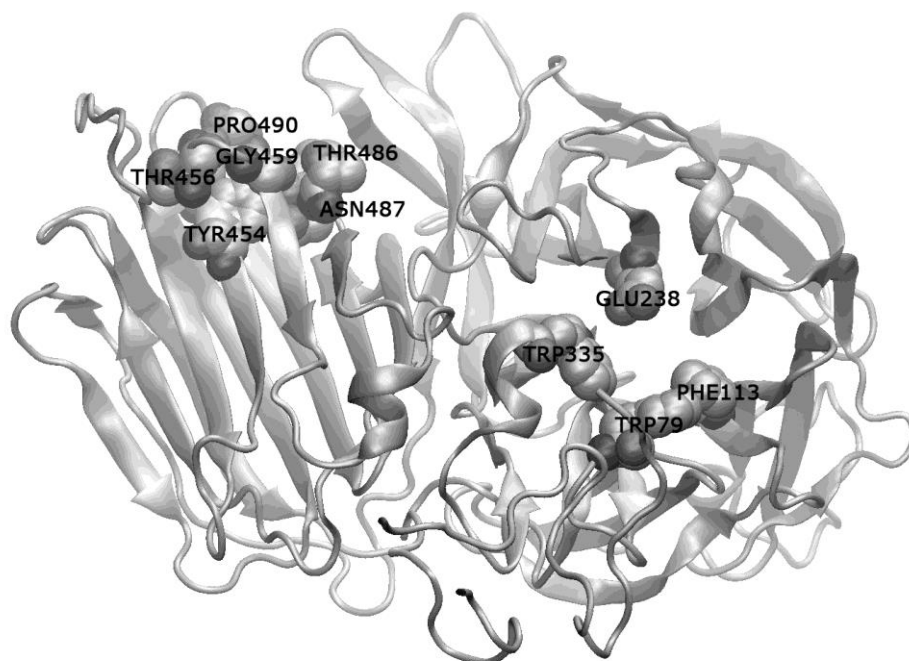
В процессе сорбции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана принимают участие 6 общих аминокислотных остатков (Tyr 454, Thr 456, Gly 459, Asn 487, Ser 490, Asn 495), причем у анионитов АВ-17-2П и ВИОН АН-1 они входят в состав пятого сайта связывания, а у других носителей – третьего.

Девять остатков (Tyr 121, Phe 186, Trp 187, Val 243, Asn 273, Phe 318, Asn 319, Gln 339, Val 489) являются общими при адсорбции фермента на КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН АН-1 и КОПАН-90: Asn 273 и Gln 339 находятся в составе первой контактной группы у всех четырех носителей; Tyr 121, Phe 186, Trp 187, Val 243, Phe 318, Asn 319 мы видим во втором сайте связывания с КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН АН-1 и в четвертом сайте связывания с матрицей КОПАН-90.

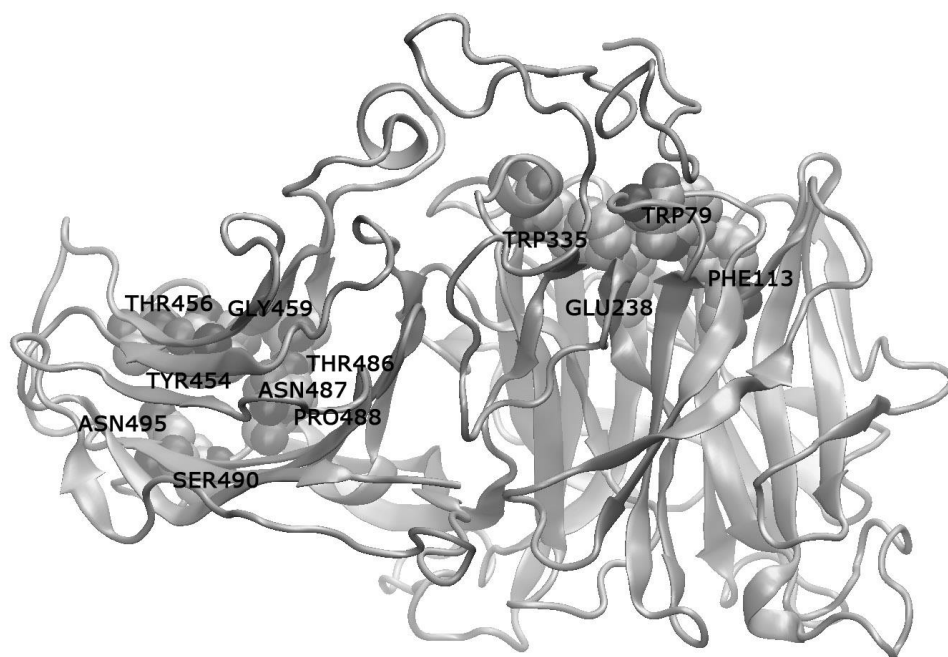
Интересно, что остатки Ser 15, Ile 19, Tyr 21, Lys 22, Val 14, Gln 340, Pro 342, Arg 347, Ile 470, Pro 471, Phe 472 входят одновременно в состав второго и третьего сайтов связывания инулиназы с матрицами соответственно катионита ВИОН КН-1 и анионита ВИОН АН-1.

При сорбции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* мы встречаем большее количество «уникальных» (встречающихся в сайтах связывания фермента и носителей только при сорбции на их матрицах) аминокислотных остатков: 5 для КУ-2, 20 для ВИОН КН-1, 16 для ВИОН АН-1, 17 для хитозана, 18 для КОПАН-90.

На рис. 120 представлены наиболее вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, включающие в себя аминокислотные остатки, которые входят в состав контактных областей при сорбции фермента минимум на пяти из шести исследуемых нами носителей. Наиболее «крупные» из них следующие: 1) Tyr 454, Thr 456, Gly 459; 2) Thr 486, Asn 487, Pro 488, Ser 490, Asn 495. «Мелкие» сайты связывания включают по одному аминокислотному остатку: Trp 79, Phe 113, Glu 238, Trp 335.



А



Б

Рис. 120. Вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (атомы аминокислотных остатков, входящих в их состав, обозначены шарами): Б – повернутая на 90 градусов вокруг горизонтальной оси форма А

В табл. 27 приведены результаты сравнительного анализа сайтов связывания инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluuveromyces marxianus* с матрицами носителей различных типов. Отчетливо видно, что аффинности связывания дрожжевой инулиназы с поверхностью смолы КУ-2 в целом выше, а число водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий больше, чем у грибного фермента. Аффинности связывания и число ван-дер-ваальсовых взаимодействий для инулиназы из *Kluuveromyces marxianus* при сорбции на анионите АВ-17-2П также превышают их значения для энзима из *Aspergillus ficuum*. При этом оба фермента не образуют водородных связей с матрицей носителя.

Таблица 27

Сравнительный анализ сайтов связывания инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluuveromyces marxianus* с матрицами носителей различных типов

инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	инулиназа из <i>Kluuveromyces marxianus</i>
1	2
<b>КУ-2, катионит, смола</b>	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-7,3	-8,5
-8,0	-8,8
-7,8	-7,6
-6,8	-7,9
-6,2	-8,4
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
20/46	23/52
<b>АВ-17-2П, анионит, смола</b>	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-6,8	-8,0
-7,1	-6,9
-5,2	-6,4
-5,2	-6,1
-5,5	-6,2
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
0/81	0/68

Окончание табл. 27

1	2
<b>ВИОН КН-1, катионит, волокно</b>	
Аффиности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-5,8	-5,6
-5,5	-6,0
-5,9	-5,8
-5,2	-5,6
-5,6	-5,5
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
21/41	25/43
<b>ВИОН АН-1, анионит, волокно</b>	
Аффиности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-6,5	-7,8
-6,4	-7,3
-7,2	-7,4
-5,3	-6,5
-5,4	-5,5
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
8/64	5/76
<b>Хитозан</b>	
Аффиности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-7,0	-7,8
-6,8	-6,5
-6,3	-6,4
-6,3	-6,5
-7,7	-6,6
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
44/31	45/23
<b>КОПАН-90, амфолит, волокно</b>	
Аффиности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-5,9	-5,8
-5,6	-5,8
-5,8	-5,7
-5,0	-6,0
-5,2	-5,2
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
27/52	29/50

Аффинности связывания, число водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий у обеих инулиназ с матрицей волокон ВИОН КН-1 и КОПАН-90 существенным образом не отличаются друг от друга, тогда как значения аффинностей связывания дрожжевой инулиназы с поверхностью ВИОН АН-1 и количество ван-дер-ваальсовых взаимодействий выше, а количество водородных связей при этом ниже, чем у грибного энзима. Существенных отличий в значениях аффинностей связывания и числе водородных связей для обеих инулиназ при сорбции на хитозане мы не обнаружили, однако, расчеты показали, что грибной энзим образует большее количество ван-дер-ваальсовых взаимодействий с поверхностью носителя, чем дрожжевой фермент.

Обобщая приведенные выше материалы, можно заключить, что при сорбции инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана наблюдаются следующие сходства и особенности:

1. при взаимодействии обеих инулиназ с матрицей КУ-2 водородные связи образуются только между сульфогруппами носителя и молекулой белка;
2. кроме сайтов связывания с ферментом, различные звенья смолы КУ-2 образуют водородные связи с сульфогруппами других звеньев своей матрицы;
3. между матрицей анионита АВ-17-2П и ферментами мы наблюдаем наличие лишь ван-дер-ваальсовых взаимодействий и отсутствие водородных связей, отрицательно заряженные аминокислотные остатки превалируют при первом контакте обоих энзимов с носителем, по сравнению с другими точками связывания;
4. аниониты АВ-17-2П и ВИОН АН-1 образуют сайты связывания с собственными функциональными группами за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий при иммобилизации на своей матрице обеих инулиназ;

5. как грибная, так и дрожжевая инулиназы имеют по две водородные связи положительно заряженных аминокислотных остатков с матрицей ВИОН КН-1 на пять контактных групп;
6. хитозан образует с обеими инулиназами наибольшее количество водородных связей из исследуемых нами носителей, вторую позицию занимает амфолит КОПАН-90;
7. аффинности связывания, число водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий у обеих инулиназ с матрицей волокон ВИОН КН-1 и КОПАН-90 существенным образом не отличаются друг от друга;
8. многие аминокислотные остатки на поверхности молекул инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluuveromyces marxianus* входят в состав контактных групп при их сорбции на носителях, которые существенно отличаются друг от друга по структуре и заряду.

Однако при сорбции инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluuveromyces marxianus* на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана выявляется ряд отличительных особенностей:

1. наблюдаются различия в распределении положительно заряженных аминокислотных остатков между контактными участками молекулы фермента и матрицей катионообменной смолы КУ-2: в формировании пяти сайтов связывания у инулиназы из *Kluuveromyces marxianus* принимают участие пять положительно заряженных аминокислотных остатков, тогда как у инулиназы из *Aspergillus ficuum* их восемь;
2. аффинности связывания дрожжевой инулиназы с поверхностью смолы КУ-2 в целом выше, а число водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий больше, чем у грибного фермента;
3. аффинности связывания и число ван-дер-ваальсовых взаимодействий для инулиназы из *Kluuveromyces marxianus* при сорбции на анионите АВ-17-2П также превышают их значения для энзима из *Aspergillus ficuum*;
4. в отличие от грибной инулиназы, дрожжевой фермент не образует водородных связей с матрицей ВИОН АН-1 в первых двух контактных

точках, зато количество ван-дер-ваальсовых взаимодействий во всех пяти сайтах связывания суммарно превышает таковое у инулиназы из *Aspergillus ficuum*;

5. матрица хитозана формирует водородные связи между собственными пятерками звеньев при сорбции на ней инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и ван-дер-ваальсовы взаимодействия – при иммобилизации инулиназы из *Aspergillus ficuum*;
6. в отличие от грибного энзима, у которого 21 аминокислотный остаток входит в состав сайтов связывания со всеми исследуемыми нами носителями, у дрожжевой инулиназы такой остаток только один;
7. при изучении сорбции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* мы встречаем большее количество «уникальных» (встречающихся в сайтах связывания фермента и носителей только при сорбции на их матрицах) аминокислотных остатков, чем при иммобилизации инулиназы из *Aspergillus ficuum* (исключением является только анионит АВ-17-2П, для которого число «уникальных» остатков при связывании с грибной инулиназой равно 12, а с дрожжевой – 8).

#### 5.5. Поиск сшивающего агента для сополимеризации инулиназы

В следующей серии экспериментов мы тестировали глутаровый альдегид в качестве сшивающего агента для ковалентной иммобилизации и сополимеризации молекул инулиназы (рис. 121). С помощью последовательного молекулярного докинга нами были получены следующие результаты: аффинности глутарового альдегида по отношению к молекуле инулиназы значительно ниже, чем у всех исследованных нами носителей для иммобилизации (табл. 28).

Результаты расчетов последовательного молекулярного докинга для  
инулиназы и глутарового альдегида

Номер лиганда	Аффинность, ккал/моль	
	Инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>
1	-3,5	-4,4
2	-3,4	-4,1
3	-3,2	-3,1
4	-3,1	-3,4
5	-3,4	-3,2

Вероятно, отсутствие большого количества водородных связей, или ван-дер-ваальсовых взаимодействий (рис. 122), которые столь характерны для макромолекулярных лигандов, в случае малых молекул и явилось причиной наблюдаемого резкого снижения свободной энергии связывания. Суперпозиция сайтов связывания молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и глутарового альдегида представлена на рис. 123. Стоит отметить тенденцию к отсутствию единого предпочтительного местоположения низкомолекулярного лиганда на поверхности белковой глобулы.

При сополимеризации молекул инулиназы с различными концентрациями глутарового альдегида нам не удалось сохранить более 20 % каталитической активности нативного ферментного препарата, поэтому мы сочли данный метод менее перспективным по сравнению с сорбционной иммобилизацией энзима.

Для объяснения резкого снижения активности инулиназы при ее сополимеризации с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента мы использовали данные ИК-спектроскопии (рис. 124, табл. 29).



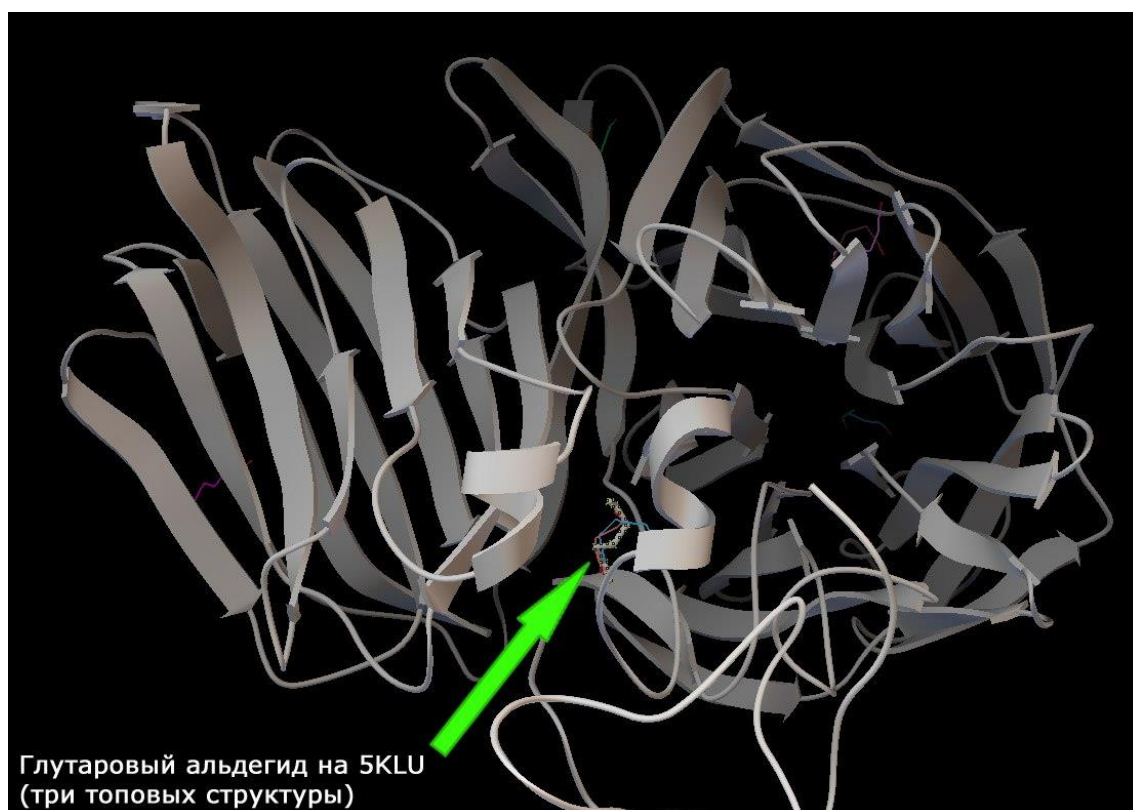
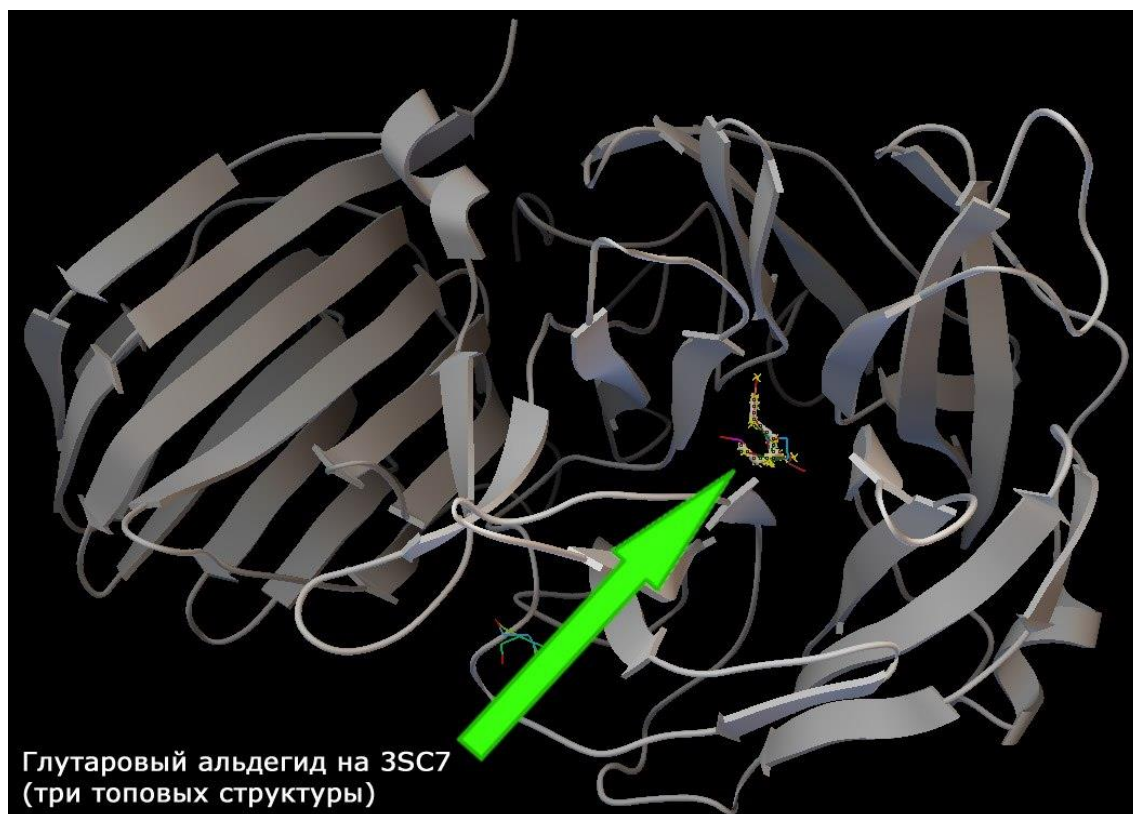


Рис.121. Локализация наиболее предпочтительного места связывания глутарового альдегида на молекуле инулиназы (показана стрелкой) из *Aspergillus ficuum* (3SC7) и *Kluyveromyces marxianus* (5KLU)

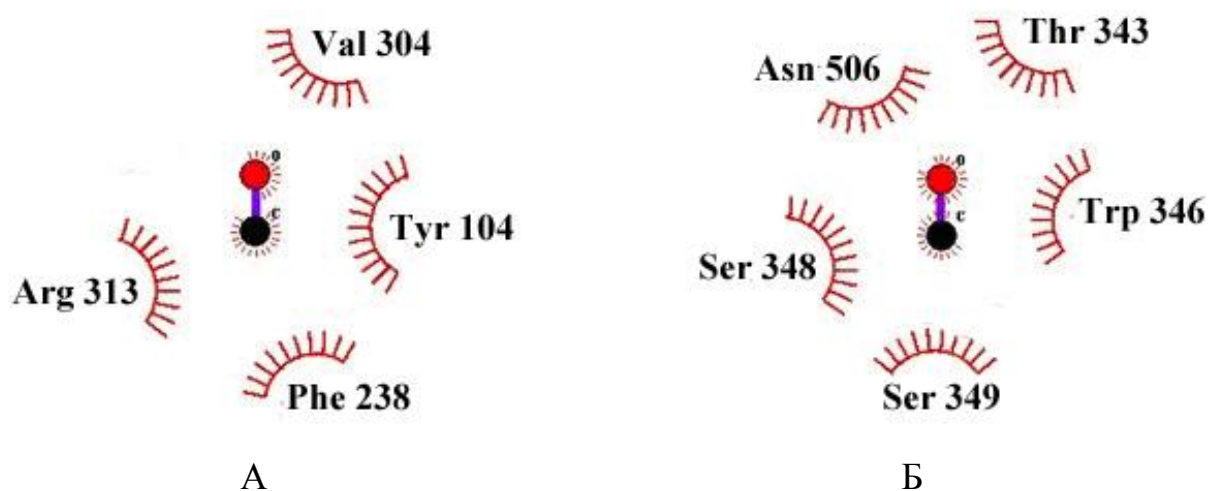


Рис. 122. Связи и взаимодействия между глутаровым альдегидом и молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* (А) и *Kluyveromyces marxianus* (Б)

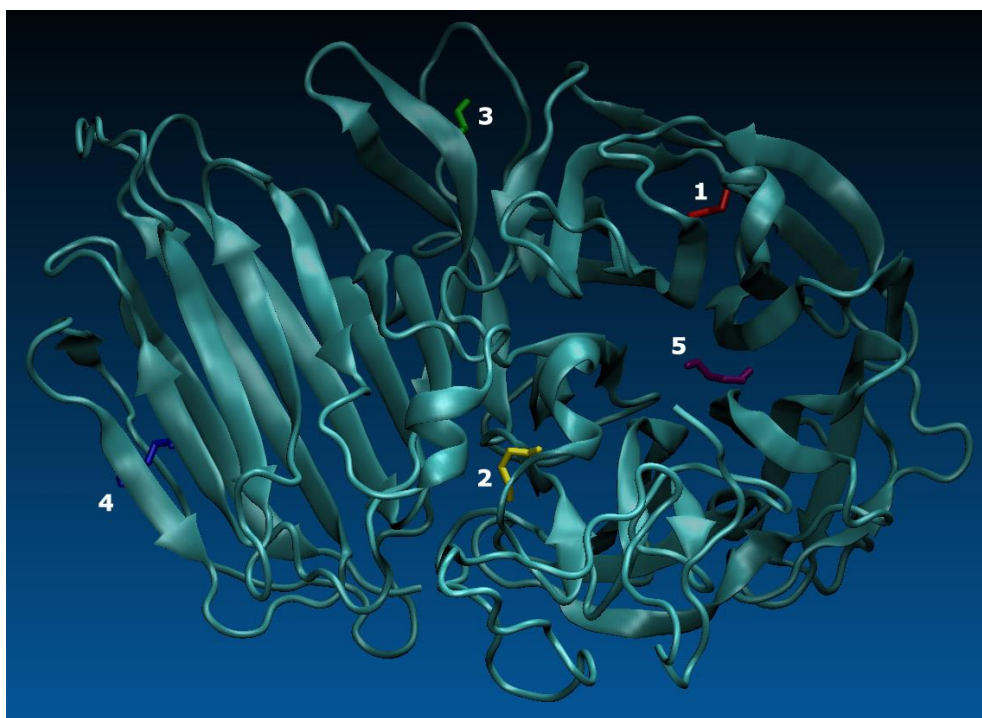


Рис. 123. Суперпозиция сайтов связывания молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с глутаровым альдегидом

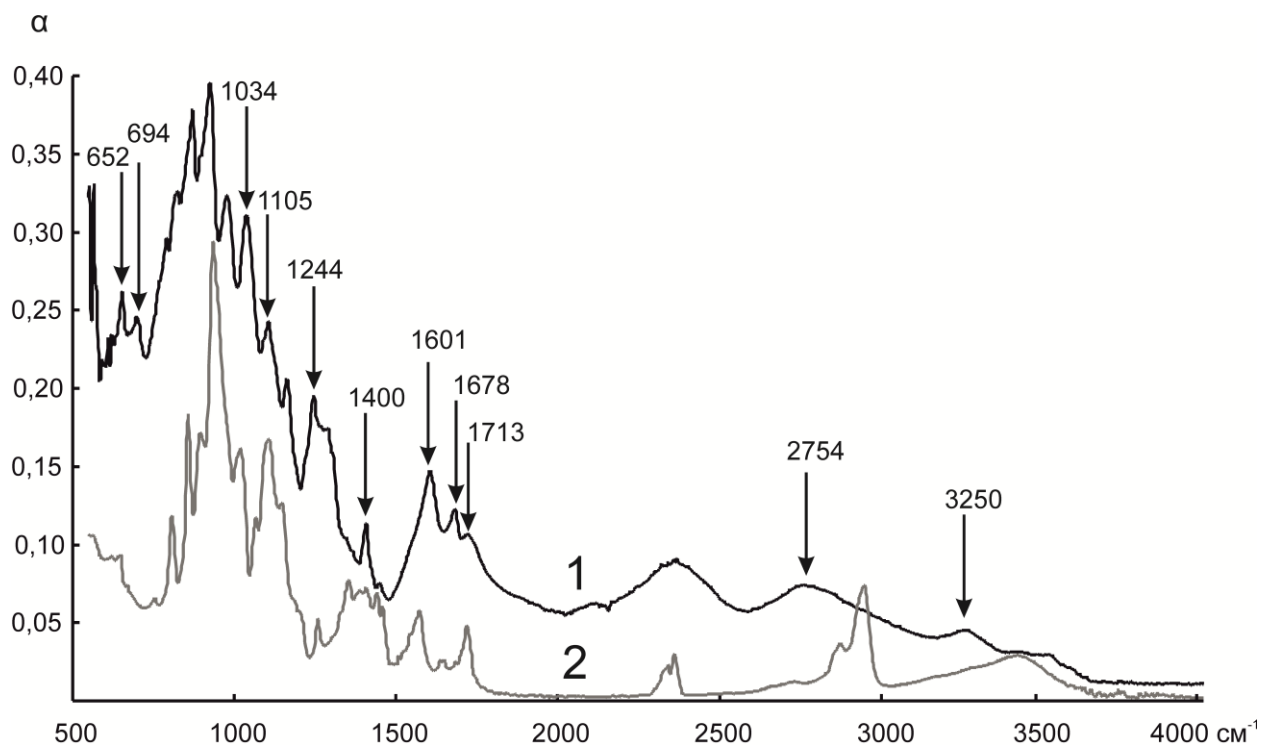


Рис. 124. ИК-спектр поглощения инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* до (1) и после (2) сополимеризации ее молекул с помощью глутарового альдегида:  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата

Таблица 29

Изменения в ИК-спектрах инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* после сополимеризации с глутаровым альдегидом

Полоса поглощения	Изменения	Вероятная причина изменений после сополимеризации
1	2	3
3250 $\text{cm}^{-1}$	Смещение до 3400 $\text{cm}^{-1}$ и снижение интенсивности	Может свидетельствовать о перестройках в белковой глобуле, компактизации молекулы фермента, а также выходе на ее поверхность дополнительного числа боковых аминогрупп остатков аргинина, лизина и гистидина

1	2	3
2754 см <sup>-1</sup>	Расщепление на два пика 2945 и 2866 см <sup>-1</sup>	Вероятно, указывает на наличие глутарового альдегида в полученном препарате, т.к. полосы в области 2880 см <sup>-1</sup> являются характерными полосами, указывающими на альдегидную группу
1713 см <sup>-1</sup>	Смещение до 1717 см <sup>-1</sup> и существенное увеличение интенсивности	Указывает на наличие глутарового альдегида в полученном препарате, т.к. полосы в области 1720 см <sup>-1</sup> являются характерными полосами алифатических альдегидов
1678 см <sup>-1</sup>	Смещение до 1680 см <sup>-1</sup> и снижение интенсивности	Может быть связано с более плотной упаковкой гидрофобного ядра по сравнению с нативной формой инулиназы, что, вероятно, является одной из основных причин снижения ее ферментативной активности после иммобилизации
1601 см <sup>-1</sup>	Расщепление на 1636 и 1572 см <sup>-1</sup> и снижение интенсивности	
1400 см <sup>-1</sup>	Расщепление на 1393, 1377, 1350 см <sup>-1</sup>	Изменения могут свидетельствовать о взаимодействии молекулы инулиназы с глутаровым альдегидом через аминокруппы, т.к. полоса обусловлена плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп
1244 см <sup>-1</sup>	Смещение до 1255 см <sup>-1</sup> и снижение интенсивности	Вероятно, свидетельствуют о значительных структурных перестройках в молекуле фермента
1105 см <sup>-1</sup>	Смещение до 1099 см <sup>-1</sup> и снижение интенсивности	
1034 см <sup>-1</sup>	Расщепление на 1065 и 1015 см <sup>-1</sup> и снижение интенсивности	
694 и 652 см <sup>-1</sup>	Смещение до 642 и 607 см <sup>-1</sup>	Может свидетельствовать о структурных перестройках белковой глобулы, т.к. полосы обусловлены колебаниями сульфогруппы

Исходя из полученных данных, можно предположить, что существенное снижение каталитической активности инулиназы после сополимеризации ее молекул глутаровым альдегидом обусловлено значительными структурными перестройками и формированием более плотно упакованного гидрофобного ядра по сравнению с нативной формой фермента. Кроме того, согласно данным атомно-силовой микроскопии, при сополимеризации молекул инулиназы с 2 % глутаровым альдегидом средняя и максимальная высота частиц на пластинках слюды составила  $21 \pm 0,9$  и  $23 \pm 1,7$  нм соответственно, что свидетельствует об образовании агрегатов молекул фермента в присутствии глутарового альдегида в растворе. На рис. 125 представлена гистограмма частот встречаемости площадей поверхностей частиц при сополимеризации инулиназы с 2 % глутаровым альдегидом.

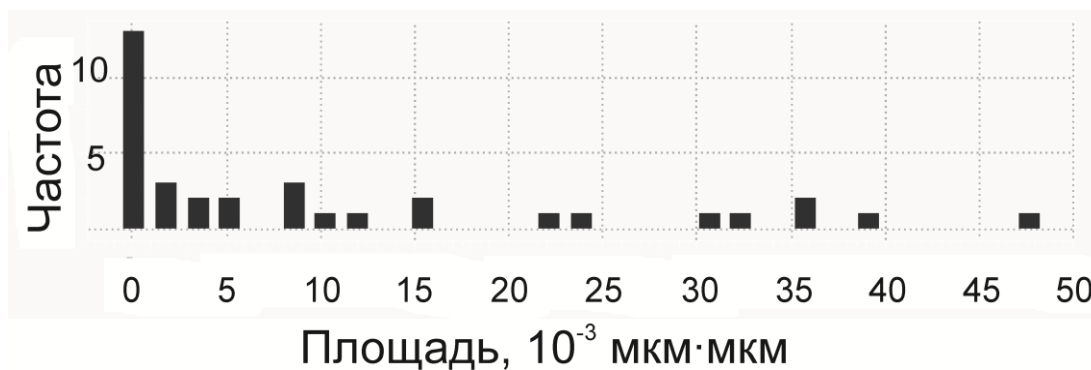


Рис. 125. Гистограммы частот встречаемости площадей поверхностей частиц при сополимеризации молекул инулиназы с 2 % глутаровым альдегидом

### 5.6. Поиск перспективного носителя для иммобилизации инулиназы

К соединениям, применяемым в качестве носителей промышленных ферментов, предъявляются определенные требования: с одной стороны, молекула энзима должна находиться в условиях, максимально приближенных к оптимальным, не претерпевая при этом существенных структурно-функциональных изменений, с другой — она должна быть

прикреплена к матрице практически необратимо. Имобилизованные ферменты, используемые в фармацевтической и пищевой промышленности, кроме вышеперечисленных параметров, должны соответствовать санитарно-гигиеническим нормам. Поэтому в качестве носителей для иммобилизации инулиназы из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* и клубней *Helianthus tuberosus* мы применяли катиониты КУ-2, КУ-2-8, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1, PUROLITE и аниониты АВ-17-2П, ЭДЭ-10П, АВ-16-ГС, АН-12П, АМ 21А, ВИОН АН-1, ИМАС-НР (Лурье А.А., 1972, Бруцкус Т.К., 1975).

Степень мобильности белковой молекулы во многом определяет каталитическую активность фермента: даже при небольшом варьировании в конформации полипептидной цепи у энзимов способность к катализу может резко измениться. Присоединение фермента к матрице полимерного носителя путем образования химических связей или физических взаимодействий часто приводит к ослаблению функциональных свойств катализатора по сравнению с нативным энзимом. Уменьшение активности иммобилизованных препаратов может быть также обусловлено экранированием доступа молекул субстрата к активному центру фермента.

При адсорбционной иммобилизации инулиназы, выделенной из дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, на синтетических ионитах наиболее высокую степень сохранения удельной активности мы наблюдали у препаратов на основе АВ-17-2П и КУ-2 (75,5 % и 61,7 %). Другие ионообменники оказались менее перспективными (рис. 126). Очевидно, молекулы энзима достаточно прочно связываются с матрицами анионита АВ-17-2П и катионита КУ-2, существенно не изменяя при этом своей каталитически активной конформации, что позволяет считать эти смолы перспективными для дальнейших исследований с целью получения высокоактивных и стабильных биокатализаторов реакции гидролиза инулина на основе иммобилизованной инулиназы.

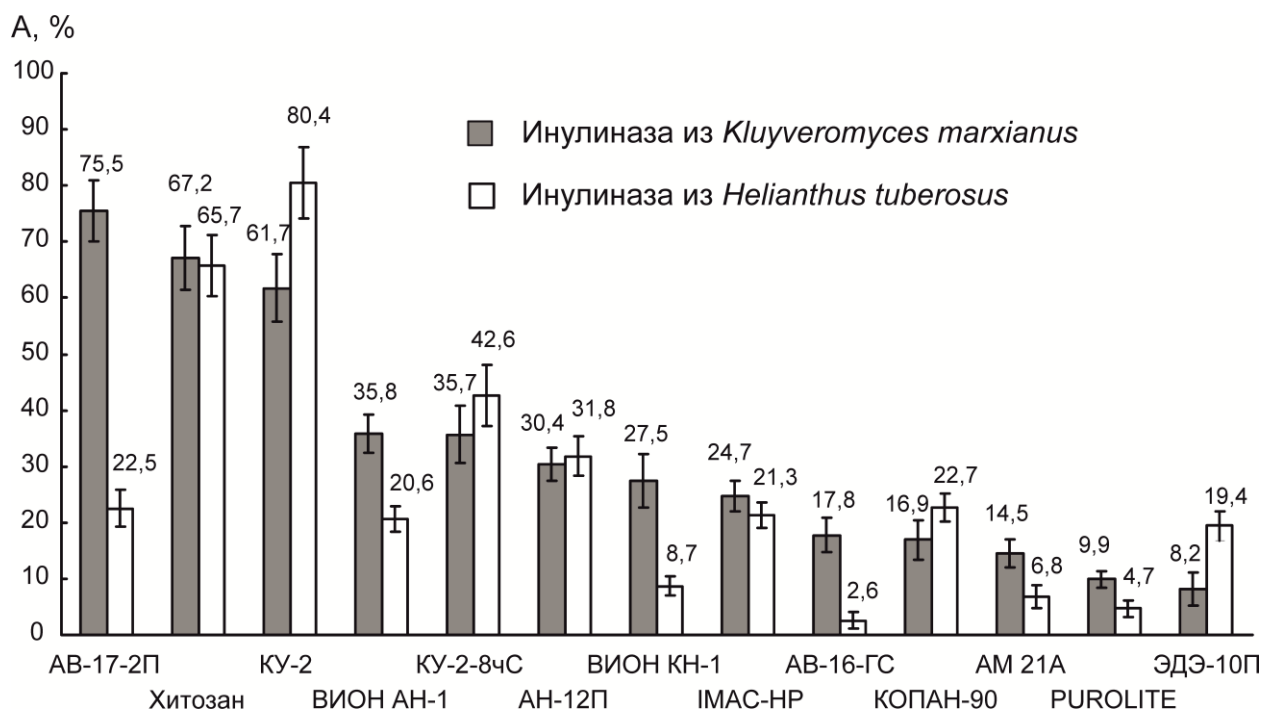


Рис. 126. Процент сохранения активности (А) иммобилизованной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Для препарата инулиназы I, выделенного из клубней *Helianthus tuberosus*, оптимальным оказался катионит КУ-2, сорбция на котором позволила сохранить 80,4 % первоначальной активности энзима.

Для изучения механизма адсорбции фермента на ионообменных смолах и волокнах синтетического происхождения и исследования структурных изменений в молекуле инулиназы и мы использовали метод ИК-спектроскопии.

После адсорбции инулиназы на ионитах в их ИК-спектрах появляются полосы поглощения, характерные для аминокислот, пептидов и белков. Например, об успешной иммобилизации инулиназ из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* и клубней *Helianthus tuberosus* на АВ-17-2П свидетельствует ряд изменений в ИК-спектре носителя: увеличение интенсивности пиков в областях 1596-1582, 1430-1400, 1630-1612, 1528-1518  $\text{см}^{-1}$ , которые соответствуют полосам поглощения ряда аминокислот (Сливкин А.И., 1999).

Далее мы попытаемся обсудить структурные перестройки, происходящие в ходе процесса адсорбции как в молекуле фермента, так и в матрице носителей. Рассмотрим для начала сульфостирольный катионит КУ- 2 (табл. 30), который относится к многофункциональным сульфокатионитам полимеризационного типа, получаемым сульфированием гранульного сополимера стирола с дивинилбензолом. Катионит имеет гелевую структуру, содержит только один вид функциональных групп – сульфогруппу  $\text{SO}_3\text{H}$ .

Таблица 30

## Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах ионита КУ-2

Полоса поглощения	Чем обусловлена (Угрянская В.А., 1989)
3500-3300 $\text{см}^{-1}$	валентные колебания группы $-\text{OH}$ в $-\text{SO}_3\text{H}$ и $-\text{OH}$ в $\text{H}_2\text{O}$
2930-2850 $\text{см}^{-1}$	асимметричные и симметричные колебания групп $>\text{CH}-$ и $-\text{CH}_2-$
1640-1615 $\text{см}^{-1}$	колебания бензольного кольца с различным типом замещения и деформационные колебания $-\text{OH}$ гидратной воды
1605-1500 $\text{см}^{-1}$	валентные колебания связи $\text{C}=\text{C}$ бензольного кольца
1460-1420 $\text{см}^{-1}$	деформационные колебания групп $>\text{CH}-$ и $-\text{CH}_2-$
1350-1330 $\text{см}^{-1}$	валентные колебания $\text{S}=\text{O}$ в $-\text{SO}_3\text{H}$
1250-1125 $\text{см}^{-1}$	валентные колебания функциональной группы $-\text{SO}_3\text{H}$
1220-1120 $\text{см}^{-1}$	валентные колебания сульфогруппы
1050-1000 $\text{см}^{-1}$	валентные колебания сульфогруппы
907-900 $\text{см}^{-1}$	асимметричные колебания связи $\text{S}=\text{O}$ в $-\text{SO}_3\text{H}$
830 $\text{см}^{-1}$ и 780 $\text{см}^{-1}$	внеплоскостные деформационные колебания $\text{CH}$ дизамещенного бензольного кольца
625 и 570 $\text{см}^{-1}$	колебания $\text{C}-\text{S}$ сульфогруппы, связанной с бензольным кольцом ( <i>n</i> - и <i>o</i> -замещение)

Так как ряд полос поглощения ионита КУ-2 перекрывается с полосами поглощения препарата инулиназы, для того, чтобы оценить изменения, происходящие в структуре носителя, мы анализировали не ИК-спектр ионита с иммобилизованным ферментом, а спектр, полученный путем вычитания



значений коэффициента поглощения  $\alpha$  для инулиназы из значений  $\alpha$  для носителя с иммобилизованным на нем энзимом. Аналогичной обработке мы подвергали ИК-спектры других ионитов.

На полученном таким образом спектре мы наблюдали наличие новых пиков по сравнению с ИК-спектром КУ-2 (табл. 31). Из этих данных можно сделать вывод о том, что адсорбция инулиназы на КУ-2 происходит за счет электростатических взаимодействий положительно заряженных аминокислотных остатков фермента с сульфогруппой катионита, а также за счет образования водородных связей. Аналогичные изменения происходят в ИК-спектре КУ-2-8чс, очевидно, что связывание инулиназы с матрицей носителя происходит по тому же механизму, что и для КУ-2.

Таблица 31

Изменения в ИК-спектрах ионита КУ-2 после иммобилизации инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Полоса поглощения	Изменения	Вероятная причина изменений после иммобилизации инулиназы из	
		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>
1	2	3	4
3500-3300 см <sup>-1</sup>	Изменение формы и интенсивности пика	Образование небольшого количества водородных связей между поверхностными аминокислотами молекулы инулиназы и матрицей носителя	
1350-1330 см <sup>-1</sup>	Увеличение интенсивности пика, соответствующего валентным колебаниям S=O в -SO <sub>3</sub> H	Участие сульфогруппы в процессе сорбции фермента на носителе	

Окончание табл. 31

1	2	3	4
1220-1120 см <sup>-1</sup>	Вырождение колебаний группы –SO <sub>3</sub> H, расщепление максимума, изменение формы и числа пиков	Участие сульфогруппы в процессе сорбции фермента на носителе, насыщение сульфокатионитов ионами аминокислот	
1165-1135 см <sup>-1</sup>	Наличие новых пиков		Некоторое количество сульфогрупп находится в недиссоциированном состоянии
1050-1000 см <sup>-1</sup>	Изменение формы и числа пиков, обусловленных валентными колебаниями сульфогруппы	Участие сульфогруппы в процессе сорбции фермента на носителе	
907-900 см <sup>-1</sup>	Увеличение интенсивности пика, который вызывается асимметричными колебаниями связи S=O в –SO <sub>3</sub> H, смещение пика вправо	Участие сульфогруппы в процессе сорбции фермента на носителе	
898 см <sup>-1</sup>	Наличие новых пиков		Некоторое количество сульфогрупп находится в недиссоциированном состоянии

Элементарные ячейки анионитов марок ЭДЭ-10П и АН-12П содержат в основном вторичные и третичные аминогруппы, которые характеризуются поглощением в области 3400-3200 и 1650-1600 см<sup>-1</sup> (Углянская В.А., 1989).

После иммобилизации инулиназы I, выделенной из клубней *Helianthus tuberosus*, на матрице анионита ЭДЭ-10П на ИК-спектре носителя интенсивность полосы 3400-3200 см<sup>-1</sup> снижается, а полоса 1650-1600 см<sup>-1</sup> совсем исчезает, что, вероятно, обусловлено присоединением отрицательно заряженных аминокислотных остатков молекулы фермента ко вторичным и третичным аминогруппам ионита. После адсорбции энзима на матрице смолы АН-12П на ИК-спектре носителя также уменьшается интенсивность полосы 3400-3200 см<sup>-1</sup>, а полоса 1650-1600 см<sup>-1</sup> изменяет форму, что указывает на сходный с ЭДЭ-10П механизм взаимодействия ионита с молекулой инулиназы.

Полимеризационный высокоосновный монофункциональный анионит АВ-17-2П содержит функциональные группы  $-N^+(CH_3)_3$  и имеет гелевую структуру. Четвертичный амин и хлор-ион не имеют характеристических полос поглощения в области 4000-600 см<sup>-1</sup>, поэтому ИК-спектр хлоридной формы анионита отражает колебания метильно-метиленовых групп и фрагментов бензольных колец элементарного звена полимера (табл. 32).

Функциональная группа анионита АВ-17-2П  $-N^+(CH_3)_3$  не имеет, как подчеркивалось выше, протоноакцепторной группировки, необходимой для образования водородной связи. Между четвертичным аммониевым основанием и противоионом образуются ионные пары. Вблизи пар, образованных гидрофобными ионами, структура растворителя разупорядочена, поэтому в интервале частот 3700-3300 см<sup>-1</sup> у солевых форм анионита могут наблюдаться максимумы, характеризующие различную степень связывания воды. С уменьшением содержания воды в анионите в ИК-спектрах наблюдается сдвиг положения максимума в сторону больших частот. Это свидетельствует о том, что при уменьшении степени гидратации увеличивается количество неассоциированных ОН-групп в молекулах воды,

т.е. сетка гидратной структуры воды в фазе анионита при низкой степени гидратации во многих местах нарушается, что приводит к падению суммарной энергии связи (Углянская В.А., 1989).

Таблица 32

## Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах ионита АВ-17-2П

Полоса поглощения	Чем обусловлена (Углянская В.А., 1989)
3700-3300 см <sup>-1</sup>	у солевых форм анионита характеризует различную степень связывания воды
3340 см <sup>-1</sup>	положение зависит от природы сорбированного противоиона, а интенсивность – от содержания воды в фазе ионита
3000 см <sup>-1</sup>	колебания фрагментов бензольного кольца
2900-2800 см <sup>-1</sup>	валентные и деформационные колебания групп –СН <sub>3</sub> , –СН <sub>2</sub> –, >СН–
1800-1500 см <sup>-1</sup>	колебания фрагментов бензольного кольца
1450-1380 см <sup>-1</sup>	валентные и деформационные колебания групп –СН <sub>3</sub> , –СН <sub>2</sub> –, >СН–
1225-950 см <sup>-1</sup>	поглощение ароматического цикла <i>o</i> -, <i>m</i> - и <i>n</i> -замещением
980 см <sup>-1</sup>	колебания фрагментов бензольного кольца
895-830 см <sup>-1</sup>	колебания фрагментов бензольного кольца

Сорбция анионов аминокислот сопровождается появлением в ИК-спектрах анионита АВ-17-2П большего количества полос в области 3700-3200 см<sup>-1</sup> (Углянская В.А., 1989). При иммобилизации на АВ-17-2П инулиназы I из клубней *Helianthus tuberosus* подобного эффекта мы не наблюдали, однако, пик в данной области был более выражен после связывания носителя с ферментом (табл. 33). В рассматриваемом случае взаимодействие растворителя возможно как вблизи ионной пары –N<sup>+</sup>(СН<sub>3</sub>)<sub>3</sub>|–ООС (максимум при 3660-3500 см<sup>-1</sup> и при 3460-3330 см<sup>-1</sup>), так и с концевыми полярными группами (–NH<sub>2</sub>, –COOH) аминокислот при 3290-3213 см<sup>-1</sup>.

Изменения в ИК-спектрах ионита АВ-17-2П после иммобилизации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Полоса поглощения	Изменения	Вероятная причина изменений после иммобилизации инулиназы из	
		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>
3700-3200 см <sup>-1</sup>	Увеличение числа полос	Сорбция фермента, взаимодействие ионита с аминокислотными остатками на его поверхности	
2900-2800 см <sup>-1</sup>	Модификация числа, формы и интенсивности пиков, обусловленных валентными и деформационными колебаниями групп –СН <sub>3</sub>	Участие групп –СН <sub>3</sub> в процессе связывания белковой глобулы с матрицей носителя	
1450-1380 см <sup>-1</sup>	Модификация числа, формы и интенсивности пиков, обусловленных валентными и деформационными колебаниями групп –СН <sub>3</sub>	Участие групп –СН <sub>3</sub> в процессе связывания белковой глобулы с матрицей носителя	

Волокнистый катионит ВИОН КН-1 имеет в качестве функциональных групп карбоксильные группировки. Характерные полосы поглощения катионита на ИК-спектрах приведены в табл. 34, а изменения в спектрах ионита после иммобилизации инулиназы – в табл. 35.

Таблица 34

## Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах ионита ВИОН КН-1

Полоса поглощения	Чем обусловлена (Углянская В.А., 1989)
3427-3360 см <sup>-1</sup>	колебания спиртовых групп
2927 см <sup>-1</sup>	колебания метильно-метиленовых групп
2867 см <sup>-1</sup>	колебания метильно-метиленовых групп
1721-1670 см <sup>-1</sup>	колебания групп –СООН: $\nu$ С=О
1454 см <sup>-1</sup>	колебания метильно-метиленовых групп
1401 см <sup>-1</sup>	колебания метильно-метиленовых групп
1200-1100 см <sup>-1</sup>	колебания групп –СООН: $\nu$ С–О и $\delta$ ОН
1134-1035 см <sup>-1</sup>	колебания спиртовых групп
748 см <sup>-1</sup>	колебания метильно-метиленовых групп

Таблица 35

Изменения в ИК-спектрах ионита ВИОН КН-1 после иммобилизации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*

Полоса поглощения	Изменения	Вероятная причина изменений после иммобилизации инулиназы из <i>Kluyveromyces marxianus</i>
1727-1670 см <sup>-1</sup>	Расщепление полосы на два четко выраженных пика	Связывание белковой глобулы с матрицей носителя за счет электростатических взаимодействий между СООН–группами ионита и положительно заряженными аминокислотными остатками инулиназы
1200-1100 см <sup>-1</sup>	Расщепление полосы на два четко выраженных пика	Связывание белковой глобулы с матрицей носителя за счет электростатических взаимодействий между СООН–группами ионита и положительно заряженными аминокислотными остатками инулиназы

Так как ряд полос поглощения инулиназы и ионитов перекрываются друг с другом, для того, чтобы оценить изменения, происходящие в структуре фермента, мы анализировали не ИК-спектр иммобилизованного энзима, а спектр, полученный путем вычитания значений коэффициента поглощения  $\alpha$  для ионита из значений  $\alpha$  для носителя с иммобилизованным на нем белком.

На полученном таким образом спектре для иммобилизованной на АВ-17-2П инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* мы наблюдаем изменение формы и снижение интенсивности пиков 3400-3200, 3000-2100, 1690-1630, 1560-1520, 1255, 1049, 868  $\text{см}^{-1}$ , что может свидетельствовать, в первую очередь, о перестройках в белковой глобуле, компактизации молекулы фермента, а также выходе на ее поверхность дополнительного числа боковых аминокислотных остатков аргинина, лизина и гистидина.

При адсорбции инулиназы I, выделенной из клубней *Helianthus tuberosus*, на матрицах катионообменных смол КУ-2, КУ-2-8чС и анионитов АВ-17-2П, ЭДЭ-10, АН-12П и инулиназы из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* на КУ-2 и ВИОН КН-1 мы наблюдали снижение интенсивности и изменение формы пиков в областях 3000-2800, 1049 и 868  $\text{см}^{-1}$ , соответствующих зоне поглощения алифатических аминокислотных остатков. Модификации аналогичного рода были выявлены в полосах амид I (1690-1630  $\text{см}^{-1}$ ) и амид II (1560-1520  $\text{см}^{-1}$ ), что может свидетельствовать о более плотной упаковке гидрофобного ядра белковой молекулы по сравнению с нативной формой фермента, что, по-видимому, является одной из основных причин снижения каталитической активности энзима после его иммобилизации. При сорбции инулиназы I из *Helianthus tuberosus* на катионитах КУ-2 и КУ-2-8чС и инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на волокне ВИОН КН-1 мы наблюдали исчезновение пика фермента в области 3400-3200  $\text{см}^{-1}$ , характеризующего различные типы колебаний  $\text{NH}_2$ -групп. Этот факт, вероятно, связан с тем, что боковые аминокислотные группы аргинина,

лизина и гистидина образовали множественные электростатические связи с сульфо- и карбоксильными группами катионообменных полимеров.

Изменения в полосах амид III ( $1255\text{ см}^{-1}$ ) и амид IV ( $1050\text{ см}^{-1}$ ) в модифицированных спектрах препарата инулиназы из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованного на катионитах КУ-2, КУ-2-8чс и анионите АН-12П, и инулиназы из *Kluveromyces marxianus*, адсорбированной на катионообменной смоле КУ-2 и катионообменном волокне ВИОН КН-1, вероятно, свидетельствуют о значительных структурных перестройках в молекуле фермента.

При иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus* на анионообменных смолах АВ-17-2П и АН-12П и инулиназы из *Kluveromyces marxianus* на катионите ВИОН КН-1 мы наблюдали изменение формы и снижение интенсивности и максимумов пиков в области колебаний СН-групп ненасыщенных и ароматических соединений ( $2100\text{-}3000\text{ см}^{-1}$ ), что может быть обусловлено существенными перестройками в глобуле белка.

Ниже мы попытались установить роль водородных связей в процессе адсорбции молекул дрожжевой и растительной инулиназы на катионообменных и анионообменных смолах и волокнах, анализируя ИК-спектры свободных и иммобилизованных ферментов.

Полоса поглощения  $3700\text{-}3500\text{ см}^{-1}$  соответствует свободной ОН-группе в парах вещества или в неполярных растворителях. Уменьшение этих значений указывает на взаимодействие ОН-группы, например, по типу водородной связи  $\text{OH}\cdots\text{O}$  (Сливкин А.И., 1999).

Смещения пиков свободной ОН-группы в область более низких значений частоты колебаний или усиления полосы поглощения в спектрах иммобилизованных инулиназ по сравнению со свободными не наблюдалось, что позволяет нам сделать предположение о том, что водородная связь не является ведущей при связывании молекулы энзима с матрицей большинства используемых нами носителей. Только в одном случае было обнаружено смещение пиков свободной ОН-группы в область более низких значений



частоты колебаний – при иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus* на анионите АН-12П, что может свидетельствовать о значительной роли водородной связи при формировании комплекса «фермент-носитель».

Далее мы исследовали степень изменения вторичной структуры для инулиназ из дрожжей *Kluveromyces marxianus* и клубней *Helianthus tuberosus* при их адсорбции на синтетических ионообменных смолах и волокнах (табл. 36, 37).

Таблица 36

Содержание типов вторичной структуры в молекуле инулиназы из *Kluveromyces marxianus* в свободном и иммобилизованном состояниях

Конформация	Содержание структуры в нативной инулиназе, %	Содержание структуры в иммобилизованной инулиназе, %		
		на АВ-17-2П	на КУ-2	на ВИОН КН-1
$\alpha$ -спирали	27	40	30	26
$\beta$ -слои	28	17	36	38
Неупорядоченная структура	45	43	34	36

Таблица 37

Содержание типов вторичной структуры в молекуле инулиназы из *Helianthus tuberosus* в свободном и иммобилизованном состояниях

Конформация	Содержание структуры в нативной инулиназе, %	Содержание структуры в иммобилизованной инулиназе, %				
		на АВ-17-2П	на КУ-2	на КУ-2-8чс	на АН-12П	на ЭДЭ-10
$\alpha$ -спирали	25,5	28	46	45	40	43
$\beta$ -слои	37	39	25	26	41	23
Неупорядоченная структура	37,5	33	29	29	19	34

Наряду со снижением каталитической способности, при иммобилизации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на полимерных синтетических носителях КУ-2 и ВИОН КН-1 уменьшается количество неупорядоченных структур в молекуле фермента: на 11 и 9 % соответственно; увеличивается количество  $\beta$ -слоев: на 8 и 10 % соответственно, что указывает, вероятно, на компактизацию белковой глобулы в процессе адсорбции и возникновение стерических препятствий для проникновения молекулы инулина к активному центру фермента. Интересно отметить еще и тот факт, что при сорбции на анионообменной смоле АВ-17-2П происходит заметное увеличение количества  $\alpha$ -спиральных участков (на 13 %) и уменьшение числа структур, содержащих  $\beta$ -слои (на 11 %). Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что механизмы взаимодействия инулиназы из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* с матрицами катионо- и анионообменных полимеров принципиально отличаются друг от друга: в процессе адсорбции принимают участие разные участки белковой глобулы и в результате происходят различные конформационные перестройки в молекуле энзима.

При адсорбции инулиназы I из клубней *Helianthus tuberosus* на всех исследуемых носителях мы наблюдали уменьшение количества нерегулярных участков в белковой глобуле, причем какой-либо корреляции между процентом сохранения активности иммобилизованного препарата по сравнению со свободным и структурными перестройками  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев и неупорядоченных участков мы не обнаружили. В связи с этим можно заключить, что процесс адсорбции для каждого исследуемого носителя протекает по сложному индивидуальному механизму и трудно прогнозировать типы структурных изменений в молекуле фермента в зависимости от химической природы матрицы сорбента, с которым он взаимодействует.

### 5.7. Механизм адсорбционной иммобилизации инулиназы на ионитах и хитозане

Исходя из наших собственных результатов, полученных для инулиназы, и литературных данных, мы предлагаем следующую схему процесса ее адсорбционной иммобилизации на ионообменных смолах, волокнах и других агентах, имеющих на поверхности положительные или отрицательные заряды, например, хитозане (рис. 127).

ИК-спектроскопические исследования позволяют предположить, что при адсорбционной иммобилизации взаимодействие осуществляется между функциональными группами носителей и карбоксильными или аминокислотными группами белка, расположенными на внешних областях глобулярной структуры. Было обнаружено, что адсорбция фермента сопровождается изменением состояния гидратной оболочки носителя. Изучение состояния воды представляет интерес и потому, что адсорбционная иммобилизация гидролаз на ионитах протекает в водных растворах, и вода является не только средой, но и реагентом. Установлено, что непосредственному взаимодействию белка с носителем предшествует вытеснение воды из фазы ионита. Исключение растворителя из области связывания фермент-носитель приводит к увеличению числа центров адсорбции (Шкутина И.В., 2004, 2009).

Проведенный И.В. Шкутиной, О.Ф. Стояновой и В.Ф. Селеменевым (2004) анализ кинетических кривых процесса иммобилизации инулиназы и глюкоамилазы показывает, что в начальный момент времени контакта сорбента с раствором фермента происходит достаточно резкое увеличение количества белка в фазе носителя, что можно охарактеризовать как ионообменное поглощение энзима. Однако со временем на кинетических кривых отмечается спад значений содержания белка. Процесс десорбции на данном этапе, вероятно, связан с возрастающей долей необменно

сорбированной гидролазы, и, как следствие, слабым закреплением сорбата на поверхности сорбента и выделением некоторого количества белка в раствор.

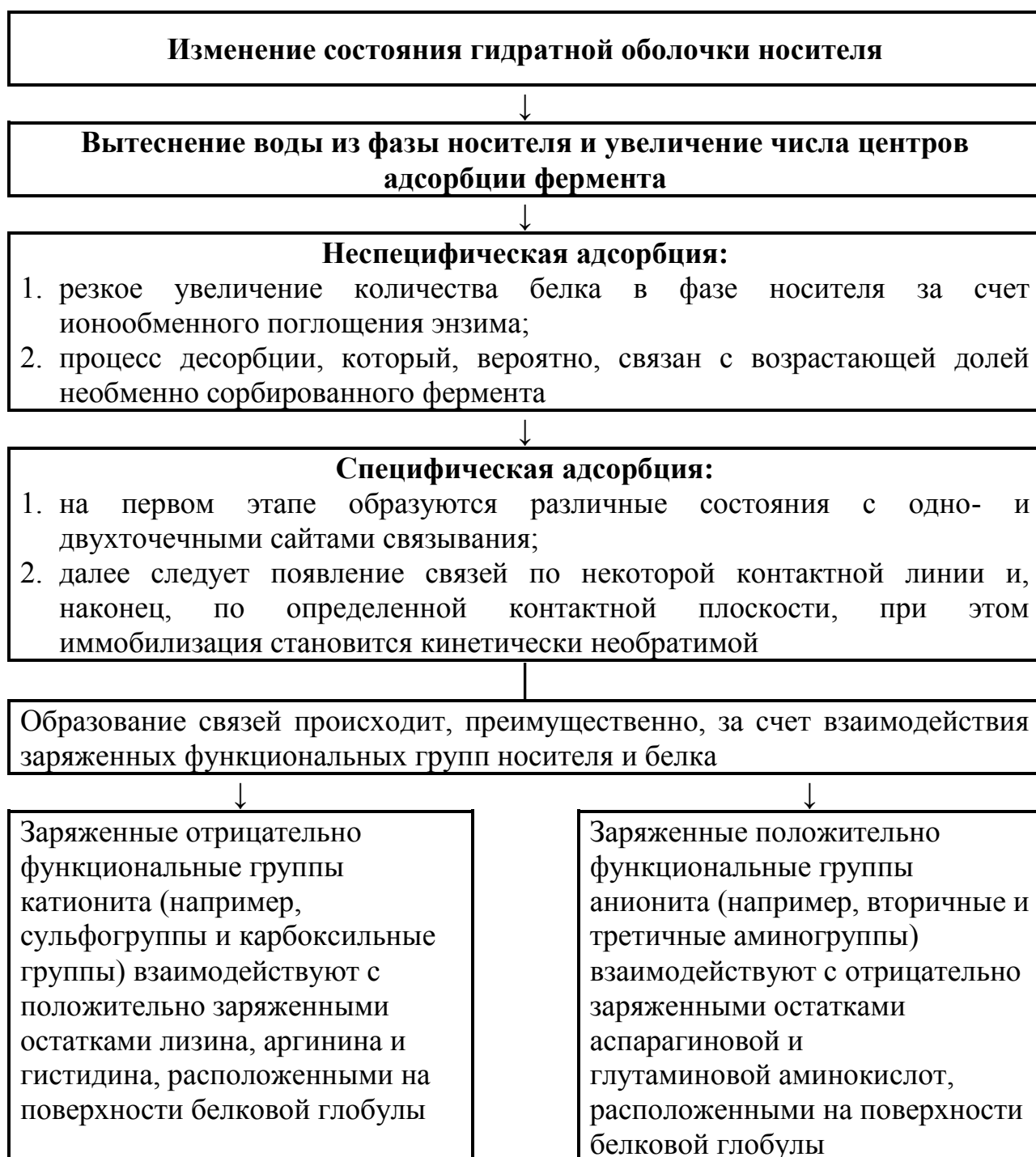


Рис. 127. Гипотетическая схема процессов адсорбционной иммобилизации инулиназы на ионитах и хитозане

Сложность фермента как адсорбата связана с неоднородностью его свойств: олигомерностью, присутствием на поверхности неодинаковых контактных участков, возможностью многоточечного связывания макромолекулы с носителем. Поэтому при контакте белка с ионообменными смолами и волокнами необходимо учитывать не только электростатические, но и возможные при этом ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия между ними.

Образованию прочных связей, вероятно, предшествует неспецифическая адсорбция. Специфические взаимодействия возникают не одновременно. Сначала образуются различные состояния с одно- и двухточечными центрами связывания, а за ними следует появление взаимодействий по некоторой контактной линии и, наконец, по определенной контактной плоскости, при этом иммобилизация становится кинетически необратимой (Шкутина И.В., 2004, 2009).

С помощью метода ИК-спектроскопии было показано, что связывание инулиназы с матрицами различных (преимущественно заряженных) носителей происходит в основном за счет электростатических взаимодействий. Исходя из полученных в нашей лаборатории результатов, выше мы подчеркивали, что механизмы взаимодействия фермента с матрицей катионо- и анионообменных полимеров принципиально отличаются друг от друга: в процессе адсорбции принимают участие разные участки белковой глобулы, обуславливая тем самым различные конформационные перестройки в молекуле энзима.

#### 5.8. Оптимизация условий сорбции инулиназы на матрице ионообменной смолы КУ-2

Известно, что закономерности сорбции веществ в различных системах определяются не только природой сорбата и сорбента, но и условиями проведения процесса. Одним из факторов, влияющих на равновесие,

кинетику и динамику в сорбционных системах, является температура. Работы, отражающие действие этого фактора на поглощение веществ ионообменниками крайне разрознены, а в области кинетики их практически нет. Однако температура является одним из самых легко варьируемых факторов, существенно влияющих на характеристики процессов поглощения. Таким образом, требуются дополнительные систематические исследования в этой области. Повышение температуры приводит к изменению физико-химических свойств сорбата и сорбента, смещает области существования ионных форм, но не приводит к их перезарядке (Хохлов В.Ю., 2003). Для аминокислот, например, характерно увеличение растворимости и степени диссоциации функциональных групп. С другой стороны, повышение температуры влияет на свойства сорбента – приводит к увеличению степени его набухания и усилению протолиза функциональных групп (Загородний А.А., 1995). Кроме того, при рассмотрении процессов сорбции необходимо учитывать, что силы закрепления сорбата на сорбенте слабые, а при повышении температуры усиливается тепловое движение молекул, разрушается сетка водородных связей, что способствует ослаблению взаимодействий с матрицей сорбента (Еременко В.А., 2007, Хохлова О.Н., 2012).

В сорбционных системах с участием белков и аминокислот изменение условий сорбции может приводить к смене не только величины поглощения, но и механизма сорбции (например, к переключению с ионообменного поглощения на необменную сорбцию), что особенно проявляется при введении в систему веществ, приводящих к изменению рН среды (Хохлов В.Ю., 2008).

Ионообменному поглощению белков, аминокислот и многокомпонентных смесей с их участием посвящено большое количество работ, в том числе при различных рН, используемых для градиентного элюирования при разделении цвиттерлитов. Однако присутствие электролитов (в частности буферных систем) в растворах усложняет систему

из-за взаимного влияния компонентов, а в случае присутствия минеральных кислот или оснований возможна перезарядка аминокислот на поверхности молекулы белка и смена механизма поглощения (Карлашова Т.С., 2014).

Исследование процессов иммобилизации ферментов предполагает эффективное сочетание подбора носителя с различными условиями и параметрами системы, обеспечивающее максимальное сохранение активности энзима в твердой фазе. В связи с вышесказанным мы оптимизировали процедуру иммобилизации инулиназы на ионообменной смоле КУ-2. Для этого сорбционную иммобилизацию осуществляли при варьировании условий: к 5 г носителя в 50 мл ацетатного буфера, рН 3,0-5,5 добавляли раствор фермента (5 мл в различной концентрации) и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 0,5-2,5 часов при 25-60 °С, после чего смесь центрифугировали в течение 5 мин при 250 g. Полученный препарат промывали в ацетатном буфере для удаления несвязанного белка.

Установлено, что наиболее перспективные условия для иммобилизации инулиназы на матрице КУ-2 следующие: 25 °С, рН 4,5, время инкубации 1,5 часа, содержание белка в иммобилизационном растворе 10 мг/г носителя (табл. 38-41).

При иммобилизации инулиназы в различных количественных соотношениях фермент/носитель (от 1 до 100 мг белка на 1 г носителя) мы получили следующие результаты: ИК-спектры гетерогенных катализаторов практически не отличались друг от друга при соотношении компонентов 10, 20, 50 и 100 мг/г ионита (рис. 128, 129).

Таблица 38

Зависимость каталитической активности гетерогенного препарата инулиназы, иммобилизованной на катионите КУ-2, от температуры (рН 4,5, содержание белка 10 мг/г носителя в ходе иммобилизации, время инкубации 1,5 часа)

Температура, °С	Каталитическая активность	
	ед/г носителя	ед/мг белка
25	208±11,2	21±1,4
30	203±13,1	21±4,2
35	205±14,7	24±3,8
40	201±15,2	24±4,1
50	189±16,8	22±7,1
60	132±17,2	21±6,4

Таблица 39

Зависимость каталитической активности гетерогенного препарата инулиназы, иммобилизованной на катионите КУ-2, от рН среды (25 °С, содержание белка 10 мг/г носителя в ходе иммобилизации, время инкубации 1,5 часа)

рН среды	Каталитическая активность	
	ед/г носителя	ед/мг белка
3,5	282±13,4	13±2,2
4,0	240±12,7	17±2,4
4,5	208±11,2	21±1,4
5,0	170±13,1	20±4,7
5,5	154±14,2	16±2,7



Таблица 40

Зависимость каталитической активности гетерогенного препарата инулиназы, иммобилизованной на катионите КУ-2, от времени инкубации (25 °С, рН 4,5, содержание белка 10 мг/г носителя в ходе иммобилизации)

Время инкубации, ч	Каталитическая активность	
	ед/г носителя	ед/мг белка
0,5	118±16,4	21±2,7
1,0	172±13,7	20±3,2
1,5	208±11,2	21±1,4
2,0	213±13,1	19±3,4
2,5	222±14,4	18±3,0

Таблица 41

Зависимость каталитической активности гетерогенного препарата инулиназы, иммобилизованной на катионите КУ-2, от соотношения компонентов в системе фермент/носитель (25 °С, рН 4,5, время инкубации 1,5 часа)

Содержание белка, мг/г носителя, в ходе иммобилизации	Каталитическая активность	
	ед/г носителя	ед/мг белка
1	22±2,2	22±2,1
2	43±4,1	21±2,4
10	208±11,2	21±1,4
20	360±12,9	18±1,5
50	820±22,1	16±3,1
100	1025±30,0	10±2,3

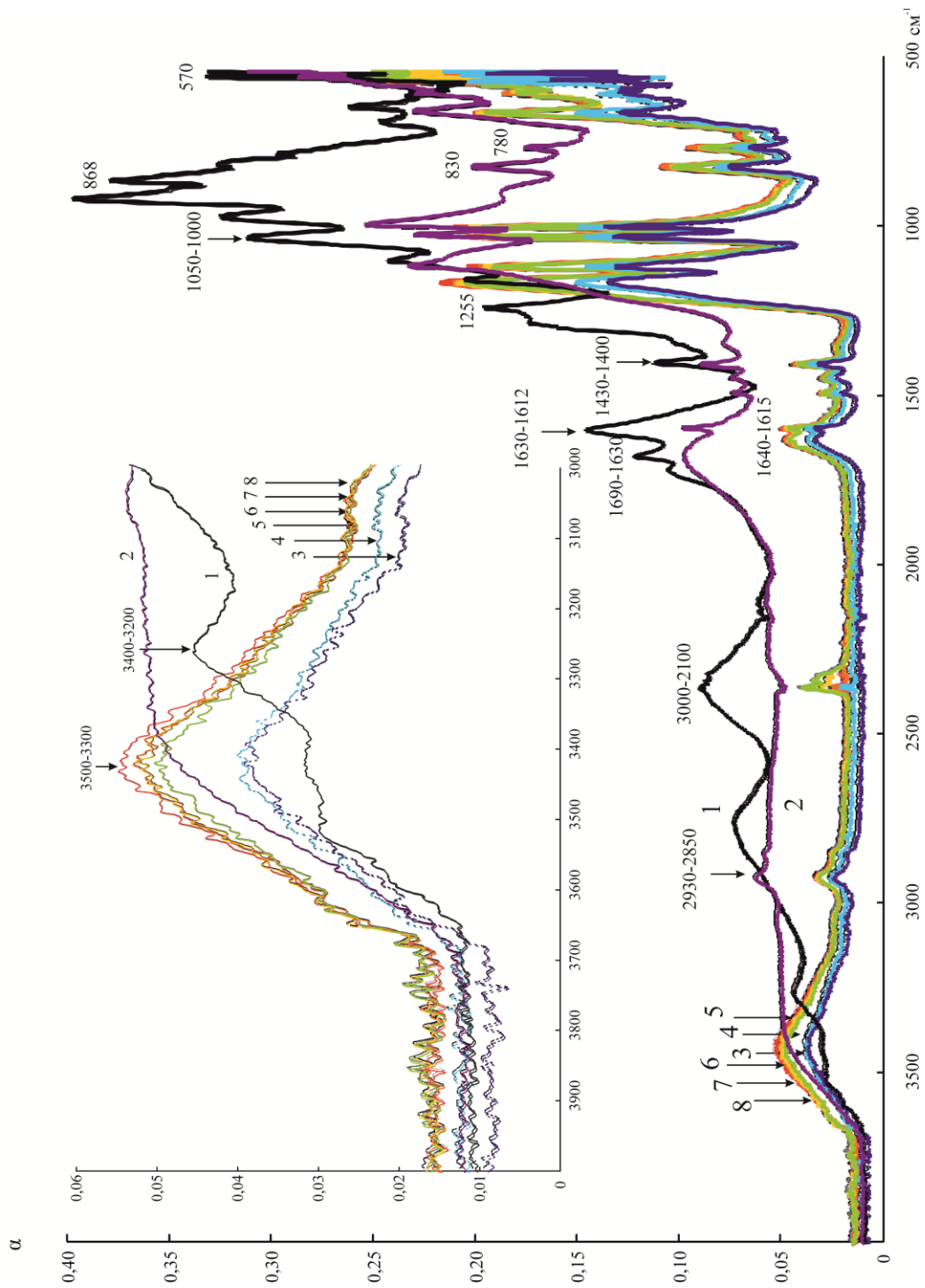


Рис. 128. ИК-спектры в диапазоне  $4000-500 \text{ см}^{-1}$  ионита КУ-2 (1), инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 (2) и гетерогенных препаратов энзима при соотношении компонентов системы фермент/носитель  $1 \text{ мг/1 г}$  (3),  $2 \text{ мг/1 г}$  (4),  $10 \text{ мг/1 г}$  (5),  $20 \text{ мг/1 г}$  (6),  $50 \text{ мг/1 г}$  (7) и  $100 \text{ мг/1 г}$  (8):  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого вещества

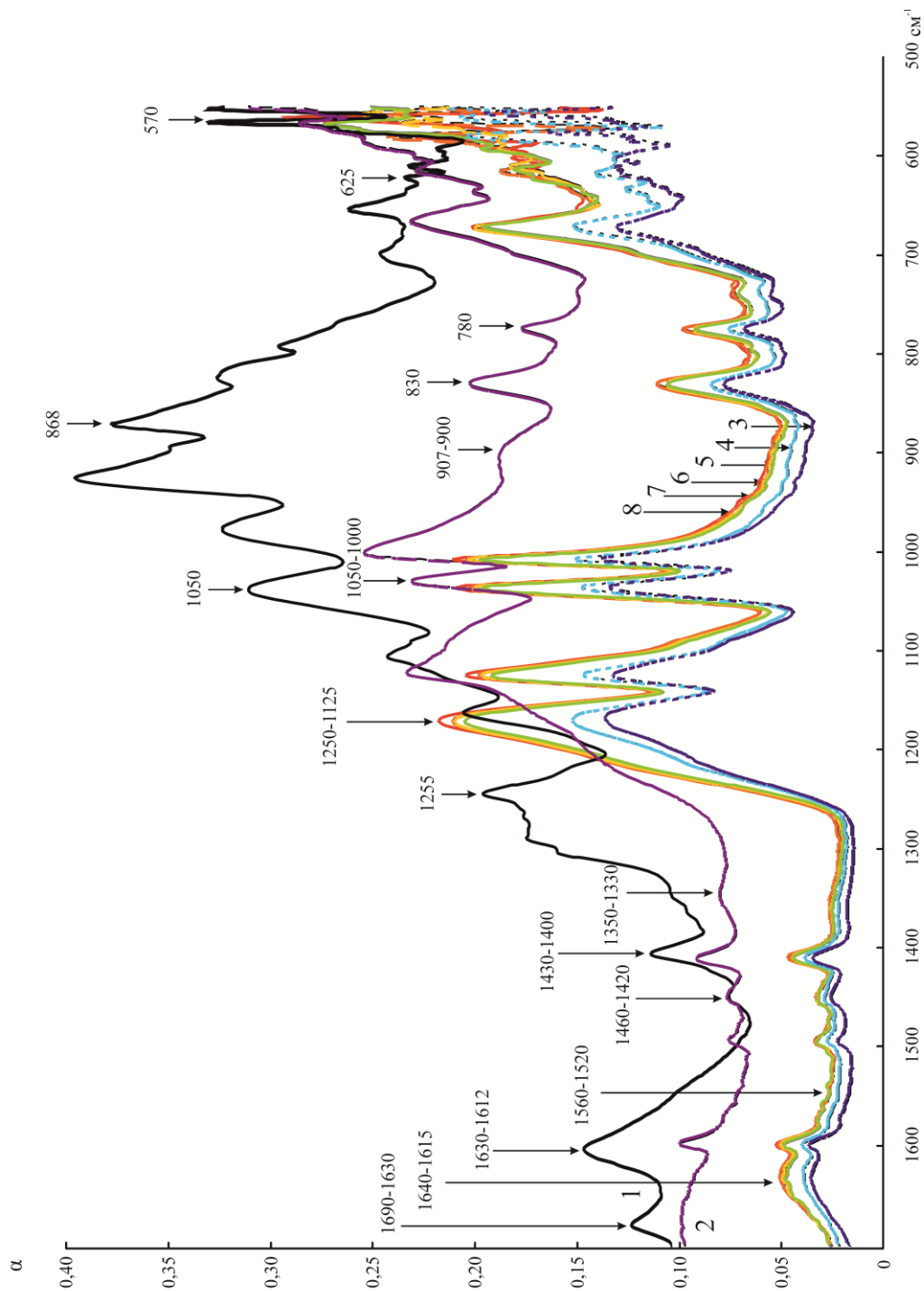


Рис. 129. ИК-спектры в диапазоне 1700-500 см<sup>-1</sup> ионита КУ-2 (1), инулиназы из *Кluyveromyces marxianus* Y-303 (2) и гетерогенных препаратов энзима при соотношении компонентов системы фермент/носитель 1 мг/1г (3), 2 мг/1г (4), 10 мг/1г (5), 20 мг/1г (6), 50 мг/1г (7) и 100 мг/1г (8): α – коэффициент поглощения изучаемого вещества

Каталитическая способность гетерогенного препарата также не увеличивалась пропорционально концентрации белка в системе (табл. 41), что позволило нам выдвинуть следующее предположение: после заполнения пор и участия в образовании связей максимально возможного числа активных групп ионита, адсорбция инулиназы осуществлялась уже не на матрицу носителя, а на молекулы самого фермента (сорбат-сорбатные взаимодействия), что приводило к экранизации ряда активных центров гидролиза инулина и снижению удельной каталитической активности препарата при увеличении содержания белка на поверхности катионита до 20 мг/г носителя и выше. Подобный эффект отрицательного влияния высоких концентраций фермента на выход иммобилизации инулиназы отмечен в работе (Garlet T.B., 2014). И.В. Шкутиной и соавт. (2004) показано, что в начальный момент времени контакта сорбента с раствором инулиназы из *Aspergillus awamori* происходит резкое увеличение количества белка в фазе носителя, однако, со временем на кинетических кривых процесса сорбции отмечался спад. Авторы предположили, что процесс десорбции на данном этапе, связан с возрастающей долей необменно сорбированного фермента, и, как следствие, слабым закреплением сорбата на поверхности сорбента и выделением некоторого количества белка в раствор. В своих исследованиях, мы, по-видимому, столкнулись с тем же эффектом – наличием в системе фермент/носитель определенного количества необменно адсорбированного белка. Однако в отличие от работ И.В. Шкутиной и др. (2004), в нашем эксперименте процесс десорбции был менее выражен, возможно, из-за более прочного связывания молекул дрожжевой инулиназы *Kluyveromyces marxianus* друг с другом, по сравнению с ферментом грибного происхождения (из *Aspergillus awamori*).

Нами были получены микрофотографии поверхности катионита КУ-2 и гетерогенных препаратов инулиназы при соотношении компонентов фермент/носитель – 10 мг/г (рабочая концентрация) и 100 мг/г с увеличением в 110, 10000 и 50000 раз (рис. 130).

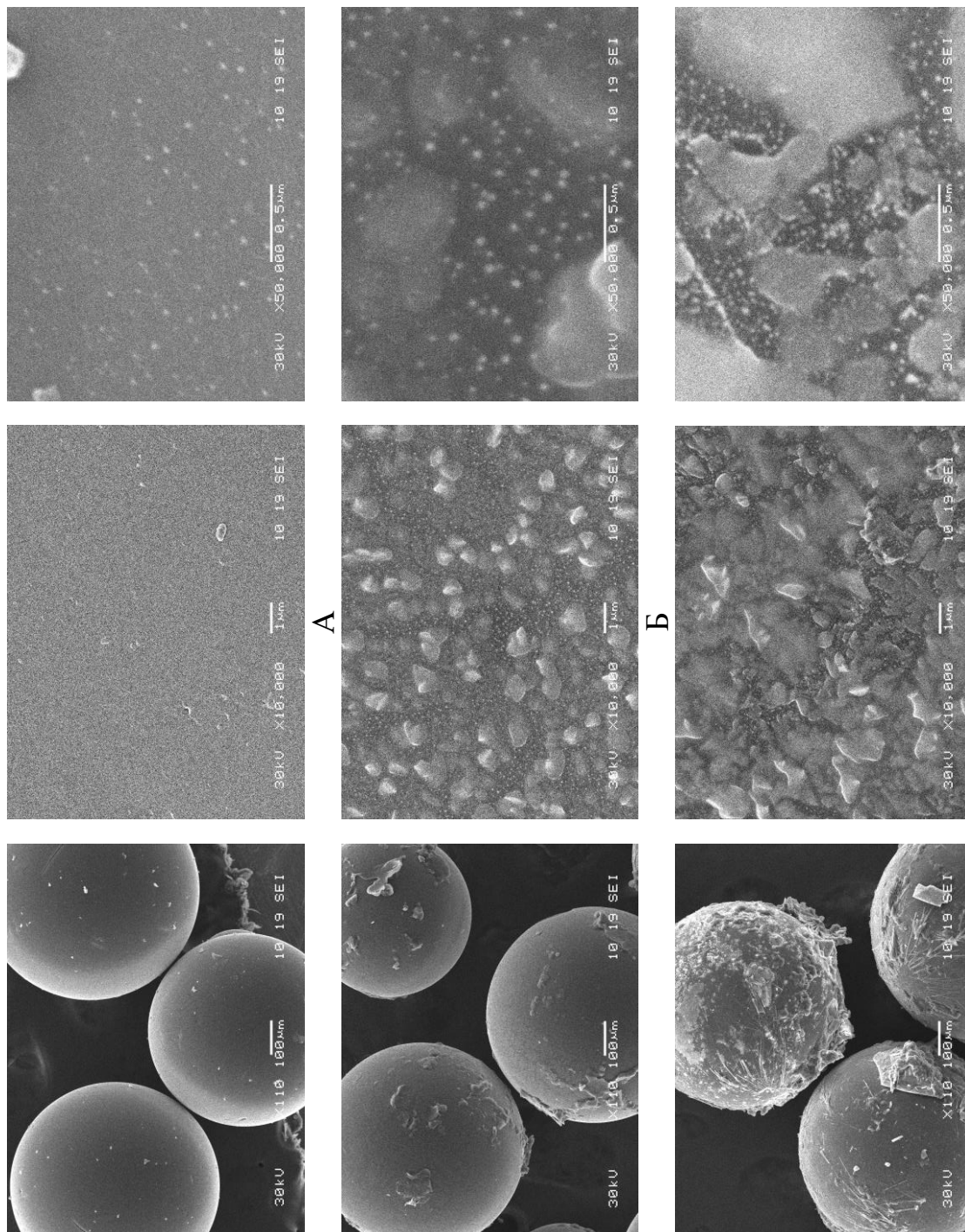


Рис. 130. Микрофотографии поверхности ионита КУ-2 (А) и гетерогенных препаратов инулиназы при соотношении компонентов системы фермент/носитель – 10 мг/1г (Б) и 100 мг/1г (В)

На рис. 130 отчетливо видно, что при повышении концентрации инулиназы в системе она образует локальные участки высокой концентрации на поверхности ионита, что подтверждает высказанную гипотезу о необменном характере сорбции белка при его высокой концентрации в растворе. Таким образом, при определении оптимального соотношения фермент/носитель в ходе процесса иммобилизации необходимо учитывать тот факт, что при увеличении в растворе содержания инулиназы по отношению к доле катионита, она образует локальные участки с высокой концентрацией на поверхности гранул ионообменной смолы КУ-2. После заполнения пор и активных заряженных групп катионита, адсорбция фермента осуществляется, вероятно, уже не на матрицу носителя, а на молекулы самого белка, т.е. в системе инулиназа/КУ-2 присутствует определенное количество необменно сорбированного энзима, закрепленного с помощью сорбат-сорбатных взаимодействий.

Для описания сорбции веществ ионообменниками и интерпретации экспериментальных данных применяется множество моделей, основанных на законе действующих масс. В настоящее время широкое распространение получила модель образования поверхностных комплексов (Хохлов В.Ю., 2010). Основные положения этой теории предполагают, что каждый поглощенный компонент локализуется вблизи поверхности сорбента в виде поверхностного комплекса (Хёлль В.Х., 2004).

Знание механизмов сорбции белков на ионитах расширяет возможности в изучении их свойств и является важным дополнением к гидродинамическим методам анализа размеров и формы глобулярных белков. Наряду с этим изучение электрохимических характеристик макромолекул сорбционными методами позволяет получить ряд дополнительных сведений по сравнению с результатами потенциометрического титрования, в частности проводить анализ распределения функциональных групп, несущих заряды, в глобуле белка.

## Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ИНУЛИНАЗ

### 6.1. Оптимумы функционирования инулиназ, иммобилизованных на различных носителях

Изучение физико-химических особенностей и кинетических свойств гетерогенных ферментных препаратов позволяет выявить оптимальные условия для их функционирования, что способствует более рациональному использованию иммобилизованных образцов в производственных циклах. Нами были получены достаточно активные препараты иммобилизованной инулиназы, выделенной из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* и клубней *Helianthus tuberosus*, определены оптимальные условия их функционирования, а также исследованы физико-химические свойства гетерогенных биокатализаторов и кинетические аспекты реакции гидролиза инулина.

Оптимумы функционирования иммобилизованных дрожжевой и растительной инулиназы представлены в табл. 42. Повышение оптимума температуры и сдвиг рН-оптимумов часто наблюдаются после иммобилизации ферментов (Ghada E.A., 2017, Elnashar M.M., 2009, Danial E.N., 2010), но не являются обязательными (De Paula F.C., 2008, Risso F.V., 2010).

Таблица 42

Оптимумы функционирования препаратов инулиназы из *Kluuveromyces marxianus* и *Helianthis tuberosus*

Препараты инулиназы	Температурный оптимум	Оптимум pH
Инулиназа из <i>Kluuveromyces marxianus</i> в свободном состоянии	50 °С	4,7
Инулиназа из <i>Kluuveromyces marxianus</i> при иммобилизации на		
АВ-17-2П	70 °С	4,5-4,7
ВИОН КН-1		
КУ-2		4,7
Инулиназа из <i>Helianthis tuberosus</i> в свободном состоянии		
инулиназа I	48 °С	6,8
инулиназа II	39 °С	6,2
инулиназа III	44 °С	4,5
Инулиназа I из <i>Helianthis tuberosus</i> при иммобилизации на		
КУ-2	60-70 °С	5-7
КУ-2-8чС		
АВ-17-2П		

## 6.2. Аппроксимация каталитической активности свободной и иммобилизованной инулиназы из *Kluuveromyces marxianus* как функции концентрации субстрата, pH и температуры

Информация о физико-химических и кинетических параметрах (константах скоростей, энергиях активации, энтальпиях, энтропиях и т.п.) реакции фермент-субстрат может быть получена при исследовании скорости этих реакций в зависимости от различных факторов – концентрации субстрата ( $S$  или  $pS$ ), pH, температуры ( $t$ ). В этом разделе приводятся результаты извлечения указанных параметров из экспериментально полученных нами зависимостей. Непосредственно измеряется, как правило, не сама скорость реакции  $v$ , а некая величина, пропорциональная этой



скорости (в данной работе такой величиной является активность фермента  $A$ ).

Ниже анализируются полученные в ходе экспериментов зависимости  $A(t)$ ,  $A(\text{pH})$  и  $A(S)$  активности инулиназы, иммобилизованной на различных носителях. Для извлечения из них соответствующих физико-химических и кинетических параметров реакций используется аппроксимация полученных кривых теоретическими формулами (зависимостями от  $t$ ,  $\text{pH}$  и  $S$ ), содержащими эти параметры. Для такой аппроксимации можно использовать любой программный пакет статистического анализа данных; мы применили функцию `NonlinearModelFit` пакета `Mathematica`. По своей сути такая аппроксимация есть оптимизация (минимизация) функции невязки (как правило, суммы квадратов невязок в различных экспериментальных точках), т.е. разницы между значениями  $A$ , полученными экспериментально и предсказанными соответствующей теоретической формулой. Нелинейный характер такой оптимизации может потребовать применения различных математических методов, которые кратко перечислены в табл. 43. Из-за нелинейности результаты оптимизации также зависят от особенностей модели – например, от выбора начальных приближений («initial guesses») для поиска искомых параметров, входящих в теоретические формулы, а также от наличия ограничений на эти параметры (другими словами, от области в пространстве параметров, по которой проводится оптимизация). Обозначения для указанных особенностей (типов, модификаций) применяемых здесь моделей приведены в табл. 44.

Таблица 43

Сокращенные обозначения для методов нахождения минимума невязки

Код	Описание
CG	Метод сопряженных градиентов (ConjugateGradient)
PA	Метод главных осей (PrincipalAxis)
LM	Алгоритм Левенберга-Марквардта (LevenbergMarquardt)
N	Метод Ньютона (Newton)
QN	Семейство квази-ньютоновских методов (QuasiNewton)
NM	Семейство методов глобальной минимизации (NMinimize)
IP	Метод внутренних точек (InteriorPoint)

Таблица 44

Сокращенные обозначения для типов используемых моделей

Коды	Описание
c	Модель с ограничением (constrained): все параметры должны быть положительными
u	Модель без ограничений (unconstrained): параметры могут быть и отрицательными
g	Нет стартовых значений параметров – поиск «глобального» минимума невязки
l	Задаются стартовые значения параметров – поиск «локального» минимума невязки

Проведенный анализ показывает, что различные комбинации типов моделей с методами оптимизации могут приводить к сильно различающимся результатам. Это может быть связано с рядом причин. Например, оптимизационный алгоритм может находить не глобальный, а один из локальных минимумов невязки. Кроме того, сама функция невязки может быть устроена так, что ее минимум имеет «платообразный» характер, т.е. значения функции (близкие к минимуму, даже глобальному) мало отличаются для целой области параметров. Практически это выражается в том, что могут быть получены несколько аппроксимационных зависимостей (формул) с сильно отличающимися параметрами. При этом эти зависимости визуально будут примерно одинаково аппроксимировать экспериментальные точки. В таких случаях вопрос об окончательном выборе параметров из анализа экспериментальных данных должен решаться из других соображений. Например, можно отсеять те значения параметров, которые не согласуются с ожидаемыми на несколько порядков или имеют не тот знак. Поскольку при анализе можно потребовать нахождения только положительных значений параметров (модели с-типа), то сам факт получения отрицательных значений таких параметров в других типах моделей (u-типа, т.е. без ограничения) должен ставить вопрос об адекватности самого уравнения модели как такового для данной экспериментальной ситуации. Часто такая неадекватность вызвана малым числом точек на экспериментальной зависимости. В таких случаях нужно налагать ограничения на значения параметров (модели с-типа), основываясь на каких-то физических или химических доводах. Некоторые выводы можно также сделать из математических соображений. Например, некоторую информацию о качестве аппроксимации дает величина  $R^2$ ; кроме того, предпочтительны те значения параметров, которые менее всего зависят от типа модели и метода оптимизации. Среди последних, в свою очередь, приоритет имеют значения, полученные с меньшим доверительным интервалом. Следует, однако, отметить, что из-за нелинейности нарушается предположение о гауссовости

разброса значений параметров модели, поэтому выдаваемые процедурой NonlinearModelFit доверительные интервалы могут никак не отражать степень разброса искомым параметров.

### 6.2.1. Зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной инулиназы из *Kluveromyces marxianus* от концентрации субстрата $A(S)$

#### 6.2.1.1. Простейшая модель: формула Михаэлиса

Для простейшей реакции фермент-субстрат ее скорость  $v$  описывается уравнением Михаэлиса (Диксон М., 1982)

$$v(S) = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S}} \quad (4),$$

где  $S$  – концентрация субстрата,  $K_m$  – константа диссоциации (константа Михаэлиса), а  $V_{\max}$  – предельная скорость реакции при насыщении (т.е. при  $S \rightarrow \infty$ ).

Поскольку как концентрации субстрата (инулина), так и константы Михаэлиса в эксперименте могут принимать значения в достаточно широком диапазоне, удобно работать не с ними непосредственно, а с их логарифмами:  $pK_m = -\lg K_m$ ,  $pS = -\lg S$ . Уравнение Михаэлиса (4) в этих переменных примет вид

$$v(S) = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{pS - pK_m}} = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{-\lg S - pK_m}} \quad (5).$$

В табл. 45 представлены результаты аппроксимации по формуле (5) экспериментально измеренной активности иммобилизованной инулиназы из *Kluveromyces marxianus*. Из таблицы видно, что получаемые параметры ( $V_{\max}$

и  $pK_m$ ) аппроксимационных кривых не зависят от выбора типа модели и метода оптимизации.

Таблица 45

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(\lg S)$  инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* формулой (5)

Препарат	$V_{max}$	$pK_m$	$R^2$	Модель:метод
Свободная инулиназа	$0,982 \pm 0,016$	$4,21 \pm 0,04$	0,998	ug:CG, ug:PA, ug:LM, ug:N,
Инулиназа/ВИОН КН-1	$0,355 \pm 0,030$	$3,63 \pm 0,08$	0,994	ug:QN, ul:CG,
Инулиназа/АВ-17-2П	$0,600 \pm 0,015$	$6,53 \pm 0,10$	0,976	ul:PA, ul:LM,
Инулиназа/АВ-16-ГС	$0,167 \pm 0,011$	$4,02 \pm 0,11$	0,978	ul:N, ul:QN,
Инулиназа/АМ 21А	$0,105 \pm 0,010$	$4,14 \pm 0,15$	0,886	ul:IP, cg:IP,
Инулиназа/КУ-2	$0,502 \pm 0,016$	$5,77 \pm 0,10$	0,951	cl:IP

Расчитанные с этими параметрами зависимости каталитической активности от логарифма концентрации субстрата  $A(\lg S)$  для инулиназы, иммобилизованной на различных носителях, представлены на рис. 131. Поскольку диапазоны концентрации для разных групп носителей различались, указанные зависимости удобно представить отдельно для двух групп носителей (рис. 132).

Аппроксимация экспериментальных точек к простой модели Михаэлиса (5) дает устойчивые (т.е. не зависящие от типа модели и метода оптимизации) значения параметров  $V_{max}$  и  $pK_m$ . Эти значения имеют разумный порядок величины и достаточно узкие доверительные интервалы. Однако визуально качество полученных аппроксимаций представляется недостаточным (см. рис. 132). Для некоторых носителей на рис. 132 вместо простой зависимости с одним плато (5) экспериментальные точки скорее укладываются на более сложные S-образные кривые. Это говорит о том, что

механизм исследуемой реакции должен описываться более сложными моделями, чем простое уравнение Михаэлиса (5). Эти модели рассматриваются нами ниже.

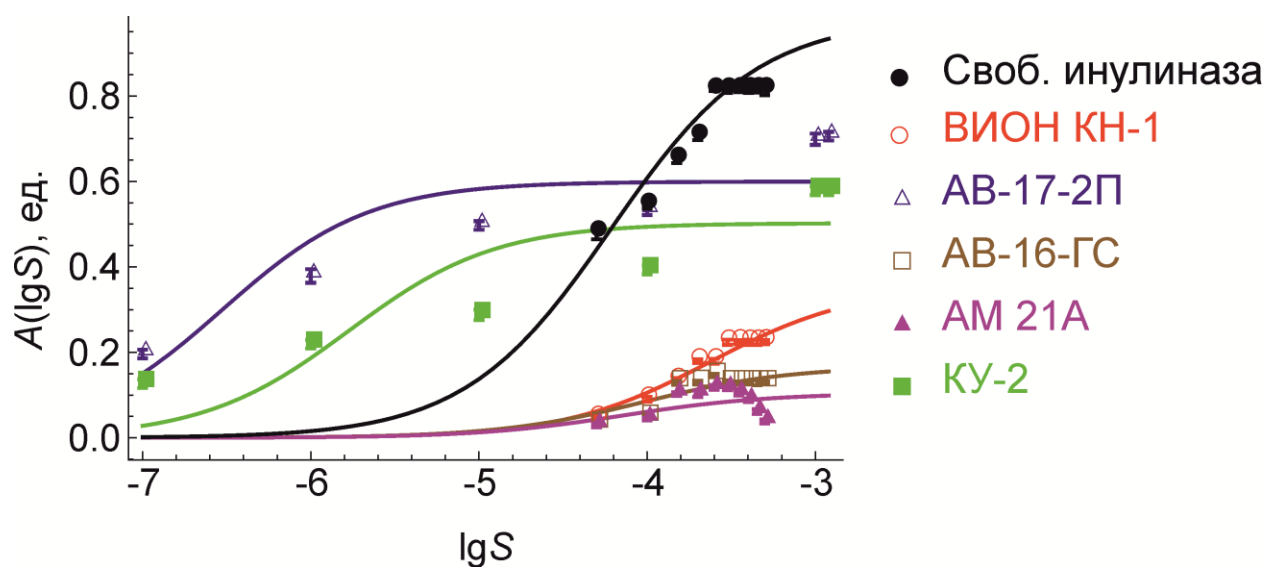


Рис. 131. Зависимости каталитической активности  $A(pS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л) для дрожжевой инулиназы, свободной и иммобилизованной на различных носителях. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

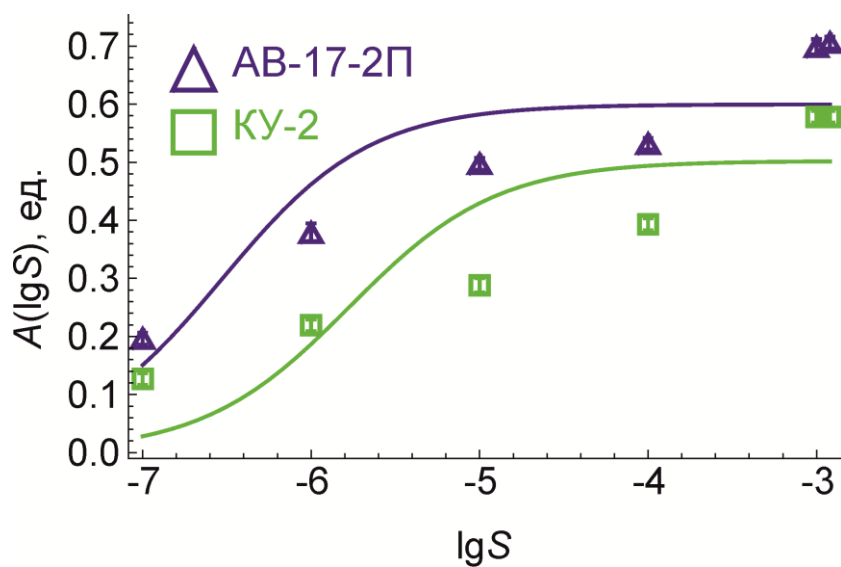
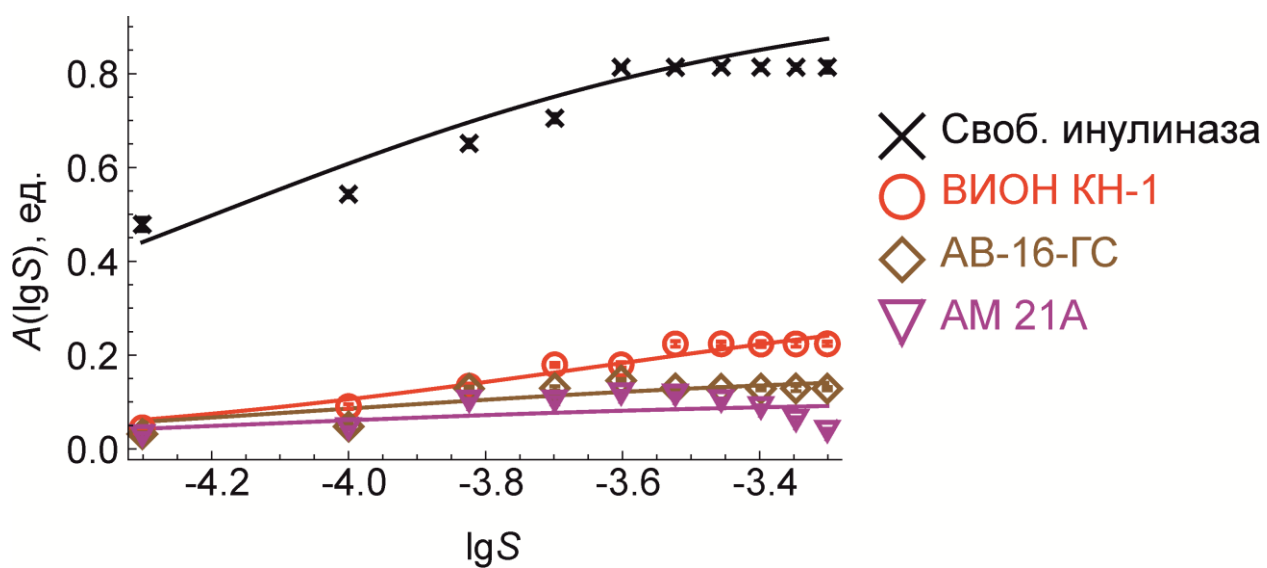


Рис. 132. Зависимости каталитической активности  $A(pS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л) для дрожжевой инулиназы, свободной и иммобилизованной на различных носителях, сгруппированные по блокам с близкими диапазонами изменений кинетических параметров. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

## 6.2.1.2. Модель двух ферментов

В модели двух ферментов, действующих на один субстрат, скорость реакции дается суммой двух выражений типа (4) или (5) (Диксон М., 1982):

$$v(S) = \frac{V_{\max 1}}{1 + 10^{pS - pK_{m1}}} + \frac{V_{\max 2}}{1 + 10^{pS - pK_{m2}}} = \frac{V_{\max 1}}{1 + 10^{-\lg S - pK_{m1}}} + \frac{V_{\max 2}}{1 + 10^{-\lg S - pK_{m2}}} \quad (6),$$

где  $V_{\max 1}$  и  $K_{m1}$  относятся к одному ферменту (или форме фермента), а  $V_{\max 2}$  и  $K_{m2}$  – к другому.

Анализ результатов аппроксимации экспериментальных зависимостей активности  $A(pS)$  от логарифма концентрации субстрата по формуле (6) позволяет сформулировать следующие принципы отбора результатов:

1. Для некоторых комбинаций типа модели и метода оптимизации получаются близкие значения  $V_{\max 1} \approx V_{\max 2}$  и  $pK_{m1} \approx pK_{m2}$ . В соответствии с формулой (6), такая ситуация соответствует формуле (5) с параметрами  $pK_m \approx pK_{m1} \approx pK_{m2}$  и  $V_{\max} \approx 2V_{\max 1} \approx 2V_{\max 2}$ . Иными словами, усложнение формулы (6) по сравнению с уравнением (5) не улучшает качество аппроксимации. Подобная ситуация имеет, например, место в табл. 46 для инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1 (с комбинациями модель:метод ug:CG, ul:CG, ul:QN).
2. Для некоторых комбинаций типа модель:метод имеются случаи, когда приближенное равенство наблюдается у «перекрестных» пар параметров: например, для инулиназы, иммобилизованной на АВ-17-2П, видно, что  $V_{\max 1}$  и  $pK_{m1}$  для комбинации ug:NM приблизительно совпадают с  $V_{\max 2}$  и  $pK_{m2}$  (и наоборот) почти для любой другой комбинации модель:метод для этого носителя. При этом значения  $V_{\max 1}$  и  $V_{\max 2}$  (а также  $pK_{m1}$  и  $pK_{m2}$ ) в пределах одной комбинации модель:метод между собою не близки. Подобная ситуация означает, что модель двух ферментов (6) дает лучшую аппроксимацию по сравнению с простой моделью Михаэлиса (5). Указанная «перекрестная симметрия» соответствует симметричному расположению минимумов функции (6) в пространстве параметров  $\{V_{\max 1},$



$pK_{m1}, V_{max2}, pK_{m2}$  и отражает инвариантность этой функции при замене  $\{V_{max1}, pK_{m1}\} \leftrightarrow \{V_{max2}, pK_{m2}\}$ .

3. Для некоторых комбинаций модель:метод наблюдаются ситуации, когда  $V_{max1}$  и  $V_{max2}$  противоположны по знаку и велики по модулю, т.е. на несколько порядков превышают максимальное значение  $A(\lg S)$  для экспериментальных точек на графике. По физическому смыслу величина  $V_{max1} + V_{max2}$  равна высоте насыщения («плато»), на которую должна выходить зависимость  $A(\lg S)$  в пределе больших  $S$ . Математически указанная ситуация возможна лишь из-за компенсации большого положительного и большого отрицательного слагаемого в формуле (6) и должна быть исключена из рассмотрения, поскольку столь большие значения нефизичны. Определенно нефизичной является ситуация, когда велика разность  $pK_{m1} - pK_{m2}$ , т.к. она равна разности порядков величин  $pK_{m1}$  и  $pK_{m2}$ , являющихся, в свою очередь, отношениями констант скоростей неких реакций. Маловероятно, чтобы какой-то эффект зависел от реакции, скорость которой на много порядков меньше скоростей остальных влияющих на этот эффект реакций.
4. В случаях, когда нет четких признаков вышеприведенных ситуаций, можно руководствоваться величиной доверительного интервала.

Таблица 46

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(\lg S)$  инулиназы из *Kluiveromyces fragilis* формулой (6)

Препарат	$V_{max1}$	$pK_{m1}$	$V_{max2}$	$pK_{m2}$	$R^2$	Модель: метод
1	2	3	4	5	6	7
Свободная инулиназа	<b>0,491 ± 0,009</b>	<b>4,21 ± 0,04</b>	<b>0,491 ± 0,009</b>	<b>4,21 ± 0,04</b>	<b>0,998</b>	<b>ug:CG</b>
	0,491 ± 81	4,21 ± 7,4 × 10 <sup>7</sup>	0,491 ± 81	4,21 ± 7,4 × 10 <sup>7</sup>	0,998	ug:PA
	<b>-2,07 × 10<sup>4</sup> ± 7,7 × 10<sup>8</sup></b>	<b>-1,23 ± 1,6 × 10<sup>4</sup></b>	<b>1,89 ± 1,5</b>	<b>3,75 ± 0,28</b>	<b>0,999</b>	<b>ug:LM</b>
	0,487 ± 12	4,21 ± 1,3 × 10 <sup>7</sup>	0,495 ± 12	4,21 ± 1,3 × 10 <sup>7</sup>	0,998	ug:N
	1,890 ± 0,240	3,75 ± 0,07	-3,82 × 10 <sup>6</sup> ± 1,0 × 10 <sup>-8</sup>	-3,50 ± 0,10	0,999	ug:QN
	0,810 ± 0,002	5120 ± 0,01	-0,0256 ± 0,002	5120 ± 0,01	0,990	ug:NM
	0,491 ± 0,009	54,21 ± 0,04	0,491 ± 0,009	4,21 ± 0,04	0,998	ul:CG
	0,491 ± 0,036	4,21 ± 1,3 × 10 <sup>6</sup>	0,490 ± 0,071	4,21 ± 1,3 × 10 <sup>6</sup>	0,998	ul:PA
	0,486 ± 8,9 × 10 <sup>6</sup>	4,21 ± 1,1 × 10 <sup>10</sup>	0,496 ± 8,9 × 10 <sup>6</sup>	4,21 ± 1,1 × 10 <sup>10</sup>	0,998	ul:LM
	0,492 ± 0,12 × 10 <sup>6</sup>	4,21 ± 2,4 × 10 <sup>9</sup>	0,490 ± 120000	4,21 ± 2,4 × 10 <sup>9</sup>	0,998	ul:N
	0,491 ± 0,009	4,21 ± 0,04	0,491 ± 0,009	4,21 ± 0,04	0,998	ul:QN
	-3,85 × 10 <sup>6</sup> ± 1,0 × 10 <sup>-8</sup>	-3,50 ± 0,10	1,89 ± 0,24	3,75 ± 0,07	0,999	ul:NM
	0,491 ± 1,3 × 10 <sup>6</sup>	4,21 ± 9,3 × 10 <sup>9</sup>	0,491 ± 1,3 × 10 <sup>6</sup>	4,21 ± 9,3 × 10 <sup>9</sup>	0,998	ul:IP
	1,16 × 10 <sup>-7</sup> ± 29	2,35 ± 1,3 × 10 <sup>8</sup>	0,982 ± 0,43	4,21 ± 0,27	0,998	cg:IP
0,489 ± 200	4,21 ± 1,0 × 10 <sup>8</sup>	0,492 ± 200	4,21 ± 1,0 × 10 <sup>8</sup>	0,998	cl:IP	

Продолжение табл. 46

1	2	3	4	5	6	7
	0,178 ± 0,016 55,8 ± 2,1 × 10 <sup>8</sup> 0,171 ± 6,5 <b>4,3 × 10<sup>3</sup> ± 3,9 × 10<sup>8</sup></b> 0,178 ± 0,11 × 10 <sup>6</sup> 1,88 × 10 <sup>9</sup> ± 0	3,63 ± 0,09 -10,2 ± 2,7 × 10 <sup>10</sup> 3,63 ± 2,4 × 10 <sup>7</sup> <b>1,32 ± 1,0 × 10<sup>-4</sup></b> 3,63 ± 2,3 × 10 <sup>9</sup> -1,56 ± 0,02	0,178 ± 0,016 0,355 ± 0,260 0,184 ± 6,4 <b>-1,45 × 10<sup>4</sup> ± 1,7 × 10<sup>8</sup></b> 0,178 ± 0,11 × 10 <sup>6</sup> -2,64 × 10 <sup>10</sup> ± 0	3,63 ± 0,04 3,63 ± 0,34 3,63 ± 2,2 × 10 <sup>7</sup> <b>0,792 ± 3,5 × 10<sup>4</sup></b> 3,63 ± 2,3 × 10 <sup>9</sup> -2,71 ± 0,02	0,994 0,994 0,994 <b>0,998</b> 0,994 0,998	ug:CG ug:PA ug:LM ug:N ug:QN ug:NM
Инулиназа/ ВИОН КН-1	<b>0,178 ± 0,016</b> 0,182 ± 0,210 0,152 ± 130 0,108 ± 1,5 0,178 ± 0,016 8,24 × 10 <sup>8</sup> ± 0 0,185 ± 400000 5,73 × 10 <sup>-9</sup> ± 460 0,178 ± 8,8	<b>3,63 ± 0,09</b> 3,63 ± 5,0 × 10 <sup>6</sup> 3,63 ± 1,1 × 10 <sup>8</sup> 3,63 ± 1,3 × 10 <sup>7</sup> 3,63 ± 0,09 -1,38 ± 0,02 3,63 ± 8,9 × 10 <sup>9</sup> 1,82 ± 3,9 × 10 <sup>10</sup> 3,63 ± 3,9 × 10 <sup>7</sup>	<b>0,178 ± 0,016</b> 0,174 ± 0,320 0,203 ± 130 0,247 ± 1,7 0,178 ± 0,016 -8,52 × 10 <sup>9</sup> ± 0 0,170 ± 400000 0,355 ± 1,7 0,177 ± 8,7	<b>3,63 ± 0,09</b> 3,63 ± 5,2 × 10 <sup>6</sup> 3,63 ± 8,4 × 10 <sup>7</sup> 3,63 ± 5,7 × 10 <sup>6</sup> 3,63 ± 0,09 -2,39 ± 0,021 3,63 ± 9,6 × 10 <sup>9</sup> 3,63 ± 1,4 3,63 ± 4,0 × 10 <sup>7</sup>	<b>0,994</b> 0,994 0,994 0,994 0,994 0,998 0,994 0,994 0,994	<b>ul:CG</b> ul:PA ul:LM ul:N ul:QN ul:NM ul:IP cg:IP cl:IP
Инулиназа/ АВ-17-2П	0,300 ± 0,012 0,434 ± 0,050 0,324 ± 0,021 0,600 ± 0,023 0,300 ± 14 0,485 ± 0,048 0,324 ± 0,021 0,324 ± 0,021 0,324 ± 0,021 <b>0,324 ± 0,021</b> 0,324 ± 0,021 0,324 ± 0,021 0,324 ± 0,021 0,324 ± 0,021 0,324 ± 0,021	6,53 ± 0,15 5,27 ± 0,23 3,26 ± 0,99 6,53 ± 0,15 6,53 ± 3,3 × 10 <sup>7</sup> 6,80 ± 0,19 3,26 ± 0,99 3,26 ± 0,99 3,26 ± 0,99 <b>3,26 ± 0,99</b> 3,26 ± 0,99 3,26 ± 0,99 3,26 ± 0,99 3,26 ± 0,99	0,300 ± 0,012 0,216 ± 0,043 0,485 ± 0,048 -1,23 ± 0 0,300 ± 14 0,324 ± 0,210 0,485 ± 0,048 0,485 ± 0,048 0,485 ± 0,048 <b>0,485 ± 0,048</b> 0,485 ± 0,048 0,485 ± 0,048 0,485 ± 0,048 0,485 ± 0,048	6,53 ± 0,15 21,3 ± 0 6,80 ± 0,19 -12,7 ± 0 6,53 ± 3,3 × 10 <sup>7</sup> 3,26 ± 0,99 6,80 ± 0,19 6,80 ± 0,19 6,80 ± 0,19 <b>6,80 ± 0,19</b> 6,80 ± 0,19 6,80 ± 0,19 6,80 ± 0,19 6,80 ± 0,19	0,976 0,987 0,999 0,976 0,976 0,999 0,999 0,999 0,999 <b>0,999</b> 0,999 0,999 0,999 0,999	ug:CG ug:PA ug:LM ug:N ug:QN ug:NM ul:CG ul:PA ul:LM <b>ul:N</b> ul:QN ul:NM ul:IP cg:IP cl:IP

Продолжение табл. 46

1	2	3	4	5	6	7	
Инулиназа/ АВ-16-ГС	<b>0,084 ± 0,006</b>	<b>4,02 ± 0,12</b>	<b>0,084 ± 0,006</b>	<b>4,02 ± 0,12</b>	<b>0,978</b>	<b>ug:CG</b>	
	35,3 ± 8,3 × 10 <sup>6</sup>	-8,78 ± 6,8 × 10 <sup>8</sup>	0,167 ± 0,066	4,02 ± 0,29	0,978	ug:PA	
	0,0836 ± 63	4,02 ± 3,3 × 10 <sup>7</sup>	0,0838 ± 63	4,02 ± 3,2 × 10 <sup>7</sup>	0,978	ug:LM	
	<b>474, ± 0,86</b>	<b>3,01 ± 0,30</b>	<b>-475, ± 0,86</b>	<b>3,01 ± 0,30</b>	<b>0,988</b>	<b>ug:N</b>	
	0,084 ± 1,2	4,02 ± 1,2 × 10 <sup>7</sup>	0,0837 ± 1,2	4,02 ± 1,2 × 10 <sup>7</sup>	0,978	ug:QN	
	408 ± 0,86	3,01 ± 0,30	-409 ± 0,86	3,01 ± 0,30	0,988	ug:NM	
	9,00 ± 5800	3,06 ± 28	-10,1 ± 5800	2,96 ± 34	0,988	ul:CG	
	0,842 ± 7,1	3,32 ± 1,90	-178 ± 320000	0,539 ± 790	0,988	ul:PA	
	1370 ± 0,86	3,01 ± 0,30	1370 ± 0,86	3,01 ± 0,30	0,988	ul:LM	
	472 ± 0,86	3,01 ± 0,30	-473 ± 0,86	3,01 ± 0,30	0,988	ul:N	
	343 ± 2,8 × 10 <sup>8</sup>	3,01 ± 1100	-344 ± 2,8 × 10 <sup>8</sup>	3,01 ± 1100	0,988	ul:QN	
	401 ± 4,4 × 10 <sup>8</sup>	3,01 ± 1300	-402 ± 4,4 × 10 <sup>8</sup>	3,01 ± 1300	0,988	ul:NM	
	30,0 ± 190000	3,03 ± 96	-31,1 ± 190000	2,99 ± 100	0,988	ul:IP	
	1,08 × 10 <sup>-8</sup> ± 49	2,10 ± 2,3 × 10 <sup>9</sup>	0,167 ± 0,29	4,02 ± 0,78	0,978	cg:IP	
	0,167 ± 0,310	4,02 ± 0,82	4,83 × 10 <sup>-8</sup> ± 19	2,31 ± 2,1 × 10 <sup>8</sup>	0,978	cl:IP	
	Инулиназа/ АМ 21А	0,052 ± 0,005	4,14 ± 0,16	0,052 ± 0,005	4,14 ± 0,16	0,886	ug:CG
		21,5 ± 6,8 × 10 <sup>7</sup>	-9,27 ± 3,4 × 10 <sup>9</sup>	0,105 ± 0,058	4,14 ± 0,45	0,886	ug:PA
0,0533 ± 6400		4,14 ± 3,4 × 10 <sup>8</sup>	0,051 ± 6400	4,14 ± 3,5 × 10 <sup>8</sup>	0,886	ug:LM	
<b>1,92 × 10<sup>5</sup> ± 5,5 × 10<sup>7</sup></b>		<b>0,508 ± 62</b>	<b>-6,26 × 10<sup>5</sup> ± 1,8 × 10<sup>8</sup></b>	<b>-5,06 × 10<sup>-3</sup> ± 62</b>	<b>0,977</b>	<b>ug:N</b>	
<b>-1,73 × 10<sup>6</sup> ± 1,2 × 10<sup>-8</sup></b>		<b>0,09 ± 0,02</b>	<b>1,13 × 10<sup>6</sup> ± 1,2 × 10<sup>-8</sup></b>	<b>0,27 ± 0,02</b>	<b>0,977</b>	<b>ug:QN</b>	
4,26 × 10 <sup>10</sup> ± 0		-2,23 ± 0,017	-6,19 × 10 <sup>11</sup> ± 0	-3,39 ± 0,02	0,977	ug:NM	
<b>0,052 ± 0,005</b>		<b>4,14 ± 0,16</b>	<b>0,052 ± 0,005</b>	<b>4,14 ± 0,16</b>	<b>0,886</b>	<b>ul:CG</b>	
0,053 ± 2900		4,14 ± 3,7 × 10 <sup>8</sup>	0,052 ± 2900	4,14 ± 3,8 × 10 <sup>8</sup>	0,886	ul:PA	
0,051 ± 1,1 × 10 <sup>6</sup>		4,14 ± 7,0 × 10 <sup>9</sup>	0,054 ± 1,1 × 10 <sup>6</sup>	4,14 ± 6,7 × 10 <sup>9</sup>	0,886	ul:LM	
0,065 ± 4,4		4,14 ± 7,5 × 10 <sup>6</sup>	0,039 ± 4,5	4,14 ± 1,2 × 10 <sup>7</sup>	0,886	ul:N	
0,052 ± 0,005		4,14 ± 0,16	0,052 ± 0,005	4,14 ± 0,16	0,886	ul:QN	
-1,42 × 10 <sup>12</sup> ± 0		-3,68 ± 0,017	6,18 × 10 <sup>10</sup> ± 0	-2,32 ± 0,017	0,977	ul:NM	
0,047 ± 75000		4,14 ± 2,1 × 10 <sup>9</sup>	0,058 ± 75000	4,14 ± 1,7 × 10 <sup>9</sup>	0,886	ul:IP	
3,12 × 10 <sup>-9</sup> ± 270		1,70 ± 4,0 × 10 <sup>10</sup>	0,105 ± 0,21	4,14 ± 1,10	0,886	cg:IP	
0,052 ± 35000		4,14 ± 2,2 × 10 <sup>9</sup>	0,053 ± 35000	4,14 ± 2,2 × 10 <sup>9</sup>	0,886	cl:IP	

1	2	3	4	5	6	7
	0,251 ± 0,012	5,77 ± 0,16	0,251 ± 0,012	5,77 ± 0,16	0,951	ug:CG
	52,1 ± 14000	0,648 ± 120	0,324 ± 0,041	6,61 ± 0,28	0,993	ug:PA
	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	1,00	ug:LM
	0,502 ± 0,025	5,77 ± 0,16	139, ± 0	-18,2 ± 0	0,951	ug:N
	0,251 ± 51	5,77 ± 1,5 × 10 <sup>8</sup>	0,251 ± 51	5,77 ± 1,5 × 10 <sup>8</sup>	0,951	ug:QN
	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	1,00	ug:NM
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	ul:CG
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	ul:PA
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	ul:LM
	<b>0,373 ± 0,062</b>	<b>3,80 ± 0,35</b>	<b>0,252 ± 0,048</b>	<b>6,98 ± 0,37</b>	<b>1,00</b>	<b>ul:N</b>
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	ul:QN
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	ul:NM
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	ul:IP
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	cg:IP
	0,373 ± 0,062	3,80 ± 0,35	0,252 ± 0,048	6,98 ± 0,37	1,00	cl:IP
Инулиназа/ КУ-2						

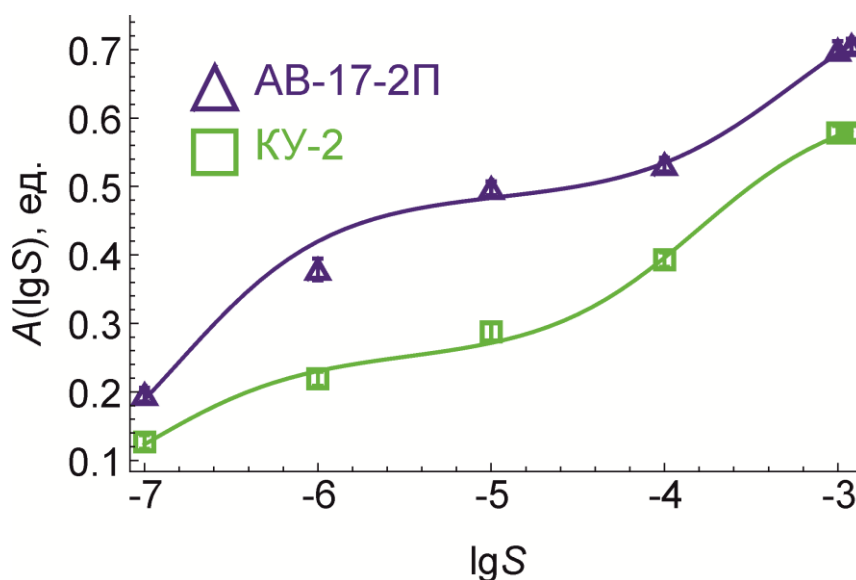


Рис. 133. Зависимости каталитической активности  $A(pS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л) для инулиназы, иммобилизованной на АВ-17-2П и КУ-2. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

Из табл. 46 видно, что получаемые параметры ( $V_{max1,2}$  и  $pK_{m1,2}$ ) аппроксимационных кривых существенно зависят от выбора типа модели и метода оптимизации. Руководствуясь в таком выборе вышеизложенными соображениями, делаем следующие возможные выводы.

1. Подгонка экспериментальных точек к двухферментной модели Михаэлиса (6) в некоторых случаях демонстрирует сильную зависимость результатов, т.е. параметров  $V_{max1,2}$  и  $pK_{m1,2}$  (как самих значений, так и их доверительных интервалов) от типа модели и метода оптимизации, что хорошо видно из табл. 46. Для носителей АВ-17-2П и КУ-2 двухферментная модель дает хорошее описание экспериментальных данных – как визуально (рис. 133), так и по разумным значениям параметров их доверительных интервалов (табл. 46, выделено жирным более крупным шрифтом).

2. Для остальных носителей (ВИОН КН-1, АВ-16-ГС, АМ 21А) и свободной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* визуальное качество полученных аппроксимаций представляется недостаточным (рис. 134) даже при разумных значениях параметров (табл. 46, выделено жирным более крупным шрифтом). Интересно отметить, что для некоторых комбинаций модель:метод (выделено жирным более мелким шрифтом) получались отрицательные значения  $V_{max1}$  или  $V_{max2}$ , что косвенно может свидетельствовать о замедлении скорости реакции (рис. 135). В следующем разделе рассматривается модель, явным образом учитывающая такое замедление.

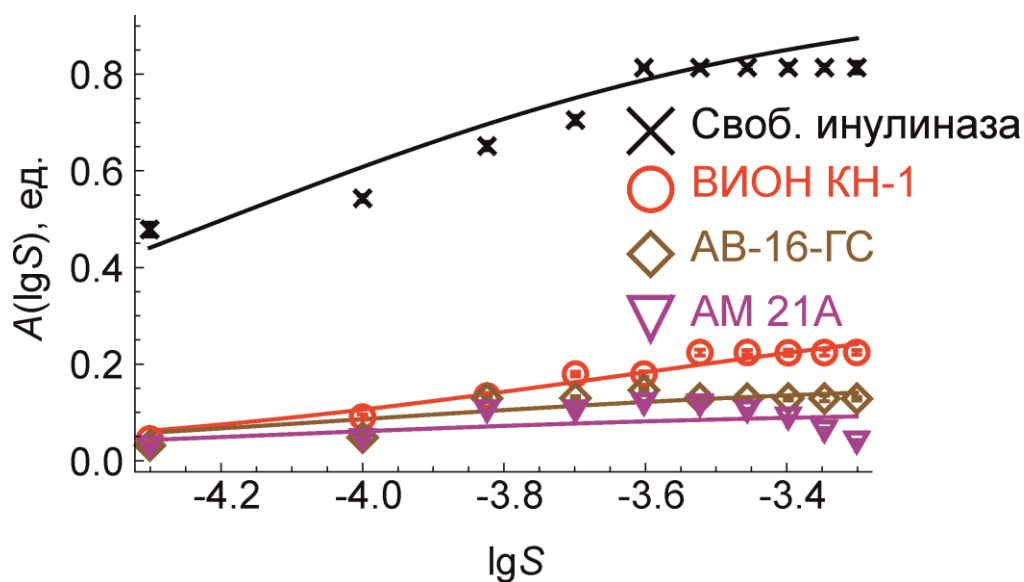


Рис. 134. Зависимости каталитической активности  $A(pS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л) для инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1, АВ-16-ГС и АМ 21А. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

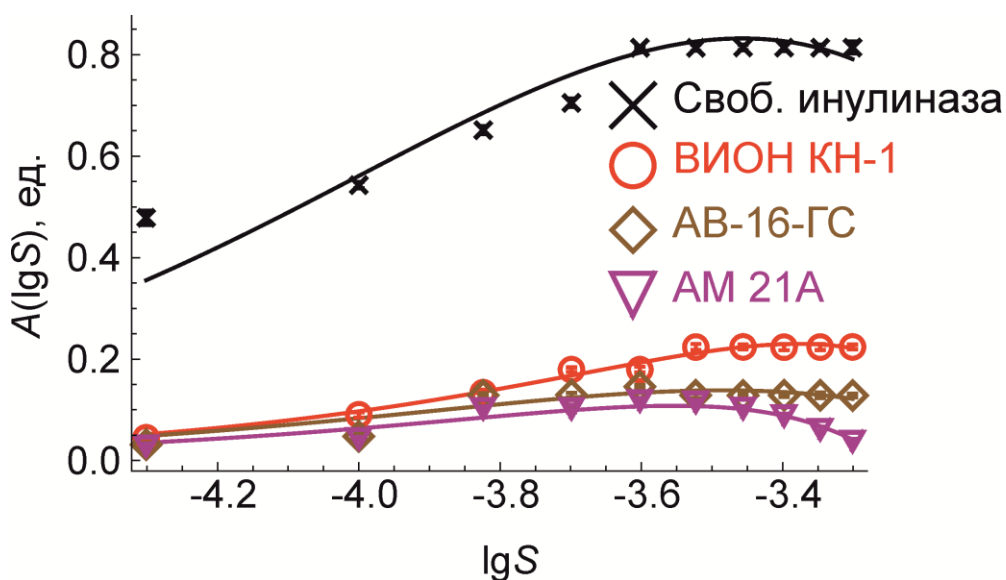


Рис. 135. Немонотонные зависимости каталитической активности  $A(pS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л), полученные по формуле (3) при некоторых значениях параметров, представленных в табл. 46 жирным более мелким шрифтом. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

### 6.2.1.3. Модель с ингибированием

Для реакции с ингибированием ее скорость  $v$  описывается следующим уравнением (Диксон М., 1982; Cornish-Bowden A., 2012):

$$v(S) = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (7)$$

или, в логарифмических переменных, уравнением:

$$v(S) = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{-\lg S - pK_m} + 10^{\lg S + pK_i}} \quad (8),$$

где  $K_i$  – константа ингибирования реакции субстратом.



В табл. 47 представлены предварительные результаты аппроксимации экспериментально измеренной активности инулиназы, свободной и иммобилизованной на нескольких носителях (ВИОН КН-1, АВ-16-ГС, АМ 21А) по формуле (8). Из табл. 48 видно, что получаемые значения параметров ( $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$ ) в широких пределах варьируются для различных комбинаций модели и метода оптимизации. Единственная закономерность, которую можно заметить «на глаз», – это постоянство суммы  $pK_m + pK_i$  для сравнительно большой доли случаев.

Возможные зависимости каталитической активности  $A(pS)$  для инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1, аппроксимированные формулой (8), представлены на рис. 136. Кривые визуально почти не отличаются, хотя параметры зависимостей (приведены в табл. 48) сильно варьируют для разных рисунков, т.к. получены при различных ограничениях на область изменения параметров.

По аналогии с высказанными ранее соображениями, можно заметить следующее. Глобальный (несколько локальных, близких по величине к глобальному, находимых в 1-моделях) минимум функции невязки может достигаться в такой точке пространства параметров, значения которых совершенно далеки от ожидаемых из физических или химических соображений. Визуально все кривые, содержащие параметры, принимающие значения в этих точках, могут выглядеть одинаково (см., например, рис. 136), поэтому необходимо выбрать некоторые принципы отбора найденных точек минимума в пространстве параметров.

Таблица 47

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(\lg S)$  инулиназы из *Kluveromyces marxianus* формулой (5)

Препарат	$V_{max}$	$pK_m$	$pK_i$	$R^2$	Модель: метод
1	2	3	4	5	6
Свободная инулиназа из <i>Kluveromyces marxianus</i>	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ug:CG
	$240, \pm 5,0 \times 10^3$	$1,35 \pm 9,20$	$5,66 \pm 9,20$	0,998	ug:PA
	$0,98 \pm 0,02$	$4,21 \pm 0,04$	$-2,09 \times 10^4 \pm 0$	0,998	ug:LM
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ug:N
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ug:QN
	$2,24 \times 103 \pm 3,5 \times 10^4$	$5,14 \times 10^3 \pm 0$	$7,23 \pm 6,80$	0,674	ug: IP
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ul:CG
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ul:PA
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ul:LM
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ul:N
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ul:QN
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	ul:IP
	$1,80 \pm 0,23$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999	cl:IP
	Инулиназа/ВИОН КН-1	$157, \pm 3,2 \times 10^4$	$0,814 \pm 88$	$5,89 \pm 88$	0,998
$67,3 \pm 5,9 \times 10^3$		$1,18 \pm 38$	$5,52 \pm 38$	0,998	ug:PA
$0,355 \pm 0,031$		$3,63 \pm 0,09$	$-3,50 \times 10^4 \pm 0$	0,994	ug:LM
$1,51 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^{10}$		$-2,17 \pm 8,5 \times 10^4$	$8,87 \pm 8,5 \times 10^4$	0,998	ug:N
$1,46 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^{10}$		$-2,16 \pm 8,2 \times 10^4$	$8,86 \pm 8,2 \times 10^4$	0,998	ug:QN
$492, \pm 1,7 \times 10^5$		$1,13 \times 10^3 \pm 0$	$07,68 \pm 150$	0,225	ug: IP
$206, \pm 5,5 \times 10^4$		$0,694 \pm 120$	$6,01 \pm 120$	0,998	ul:CG
$47,6 \pm 2,9 \times 10^3$		$1,33 \pm 27$	$5,37 \pm 27$	0,998	ul:PA
$8,43 \times 10^8 \pm 0$		$-5,92 \pm 0,024$	$412,6 \pm 0,039$	0,998	ul:LM
$1,52 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^{10}$		$-2,17 \pm 8,5 \times 10^4$	$8,88 \pm 8,5 \times 10^4$	0,998	ul:N
$1,56 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^{10}$		$-2,18 \pm 8,8 \times 10^4$	$8,89 \pm 8,8 \times 10^4$	0,998	ul:QN
$7,65 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^{-9}$		$-3,87 \pm 0,024$	$10,6 \pm 0,039$	0,998	ul:IP

Окончание табл. 47

Препарат	$V_{max}$	$pK_m$	$pK_i$	$R^2$	Модель: метод
1	2	3	4	5	6
Инулиназа/АВ-16-ГС	$91,1 \pm 1,7 \times 10^4$	$1,00 \pm 83$	$6,04 \pm 83$	0,991	ug:CG
	$103, \pm 2,2 \times 10^4$	$0,951 \pm 94$	$6,09 \pm 94$	0,991	ug:PA
	$0,167 \pm 0,012$	$4,02 \pm 0,12$	$-1,61 \times 10^4 \pm 0$	0,978	ug:LM
	$1,81 \times 10^5 \pm 6,9 \times 10^{10}$	$-2,30 \pm 1,7 \times 10^5$	$9,34 \pm 1,7 \times 10^5$	0,991	ug:N
	$1,73 \times 10^5 \pm 6,3 \times 10^{10}$	$-2,28 \pm 1,6 \times 10^5$	$9,32 \pm 1,6 \times 10^5$	0,991	ug:QN
	$510, \pm 2,3 \times 10^5$	$1,17 \times 10^3 \pm 0$	$7,78 \pm 200$	0,268	ug:IP
	$186, \pm 7,3 \times 10^4$	$0,693 \pm 170$	$6,35 \pm 170$	0,991	ul:CG
	$165, \pm 5,7 \times 10^4$	$0,745 \pm 150$	$6,30 \pm 150$	0,991	ul:PA
	$4,05 \times 10^8 \pm 0$	$-5,64 \pm 0,033$	$12,7 \pm 0,032$	0,991	ul:LM
	$1,99 \times 10^5 \pm 8,3 \times 10^{10}$	$-2,34 \pm 1,8 \times 10^5$	$9,38 \pm 1,8 \times 10^5$	0,991	ul:N
	$1,97 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^{10}$	$-2,33 \pm 1,8 \times 10^5$	$9,37 \pm 1,8 \times 10^5$	0,991	ul:QN
	$9,56 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^{-9}$	$-4,02 \pm 0,033$	$11,1 \pm 0,032$	0,991	ul:IP
	$132, \pm 3,7 \times 10^4$	$0,842 \pm 120$	$6,20 \pm 120$	0,991	cl:IP
	Инулиназа/АМ 21А	$136, \pm 7,8 \times 10^4$	$0,729 \pm 250$	$6,44 \pm 250$	0,936
$548, \pm 1,3 \times 10^6$		$0,123 \pm 1000$	$7,05 \pm 1000$	0,936	ug:PA
$0,105 \pm 0,010$		$4,14 \pm 0,16$	$-6,54 \times 10^3 \pm 0$	0,886	ug:LM
$8,12 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^{-8}$		$-3,05 \pm 0,042$	$10,2 \pm 0,042$	0,936	ug:N
$7,00 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^{-8}$		$-2,98 \pm 0,042$	$10,2 \pm 0,042$	0,936	ug:QN
$263, \pm 1,4 \times 10^5$		$600 \pm 0$	$7,66 \pm 230$	0,332	ug:IP
$261, \pm 2,9 \times 10^5$		$0,446 \pm 480$	$6,72 \pm 480$	0,936	ul:CG
$877, \pm 3,2 \times 10^6$		$-0,0807 \pm 1,6 \times 10^3$	$7,25 \pm 1,6 \times 10^3$	0,936	ul:PA
$9,52 \times 10^8 \pm 0$		$-6,12 \pm 0,042$	$13,3 \pm 0,042$	0,936	ul:LM
$7,62 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^{-8}$		$-3,02 \pm 0,042$	$10,2 \pm 0,042$	0,936	ul:N
$7,48 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^{-8}$		$-3,01 \pm 0,042$	$10,2 \pm 0,042$	0,936	ul:QN
$6,32 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^{-9}$		$-3,94 \pm 0,042$	$11,1 \pm 0,042$	0,936	ul:IP

Значения параметров формулы (8), по которым построены кривые, представленные на рис. 136, для дрожжевой инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1

№	$\min < V_{max} < \max$	$\min < pK_m < \max$	$\min < pK_i < \max$	$R^2$	$V_{max}$	$\lg S_{max}$	$\Delta \lg S_{hm}$
1	$0,3 < 0,40 \pm 0,18 < 0,4$	$3,5 < 3,57 \pm 0,28 < 4,5$	$2,3 < 2,50 \pm 1,2 < 3,5$	0,995	0,252	-3,03	1,72
2	$0,2 < 0,70 \pm 0,58 < 0,7$	$3 < 3,25 \pm 0,44 < 5$	$2 < 3,26 \pm 0,69 < 4$	0,997	0,232	-3,25	1,35
3	$0 < 1,0 \pm 1,2 < 1$	$2,5 < 3,07 \pm 0,61 < 6$	$1 < 3,52 \pm 0,79 < 7$	0,997	0,229	-3,29	1,28
4	$0 < 10,0 \pm 1,3 < 10$	$0,5 < 2,01 \pm 0,57 < 10$	$0,5 < 4,68 \pm 0,58 < 10$	0,998	0,227	-3,34	1,15
5	$0 < 50,0 \pm 3,2 < 50$	$-5 < 1,31 \pm 0,28 < 15$	$-5 < 5,39 \pm 0,28 < 15$	0,998	0,227	-3,35	1,14
6	$0 < 150,0 \pm 2,9 < 150$	$-10 < 0,83 \pm 0,08 < 20$	$-10 < 5,87 \pm 0,84 < 20$	0,998	0,227	-3,35	1,14

\* Для расчетов использовалась комбинация сг:Р модель:метод. Значения параметров получены при различных ограничениях на область изменения параметров. Для краткости эти ограничения обозначены в виде двойных неравенств, «обрамляющих» значения, полученные при аппроксимации. Минимальные и максимальные значения величин указаны как  $\min$  и  $\max$ . Для удобства эти ограничения приведены на рис. 136. В таблице также присутствуют «наглядные» параметры –  $V_{max}$ ,  $\lg S_{max}$  (точка максимума),  $\Delta \lg S_{hm}$  (полная ширина на полувысоте), отражающие визуальную форму кривой. Подробнее см. ниже в тексте и на рис. 137.

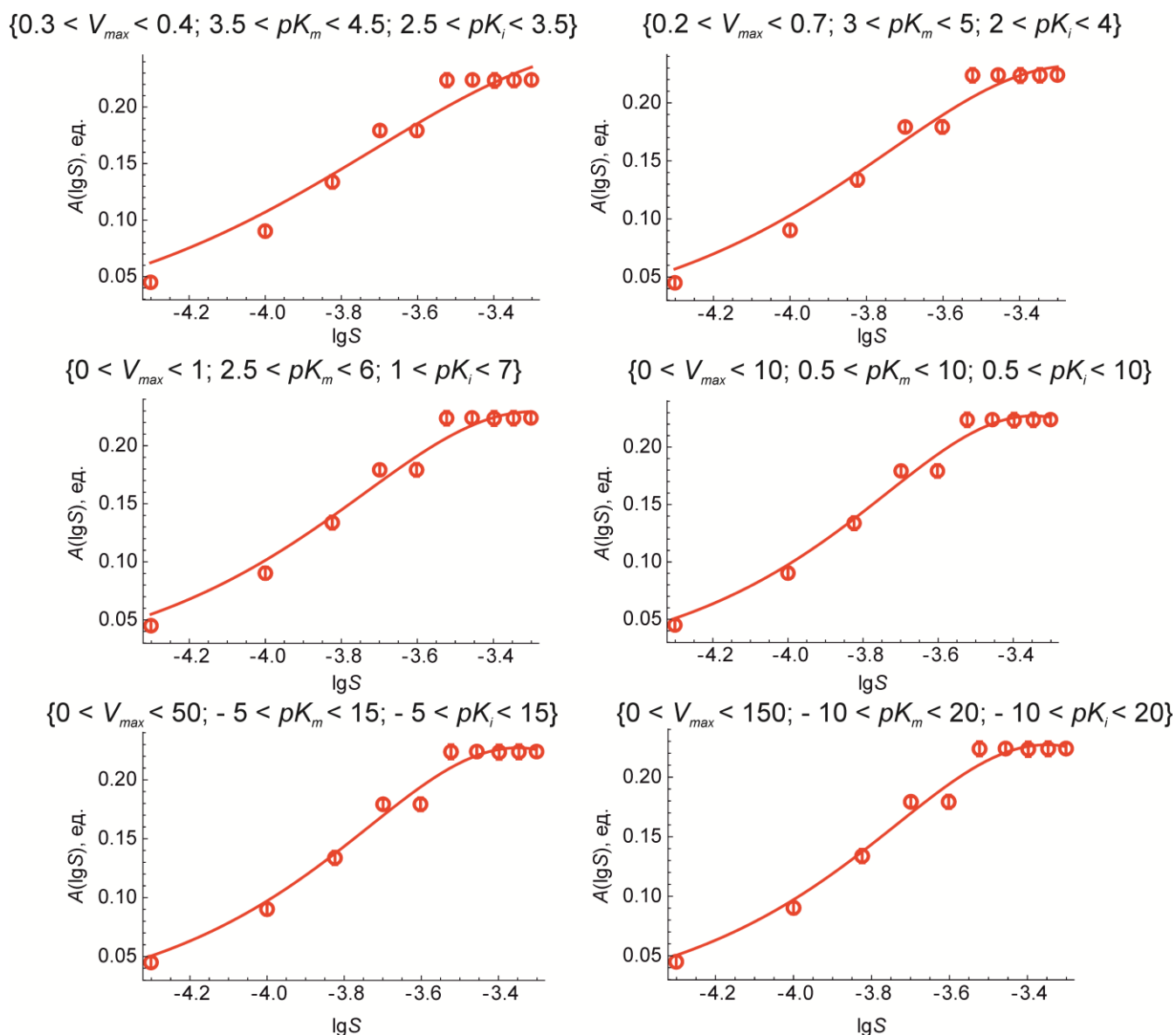


Рис. 136. Зависимость активности  $A(pS)$  для дрожжевой инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1, аппроксимированная формулой (8)

Одним из наиболее очевидных таких принципов является постановка достаточно жестких ограничений на параметры, исходя из каких-то «наглядных» соображений. Именно, эти соображения должны давать оценки параметров, исходя из вида экспериментальной кривой на основе

математической формулы модели, т.е. без использования процедуры оптимизации. Действительно, последняя является сложным вычислительным процессом, результаты которого, как мы видим, не всегда очевидны.

«Визуальные» (или «наглядные») свойства кривой – это ее характеристики, которые приближенно можно установить без всяких вычислений из самого вида кривой. Например, из графика функции (8), схематически представленного на рис. 137, легко увидеть точку максимума ( $S_{max}$  или  $\lg S_{max}$ ), высоту максимума ( $f_{max}$ ). Несколько менее однозначно можно также определить полную ширину на полувысоте (full width at half-maximum, FWHM)  $\Delta S_{hm}$ . Заметим, что из-за логарифмического масштаба ( $\lg S$ ), принятого на рис. 137, показанная на этом рисунке FWHM ( $\Delta \lg S_{hm}$ ) не совпадает с  $\lg \Delta S_{hm}$  (т.е. с FWHM, рассчитанной для обычной координаты  $S$ ).

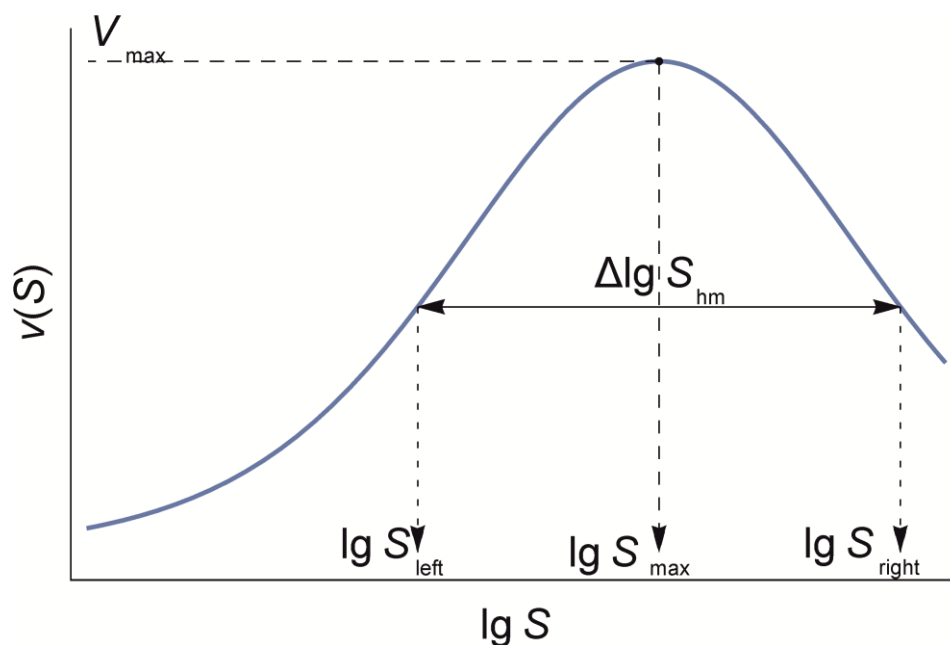


Рис. 137. Общий вид графика функции (8) инулиназы из *Kluveromyces marxianus*

Желательно иметь метод вычисления («неочевидных») параметров  $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$  в формуле (7) или (8) через визуальные характеристики –  $v_{max}$ ,  $\lg S_{max}$  и  $\Delta \lg S_{hm}$  – экспериментальной кривой, которую надо этой формулой аппроксимировать. Такой метод представлен в следующем разделе.

Замечая, что из физических соображений константы

$$K_m, K_i > 0 \quad (9)$$

должны быть положительны, введем безразмерную концентрацию  $\sigma$  и безразмерный коэффициент  $q$  согласно

$$\sigma = \frac{S}{\sqrt{K_m K_i}} \quad (10),$$

$$q = \sqrt{\frac{K_i}{K_m}} \quad (11).$$

В этих переменных формула (7) примет удобный вид:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{1}{q}(\sigma + \frac{1}{\sigma})} = \frac{q\sigma V_{max}}{\sigma^2 + q\sigma + 1} \quad (12)$$

или

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{1}{q}(\sigma + \frac{1}{\sigma})} = \frac{qV_{max}}{q + 10^{\lg\sigma} + 10^{-\lg\sigma}} \quad (13).$$

Физический интерес представляет лишь случай положительных значений  $\sigma$  и  $q$ . В этом случае функция (12) имеет единственный максимум при

$$\sigma = \sigma_{max} = 1 \quad (14).$$

Действительно, при всех  $\sigma > 0$  имеем  $\sigma + 1/\sigma \geq 2$ . В обычных размерных переменных функция (4) имеет единственный максимум при  $S_{\max} = \sqrt{K_i K_m}$  или, в логарифмических переменных,

$$\lg S_{\max} = -1/2(pK_i + pK_m) \quad (15),$$

а значение функции в максимуме равно

$$V_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + 2/q} = \frac{V_{\max}}{1 + 2\sqrt{K_m/K_i}} \quad (16)$$

Для нахождения «точек полувысоты»  $\sigma_{\text{left, right}}$  заметим, что они удовлетворяют уравнению

$$v(\sigma) = \frac{1}{2} V_{\max}, \text{ которое сводится к } \sigma^2 - (4+q)\sigma + 1 = 0 \quad (17).$$

Решая квадратное уравнение (14), можно легко получить

$$\sigma_{\text{left, right}} = \frac{1}{2}(4 + q \mp \sqrt{(4+q)^2 - 4}) \quad (18),$$

$$\sigma_{\text{left}} \times \sigma_{\text{right}} = 1 \quad (19).$$

Равенство (19) очевидно, например, из применения теоремы Виета к квадратному уравнению (17). Из (19) легко получить FWHM (полная ширина на полувысоте) для кривой:

$$\Delta\sigma_{hm} = \sigma_{\text{right}} - \sigma_{\text{left}} = \sqrt{(4+q)^2 - 4} \quad (20)$$

или, в обычных размерных переменных,

$$\Delta S_{hm} = S_{\text{right}} - S_{\text{left}} = S_{\max} \times \Delta\sigma_{hm} = \sqrt{\left(4 + \frac{K_i}{K_m}\right)^2 - 4} \quad (21)$$

Важно заметить, что условие  $q > 0$  накладывает ограничения на  $\Delta\sigma_{hm}$  (20):

$$\Delta\sigma_{hm} > 2\sqrt{3} \approx 3.46 \text{ или, в обычных размерных переменных,}$$



$$\Delta S_{hm} > 3.46 S_{max} \quad (22).$$

Таким образом, положение  $S_{max}$  максимума и FWHM кривой типа (7) не могут принимать любые значения независимо: ее FWHM всегда в 3,46 (или более) раз превышает положение  $S_{max}$  максимума.

Для кривой (13), зависящей от  $\lg \sigma$ , имеем FWHM в следующем виде:

$$\Delta \lg \sigma_{hm} = \lg \sigma_{right} - \lg \sigma_{left} = \lg(\sigma_{right} / \sigma_{left}) \quad (23),$$

$$\Delta \lg \sigma_{hm} = \lg\left(\frac{4 + q + \sqrt{(4 + q)^2 - 4}}{4 + q - \sqrt{(4 + q)^2 - 4}}\right) \quad (24),$$

$$\Delta \lg \sigma_{hm} = 2 \lg\left(\frac{1}{2}[4 + q + \sqrt{(4 + q)^2 - 4}]\right) \quad (25),$$

$$\Delta \lg \sigma_{hm} = -2 \lg\left(\frac{1}{2}[4 + q - \sqrt{(4 + q)^2 - 4}]\right) \quad (26),$$

$$\Delta \lg \sigma_{hm} \neq \lg \Delta \sigma_{hm}.$$

Два эквивалентных уравнения (25) и (26) получены умножением числителя и знаменателя стоящей под логарифмом дроби поочередно на  $4 + q \pm \sqrt{(4 + q)^2 - 4}$ .

Отметим несколько очевидных, но важных обстоятельств в связи с формулой (23):

1. Логарифм отношения  $\sigma_{left} / \sigma_{right}$  является безразмерной величиной, и не зависит от того, в каких (одинаковых!) единицах измеряются  $\sigma_{left, right}$ , поэтому

$$\Delta \lg \sigma_{hm} = \lg(S_{right} / S_{left}) = \lg S_{right} - \lg S_{left} = \Delta \lg S_{hm} \neq \lg \Delta S_{hm} \quad (27).$$

2. Последнее неравенство в (27) показывает, что  $\Delta \lg S_{hm}$  нельзя найти, зная лишь  $\Delta S_{hm}$ , для этого нужны оба значения  $S_{left, right}$ .

3. Аналогично (22), условие  $q > 0$  накладывает ограничения и на  $\Delta \lg \sigma_{hm}$ , которые проще всего получить из (25):

$$\Delta \lg \sigma_{hm} = \Delta \lg S_{hm} > 2 \lg(3 + 2\sqrt{3}) \approx 1.144 \quad (28).$$

Таким образом, ширина (FWHM) кривой типа (8) в логарифмической координате не может быть меньше  $\sim 1,144$ . Если экспериментальные точки лучше укладываются на кривую с меньшей шириной, то такая кривая вряд ли может описываться формулой (8).

4. В обычных координатах кривая (12) несимметрична, а в логарифмических координатах кривая (13) симметрична относительно максимального  $\sigma = 1$ :

$$\sigma_{\max} \neq \frac{1}{2}(\sigma_{right} + \sigma_{left}) = q + 4 \quad (29),$$

$$\lg \sigma_{\max} = \frac{1}{2}(\lg \sigma_{right} + \lg \sigma_{left}) = 0 \quad (30).$$

Последнее равенство (30) очевидно из (19) и, разумеется, из (14).

Напомним, что целью изложения материала данного раздела является вывод соотношений, выражающих параметры  $V_{max}$  и  $pK_m$  через «визуальные характеристики» –  $v_{max}$ ,  $S_{max}$  (или  $\lg S_{max}$ ) и  $\Delta S_{hm}$  (или  $\Delta \lg S_{hm}$ ), показанные на рис. 137.

Наиболее простую форму такие соотношения имеют в безразмерных переменных. Пользуясь соотношениями (11) и (14), можно выразить параметры  $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$  через  $v_{max}$ ,  $S_{max}$  и  $q$ . Для получения окончательных выражений, зависящих от третьей «визуальной характеристики» –  $\Delta S_{hm}$  – нужно затем выразить  $q$  через  $\Delta S_{hm}$  с помощью формулы (20):

$$q = \sqrt{\Delta \sigma_{hm}^2 + 4} - 4 \quad (31).$$

В результате имеем

$$\begin{aligned} V_{\max} &= v_{\max} \left(1 + \frac{2}{q}\right) = v_{\max} \left(1 + \frac{2}{\sqrt{\Delta\sigma_{hm}^2 + 4} - 4}\right) = \\ &= v_{\max} \left(1 + \frac{2S_{\max}}{\sqrt{4S_{\max}^2 + \Delta S_{hm}^2} - 4S_{\max}}\right) \end{aligned} \quad (32),$$

$$K_m = \frac{S_{\max}}{q} = \frac{S_{\max}}{\sqrt{\Delta\sigma_{hm}^2 + 4} - 4} = \frac{S_{\max}^2}{\sqrt{4S_{\max}^2 + \Delta S_{hm}^2} - 4S_{\max}} \quad (33),$$

$$K_i = S_{\max} \times q = S_{\max} \sqrt{\Delta\sigma_{hm}^2 + 4} - 4 = \sqrt{4S_{\max}^2 + \Delta S_{hm}^2} - 4S_{\max} \quad (34),$$

$$\Delta \lg S_{hm} > 2 \lg(2 + \sqrt{3}) \approx 1.144 S_{\max}$$

Если в качестве третьей «визуальной характеристики» используется  $\Delta \lg S_{hm}$ , то нужно в формулах (29), (30) и (31) выразить  $q$  через  $\Delta \lg S_{hm}$  с помощью формул (22) и (23). Избавляясь от логарифма, получаем

$$q = 10^{\frac{\Delta \lg \sigma_{hm}}{2}} + 10^{-\frac{\Delta \lg \sigma_{hm}}{2}} - 4 = 10^{\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} + 10^{-\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} - 4 \quad (35)$$

Подстановка (35) в (32), (33) и (34) дает формулы (36), (37) и (38) для логарифмических переменных, которые размещены ниже в тексте

Пусть дана некоторая (экспериментальная) кривая, про которую мы предполагаем, что она описывается формулой (8). Из вида такой кривой (см. рис. 137) можно оценить «визуальные характеристики» –  $v_{\max}$ ,  $S_{\max}$  (или  $\lg S_{\max}$ ) и  $\Delta S_{hm}$  (или  $\Delta \lg S_{hm}$ ). Зная эти визуальные характеристики, можно вычислить входящие в формулу (8) параметры  $V_{\max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$ .

$$V_{\max} = v_{\max} \left(1 + \frac{2}{10^{\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} + 10^{-\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} - 4}\right) \quad (36),$$

$$K_m = -\lg S_{\max} + \lg(10^{\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} + 10^{-\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} - 4) \quad (37),$$

$$K_i = -\lg S_{\max} - \lg(10^{\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} + 10^{-\frac{\Delta \lg S_{hm}}{2}} - 4) \quad (38),$$

$$\Delta \lg S_{hm} > 2 \lg(2 + \sqrt{3}) \approx 1.144 \quad (39).$$

Покажем, как использовались эти формулы (36), (37) и (38) для аппроксимации параметров  $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$  по экспериментальным кривым. В качестве примера рассмотрим графики для инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1, которые приведены на рис. 136. Стартовые приближения (одинаковые для всех 6 случаев) для подгонки вычислялись по формулам (36), (37) и (38), в которых использовались значения положения максимума  $\lg S_{max} = -3,3$ , высоты в максимуме  $v_{max} = 0,24$  и  $\Delta \lg S_{hm} = 0,8$ , легко оцениваемые визуально из рис. 136.

Если задаться целью найти для этой экспериментальной зависимости наилучшее (из возможных, т.е. допустимых) приближение моделью вида (8), было бы полезно проследить зависимость параметров  $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$  этой модели от  $\Delta \lg S_{hm}$ . На рис. 138 представлены графики этих параметров как функций  $\Delta \lg S_{hm}$ , рассчитанных по формулам (36), (37) и (38) при фиксированных  $\lg S_{max} = -3,3$  и  $v_{max} = 0,24$ . Заметим, что на рисунке явно видна симметрия кривых  $pK_m(\Delta \lg S_{hm})$  и  $pK_i(\Delta \lg S_{hm})$  относительно линии  $pK_m + pK_i = 6,6$ , отражающая свойство (15). Также из рис. 138 видно, что вблизи нижней границы  $\Delta \lg S_{hm} \approx 1,144$  все параметры демонстрируют сингулярное поведение, поэтому на практике нет смысла стремиться использовать значения  $\Delta \lg S_{hm}$ , близкие к тем, что видны из рисунка «визуально», а лучше взять значения  $\Delta \lg S_{hm}$  из области более-менее регулярного поведения параметров. В нашем случае мы приняли  $\Delta \lg S_{hm} = 2,0$ . С использованием принятых ранее  $\lg S_{max} = -3,3$  и  $v_{max} = 0,24$  расчет по формулам (36), (37) и (38) дает  $V_{max} = 0,32$ ,  $pK_m = 4,1$  и

$pK_i = 2,5$ , которые и использовались в качестве стартовых значений для подгонки.

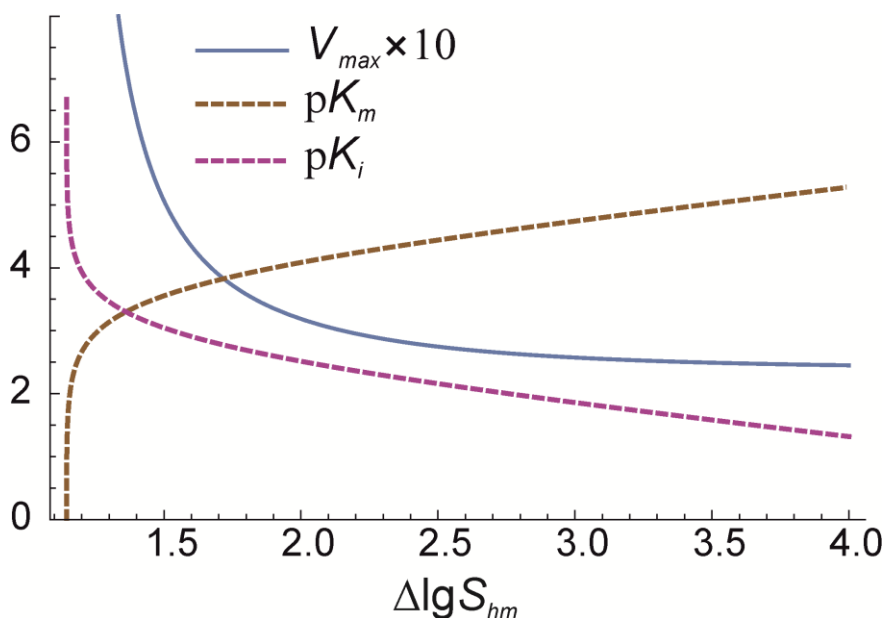


Рис. 138. Параметры модели (8)  $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$  как функции  $\Delta \lg S_{hm}$ , рассчитанные по формулам (36), (37) и (38) при фиксированных  $\lg S_{max} = -3,3$  и  $v_{max} = 0,24$

Финальные же значения параметров формулы (8), полученные в результате подгонки для инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1, представлены в табл. 49. При аппроксимации использовалась комбинация сg:IP модель:метод. Значения получены при различных ограничениях на область изменения параметров. Для краткости эти ограничения обозначены в виде двойных неравенств, «обрамляющих» значения, полученные при подгонке. Для удобства эти ограничения указаны также и на каждом из рис. 136. В таблице также приведены «наглядные» параметры ( $v_{max}$ ,  $\lg S_{max}$ ,  $\Delta \lg S_{hm}$ ), отражающие визуальную форму кривой.

Таблица 49

Параметры, полученные из аппроксимации (модель:метод –  $cg:IP$ ) экспериментально измеренной каталитической активности  $A(\lg S)$  инулиназы из *Kluveromyces marxianus* формулой (8)

Препарат	$V_{max}$	$pK_m$	$pK_i$	$R^2$
Свободная инулиназа	$1,80 \pm 0,02$	$3,69 \pm 0,09$	$3,22 \pm 0,12$	0,999
Инулиназа/ВИОН КН-1	$0,40 \pm 0,02$	$3,57 \pm 0,28$	$2,50 \pm 1,20$	0,995
Инулиназа/АВ-16-ГС	$0,40 \pm 0,03$	$3,48 \pm 0,44$	$3,47 \pm 0,52$	0,988
Инулиназа/АМ 21А	$0,30 \pm 0,04$	$3,49 \pm 0,69$	$3,62 \pm 0,80$	0,921

Как показывают рис. 136 и табл. 49, найденные в результате подгонки параметры сильно зависят от жесткости ограничений, накладываемых на область допустимых значений параметров. При этом их разброс растет с увеличением области допустимых значений (т.е. с уменьшением жесткости ограничений). Однако из последних колонок табл. 49 видно, что «наглядные» характеристики ( $v_{max}$ ,  $\lg S_{max}$ ,  $\Delta \lg S_{hm}$ ) меняются незначительно. Поэтому все рассчитанные параметры  $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$  модели (8) обеспечивают визуально одинаковое качество аппроксимации, однако, с формальной математической точки зрения (например, величины  $R^2$ ) качество ее (незначительно) растет с уменьшением жесткости ограничений – наилучшее качество достигается, когда параметр  $V_{max}$  лежит на границе диапазона допустимых значений. Это еще раз показывает лишь условную полезность этого параметра для анализа данных по зависимости каталитической активности от концентрации субстрата. Кроме того, указанная тенденция сопровождается также и увеличением разности между значениями  $pK_i$  и  $pK_m$ , а следовательно, уменьшения величины  $q^2 = K_i/K_m = 10^{pK_m - pK_i}$ . Эта тенденция означает смещение всех параметров

влево к точке сингулярности по кривым на рис. 138, что, как указывалось выше, неприемлемо с физической точки зрения.

Аппроксимация экспериментальных точек к модели Михаэлиса с ингибированием (8) дает значения параметров  $V_{max}$ ,  $pK_m$  и  $pK_i$ , сильно зависящие от области их допустимых значений. Поэтому их доверительные интервалы, приведенные в табл. 49, могут быть недостоверными. Визуально качество полученных аппроксимаций хорошее (см. рис. 139).

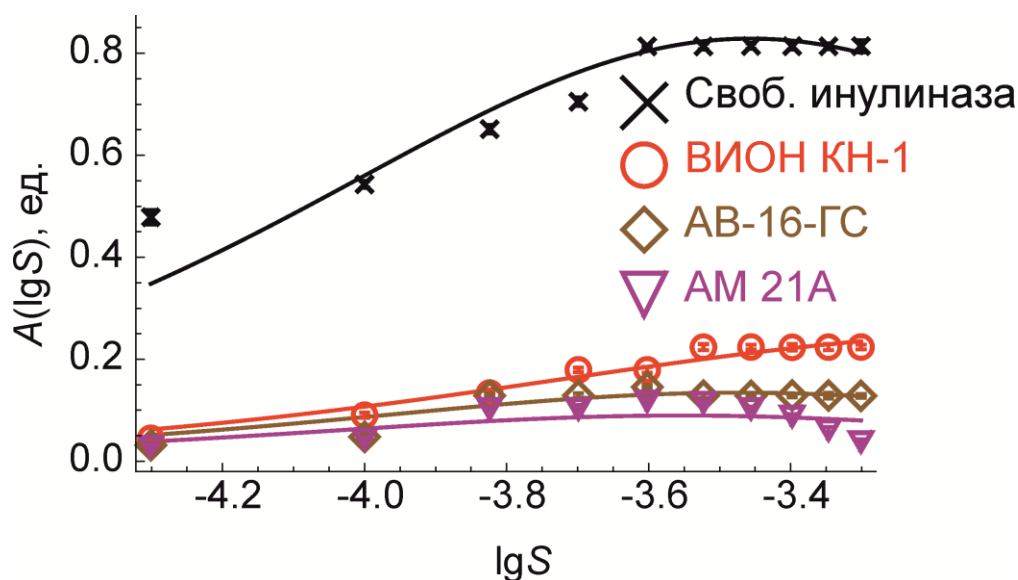


Рис. 139. Зависимости каталитической активности  $A(pS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л), полученные по формуле (8) при значениях параметров, представленных в табл. 50. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

В табл. 50 приведена краткая сводка результатов раздела 6.2.1. по зависимости каталитической активности инулиназы от концентрации субстрата  $A(S)$ .

Краткая сводка результатов раздела 6.2.1. по зависимости A(S) каталитической активности инулиназы из *Кluyveromyces fragilis* от концентрации субстрата

Препарат	Простая модель Михаэлиса (5)		Модель двух ферментов (6)		Модель с ингибированием (8)	
	значения параметров / доверит. интервалы (табл. 46)	визуальное качество аппроксимации (рис. 132)	значения параметров / доверит. интервалы (табл. 47)	визуальное качество аппроксимации (рис. 134, 135)	значения параметров / доверит. интервалы (табл. 50)	визуальное качество аппроксимации (рис. 139)
Свободная инулиназа	разумные	среднее	разумные	среднее	разумные / разумные	хорошее
Инулиназа/ВИОН КН-1	разумные	среднее	разумные	среднее	разумные <sup>1</sup> / разумные <sup>2</sup>	хорошее
Инулиназа/АВ-17-2П	разумные	плохое	разумные	хорошее (рис. 3)	не делалось <sup>3</sup>	не делалось <sup>3</sup>
Инулиназа/АВ-16-ГС	разумные	среднее	разумные	среднее	разумные <sup>1</sup> / разумные <sup>2</sup>	хорошее
Инулиназа/АМ 21А	разумные	среднее	разумные	среднее	разумные <sup>1</sup> / разумные <sup>2</sup>	хорошее
Инулиназа/КУ-2	разумные	плохое	разумные	хорошее (рис. 3)	не делалось <sup>3</sup>	не делалось <sup>3</sup>

<sup>1</sup> при соответствующих ограничениях на область изменения параметров

<sup>2</sup> могут быть недостоверными из-за ограничений

<sup>3</sup> расчеты не проводились, т.к. использование модели двух ферментов (6) позволило получить хорошие результаты



Из полученных расчетов можно заключить, что для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованной на АВ-17-2П и КУ-2, лучшая аппроксимация экспериментальных данных наблюдается при использовании модели двух ферментов. Кинетические параметры для анионита при этом следующие:  $V_{max1} = 0,324 \pm 0,021$ ,  $pK_{m1} = 3,26 \pm 0,99$ ,  $V_{max2} = 0,485 \pm 0,048$ ,  $pK_{m2} = 6,80 \pm 0,19$  ( $R^2 = 0,999$ ), для катионита –  $V_{max1} = 0,373 \pm 0,062$ ,  $pK_{m1} = 3,80 \pm 0,35$ ,  $V_{max2} = 0,252 \pm 0,048$ ,  $pK_{m2} = 6,98 \pm 0,37$  ( $R^2 = 1,00$ ). Можно предположить, что при иммобилизации на матрицах АВ-17-2П и КУ-2 мы имеем в исследуемой системе одновременно две формы дрожжевого фермента, отличающиеся друг от друга по кинетическим характеристикам.

Для свободной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и энзима, иммобилизованного на ВИОН КН-1, АВ-16-ГС и АМ 21А, больше подходит модель с субстратным ингибированием. В результате аппроксимации, согласно этой модели, мы получаем следующие параметры: для свободного фермента  $V_{max} = 1,80 \pm 0,02$ ,  $pK_m = 3,69 \pm 0,09$ ,  $pK_i = 3,22 \pm 0,12$  ( $R^2 = 0,999$ ), для иммобилизованного на ВИОН КН-1 –  $V_{max} = 0,40 \pm 0,02$ ,  $pK_m = 3,57 \pm 0,28$ ,  $pK_i = 2,5 \pm 1,2$  ( $R^2 = 0,995$ ), при адсорбции на АВ-16-ГС –  $V_{max} = 0,40 \pm 0,03$ ,  $pK_m = 3,48 \pm 0,44$ ,  $pK_i = 3,47 \pm 0,52$  ( $R^2 = 0,988$ ), при связывании с матрицей АМ 21А –  $V_{max} = 0,30 \pm 0,04$ ,  $pK_m = 3,49 \pm 0,69$ ,  $pK_i = 3,62 \pm 0,80$  ( $R^2 = 0,921$ ).

## 6.2.2. Зависимость активности свободной и иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus* от концентрации субстрата

### 6.2.2.1. Простейшая модель

В табл. 51 и на рис. 140 представлены результаты аппроксимации экспериментально измеренной активности растительной инулиназы, иммобилизованной на нескольких носителях, по формуле (5).

Таблица 51

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(\lg S)$  инулиназы из *Helianthus tuberosus* формулой (5)

Препарат	$pK_m$	$V_{max}$	$R^2$	Модель: метод
Инулиназа I	$2,74 \pm 0,85$	$86,0 \pm 13,0$	0,969	cl:IP
Инулиназа II	$2,31 \pm 0,43$	$86,0 \pm 7,0$	0,975	cl:IP
Инулиназа III	$2,12 \pm 0,98$	$86,0 \pm 18,0$	0,963	cl:IP
Инулиназа I/AB-17-2П	$2,34 \pm 1,70$	$0,67 \pm 0,23$	0,990	cl:IP
	$2,34 \pm 1,80$	$0,68 \pm 0,23$	0,990	ul:CG
Инулиназа I/КУ-2	$3,12 \pm 1,40$	$1,23 \pm 1,10$	0,984	cl:IP
	$3,12 \pm 1,40$	$1,23 \pm 1,10$	0,984	ul:CG
Инулиназа I/КУ-2-8чС	$1,99 \pm 0,18$	$2,62 \pm 1,00$	0,988	cl:IP
	$1,99 \pm 0,18$	$2,62 \pm 1,00$	0,988	ul:CG

Результаты аппроксимации в принципе можно признать удовлетворительными визуально (рис. 140), а также по полученным данным, но рассмотрим также более сложную модель двух ферментов.

#### 6.2.2.2. Модель двух ферментов

В табл. 52 и рис. 141 представлены результаты аппроксимации экспериментально измеренной активности растительной инулиназы, свободной и иммобилизованной на нескольких носителях, по формуле (6). Результаты аппроксимации нельзя признать полностью удовлетворительными ни визуально, ни по полученным параметрам. Равенство значений  $pK_{m1} = pK_{m2}$  и  $V_{max1} = V_{max2}$  говорит о том, что перед нами по сути простейшая модель Михаэлиса (5). Однако рассмотрим модель с ингибированием.

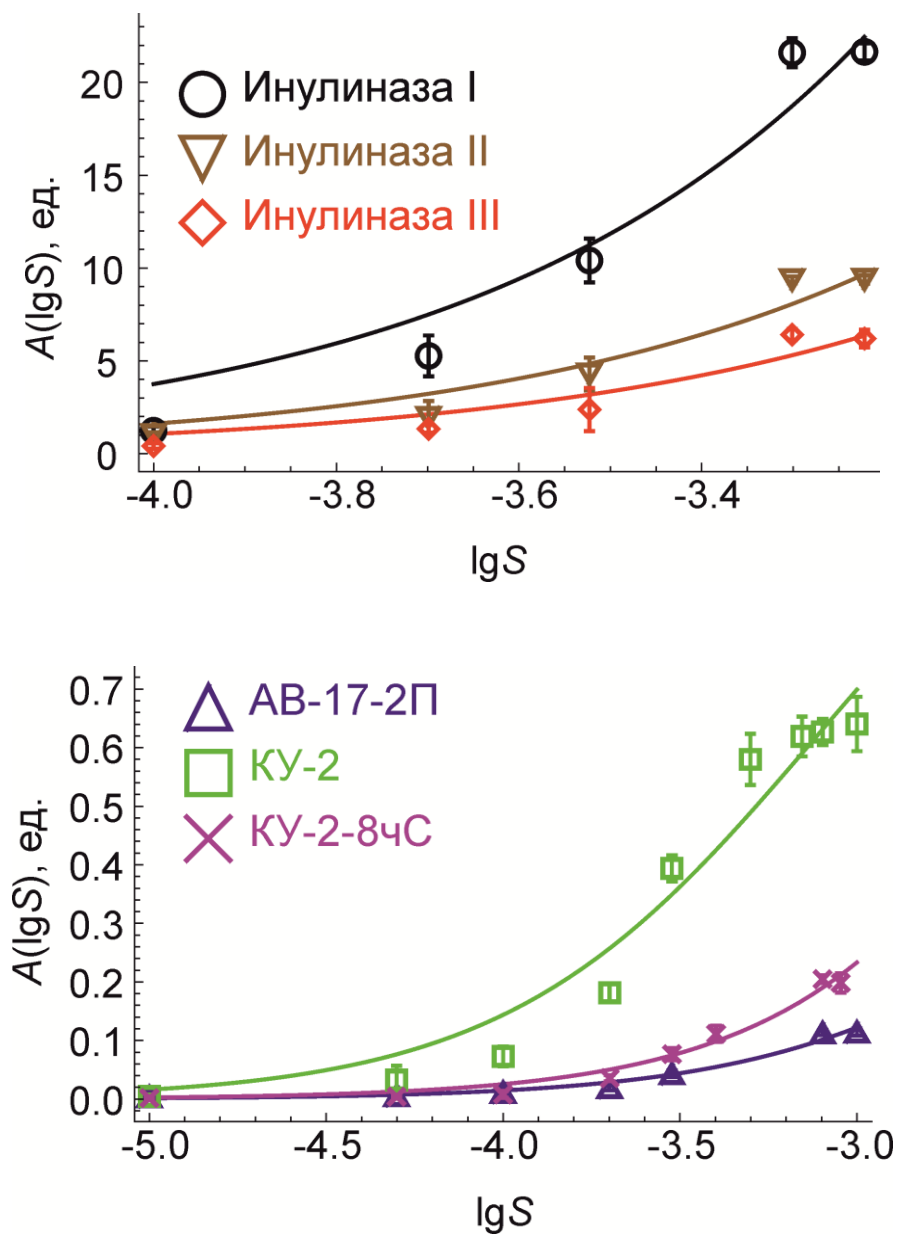


Рис. 140. Зависимости каталитической активности  $A(IgS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л) для трех растительных инулиназ и инулиназы I, иммобилизованной на различных носителях, рассчитанные по простейшей модели. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

Таблица 52

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(IgS)$  инулиназы из *Helianthus tuberosus* формулой (6)

Препарат	$V_{maxI}$	$pK_{mI}$	$V_{max2}$	$pK_{m2}$	$R^2$	Модель: метод
Инулиназа I	$80,0 \pm 9,7$	$2,42 \pm 1,90$	$80,0 \pm 9,70$	$2,42 \pm 1,90$	0,975	cl:IP
Инулиназа II	$80,0 \pm 3,3$	$2,02 \pm 1,70$	$80,0 \pm 5,3$	$2,02 \pm 1,70$	0,978	cl:IP
Инулиназа III	$80,0 \pm 4,7$	$1,83 \pm 1,10$	$80,0 \pm 7,7$	$1,83 \pm 1,21$	0,964	cl:IP
Инулиназа I/AB-17-2П	$0,44 \pm 0,23$	$2,40 \pm 1,80$	$0,29 \pm 0,20$	$2,11 \pm 1,30$	0,990	cl:IP
	$0,34 \pm 0,14$	$2,34 \pm 2,20$	$0,34 \pm 0,14$	$2,34 \pm 2,20$	0,990	gl:CG
Инулиназа I/КУ-2	$0,60 \pm 0,31$	$3,12 \pm 1,30$	$0,62 \pm 0,29$	$3,12 \pm 1,20$	0,984	cl:IP
	$0,62 \pm 0,36$	$3,12 \pm 1,20$	$0,61 \pm 0,24$	$3,12 \pm 1,20$	0,984	ul:CG
Инулиназа I/КУ-2-8чС	$0,80 \pm 0,08$	$2,22 \pm 1,80$	$0,80 \pm 0,08$	$2,22 \pm 1,80$	0,988	cl:IP
	$1,17 \pm 0,40$	$1,99 \pm 1,60$	$1,45 \pm 0,90$	$1,99 \pm 1,30$	0,988	ul:CG

Таблица 53

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(IgS)$  инулиназы из *Helianthus tuberosus* формулой (8)

Препарат	$V_{max}$	$pK_m$	$pK_i$	$R^2$	Модель: метод
Инулиназа I	$50,0 \pm 3,7$	$3,04 \pm 0,38$	$3,06 \pm 1,10$	0,953	cl:IP
Инулиназа II	$50,0 \pm 2,3$	$2,58 \pm 0,21$	$1,37 \pm 0,40$	0,971	
Инулиназа III	$50,0 \pm 5,4$	$2,37 \pm 0,49$	$3,48 \pm 1,70$	0,959	
Инулиназа I/AB-17-2П	$10,0 \pm 2,8$	$1,17 \pm 0,11$	$4,17 \pm 1,30$	0,991	
Инулиназа I/КУ-2	$10,0 \pm 3,7$	$2,13 \pm 0,17$	$3,84 \pm 1,80$	0,991	
Инулиназа I/КУ-2-8чС	$10,0 \pm 1,2$	$1,41 \pm 0,51$	$3,64 \pm 1,65$	0,989	

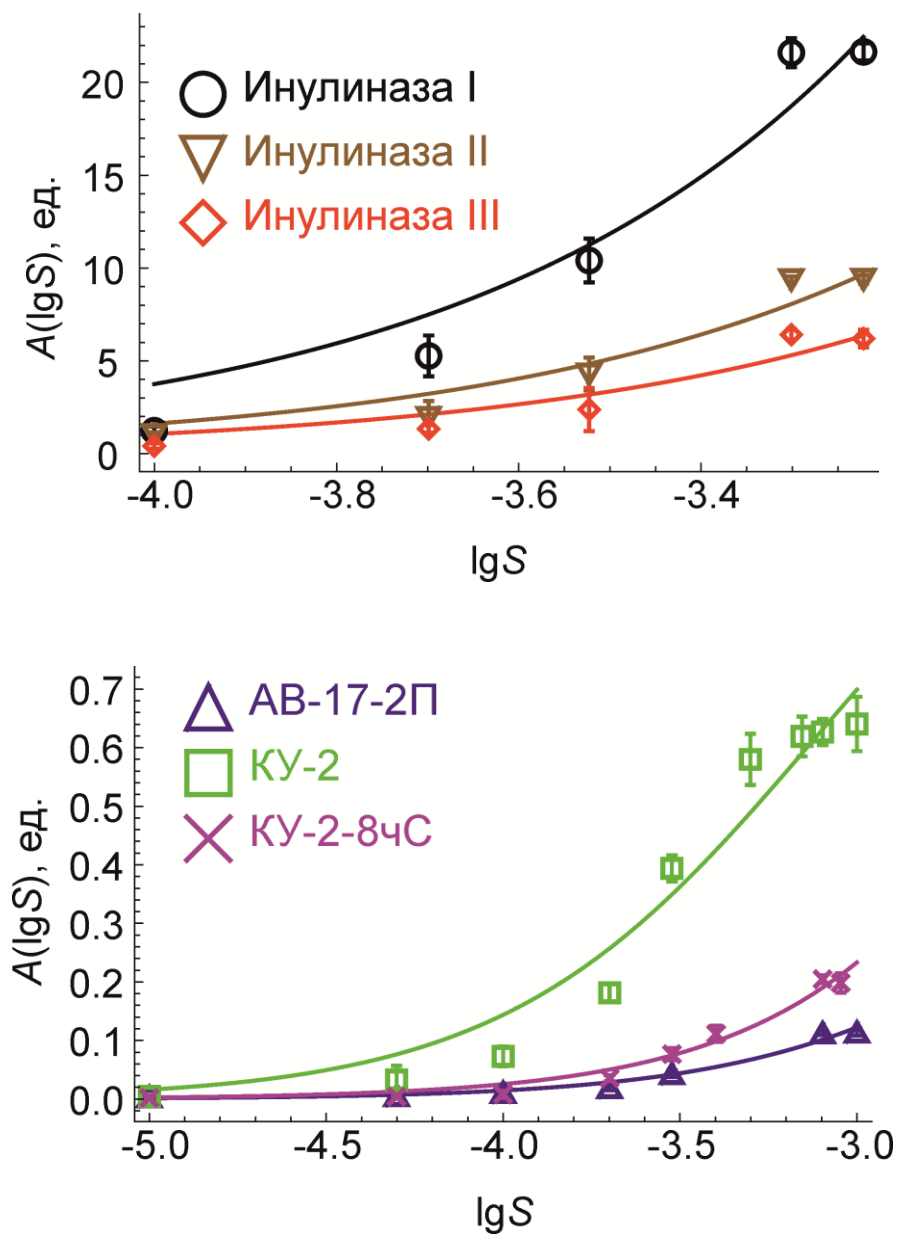


Рис. 141. Зависимости каталитической активности  $A(IgS)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л) для трех растительных инулиназ и инулиназы I, иммобилизованной на различных носителях, рассчитанные по двухферментной модели. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

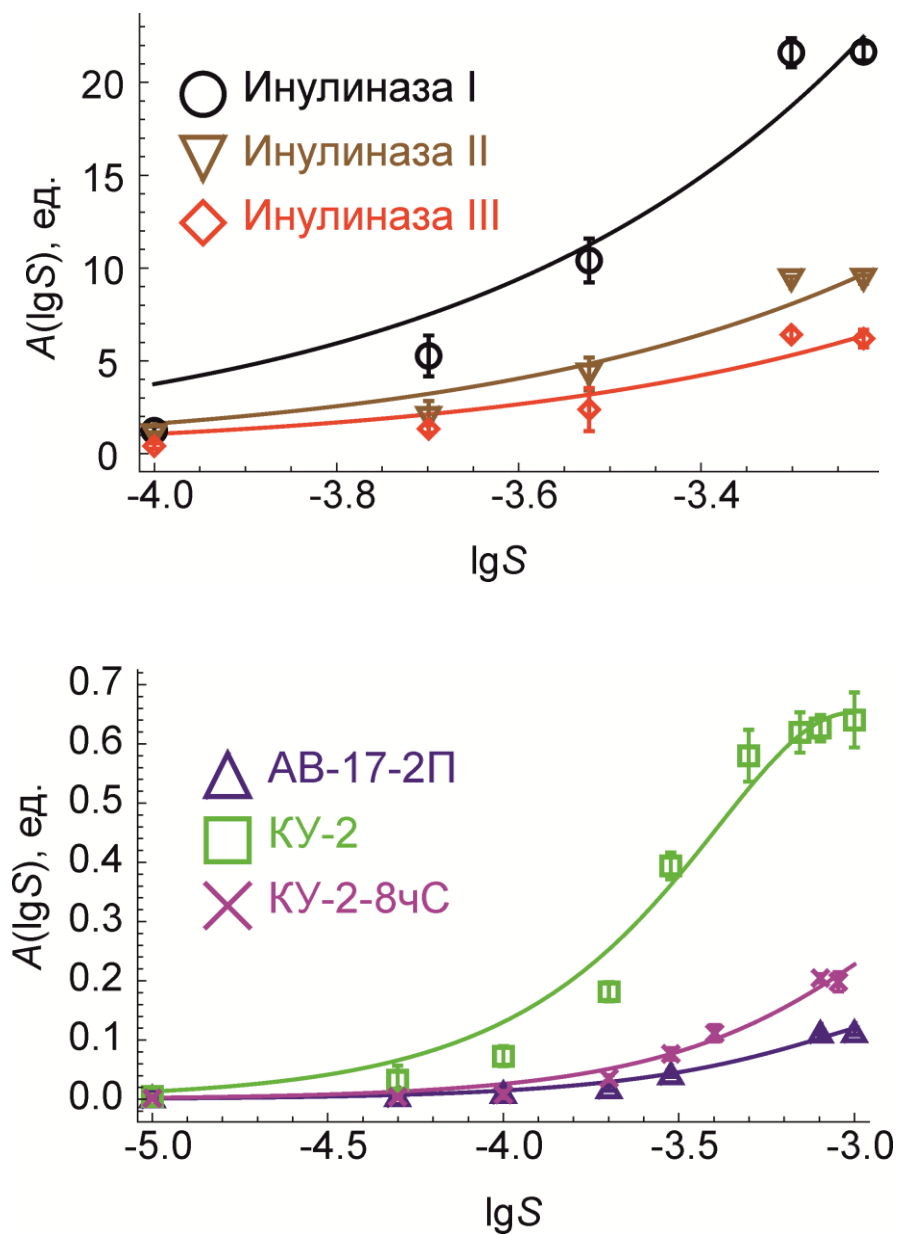


Рис. 142. Зависимости каталитической активности  $A(\lg S)$  от логарифма концентрации субстрата (в моль/л) для трех растительных инулиназ и инулиназы I, иммобилизованной на различных носителях, рассчитанные по модели с ингибированием. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

### 6.2.2.3. Модель с ингибированием

В табл. 53 и на рис. 142 представлены результаты аппроксимации по формуле (8) экспериментально измеренной активности свободной и иммобилизованной растительной инулиназы. Результаты аппроксимации нельзя признать удовлетворительными ни визуально, ни по полученным параметрам.

### 6.2.3. Зависимость активности свободной и иммобилизованной инулиназы от рН среды

Считаем, что зависимость активности инулиназы от рН дается формулой (Диксон М., 1982; Курганов Б.И., 1992; Cornish-Bowden A., 2012):

$$v(H) = \frac{a}{1 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H}} \quad (40),$$

где  $a$  – коэффициент, значение которого пропорционально константе скорости распада определенной (активной) ионной формы фермент-субстратного комплекса, константы  $K_1$  и  $K_2$  характеризуют первую и вторую стадии ионизации молекулы, т.е. «кислую» и «щелочную» ветви кривой зависимости активности фермента от рН среды.

Мы будем пользоваться уравнением (37) в логарифмических переменных:

$$v(pH) = \frac{a}{1 + 10^{pH-pK_1} + 10^{pK_2-pH}} \quad (41).$$

Легко видеть, что эти уравнения совпадают с уравнениями (7), (8), если в последних сделать замены  $S \rightarrow H$ ,  $\lg S \rightarrow -pH$ ,  $K_i \rightarrow K_1$ ,  $K_m \rightarrow K_2$ .

В табл. 54, на рис. 143 и 144 представлены результаты аппроксимации экспериментально измеренной активности инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*, иммобилизованных на нескольких носителях, по

формуле (41). Аппроксимация экспериментальных точек к модели (41) осуществлялась с помощью комбинации модель:метод ug:N; она дает разумный порядок величины и достаточно узкие доверительные интервалы для параметров  $a$  и  $pK_{1,2}$ . Визуально качество полученных аппроксимаций хорошее (см. рис. 143, 144).

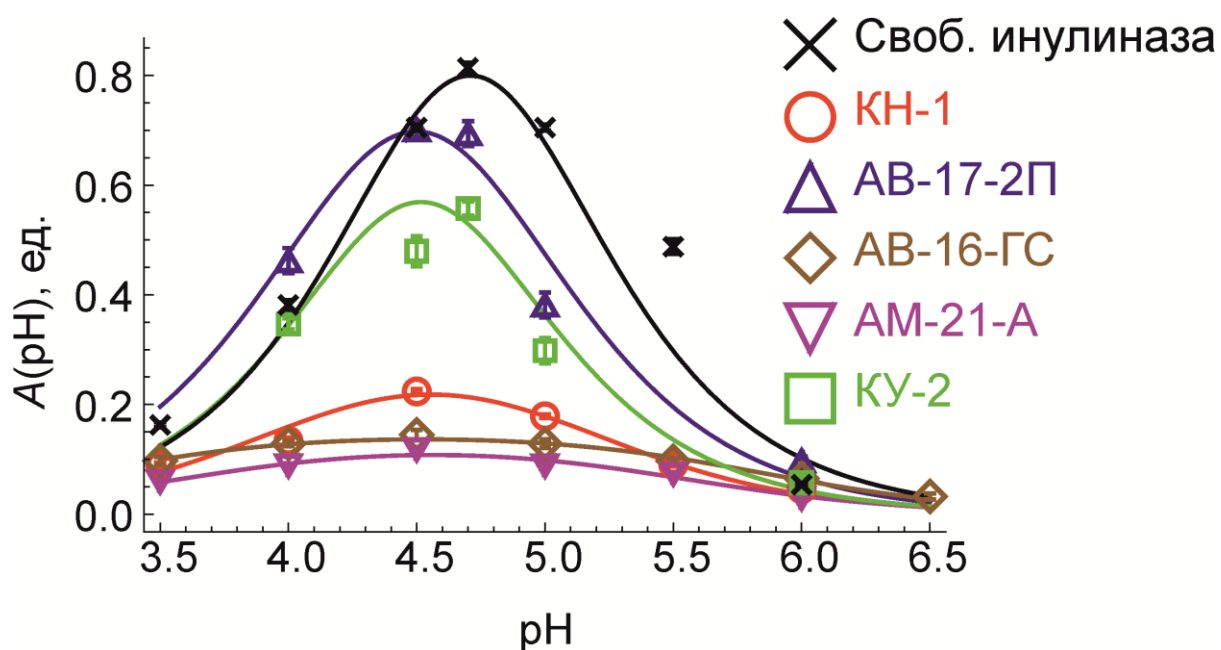


Рис. 143. Зависимости каталитической активности  $A(\text{pH})$  от  $\text{pH}$  для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованной на различных носителях.

Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные



Таблица 54

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(\text{pH})$  инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Образец	$a$	$\text{p}K_1$	$\text{p}K_2$	$R^2$
Препараты дрожжевой инулиназы				
Свободная инулиназа	$3,62 \pm 0,92$	$4,06 \pm 0,15$	$5,05 \pm 0,13$	0,988
Инулиназа/ВИОН КН-1	$0,36 \pm 0,06$	$4,44 \pm 0,52$	$4,56 \pm 0,48$	0,995
Инулиназа/АВ-17-2П	$1,91 \pm 0,40$	$3,20 \pm 0,35$	$5,85 \pm 0,18$	0,993
Инулиназа/АВ-16-ГС	$0,15 \pm 0,02$	$3,60 \pm 0,26$	$5,53 \pm 0,22$	0,998
Инулиназа/АМ 21А	$0,13 \pm 0,02$	$4,89 \pm 0,30$	$4,14 \pm 0,40$	0,993
Инулиназа/КУ-2	$3,29 \pm 0,86$	$4,96 \pm 0,14$	$4,46 \pm 0,13$	0,993
Препараты растительной инулиназы				
Инулиназа I	$29,7 \pm 2,4$	$6,02 \pm 0,10$	$7,44 \pm 0,12$	0,997
Инулиназа II	$12,6 \pm 1,9$	$5,50 \pm 0,25$	$7,04 \pm 0,25$	0,999
Инулиназа III	$7,92 \pm 1,7$	$3,74 \pm 0,48$	$5,52 \pm 0,25$	0,996
Инулиназа/АВ-17-2П	$0,136 \pm 0,009$	$4,61 \pm 0,09$	$7,16 \pm 0,11$	0,981
Инулиназа/КУ-2	$0,753 \pm 0,040$	$4,57 \pm 0,08$	$7,37 \pm 0,10$	0,986
Инулиназа/КУ-2-8чС	$0,280 \pm 0,012$	$4,78 \pm 0,08$	$7,14 \pm 0,08$	0,984

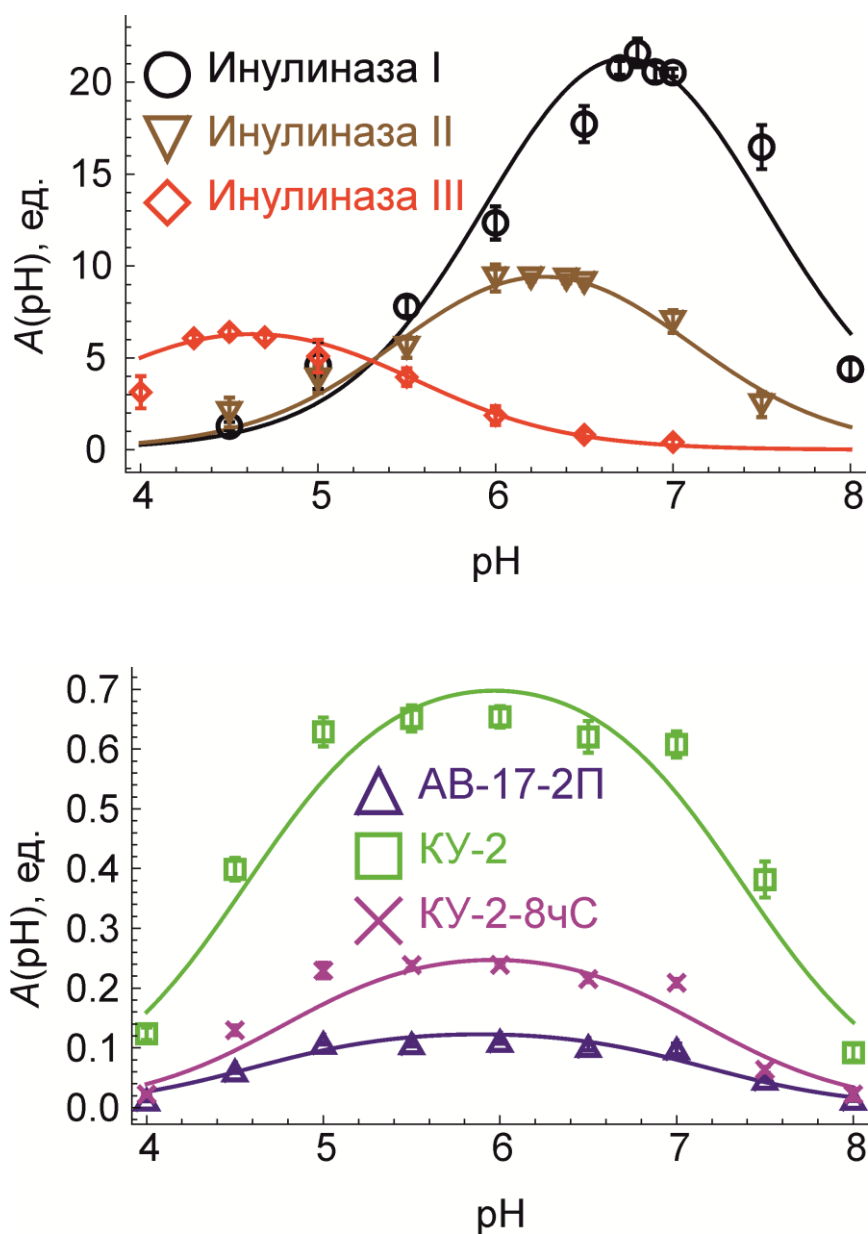


Рис. 144. Зависимости каталитической активности  $A(\text{pH})$  от pH для трех растительных инулиназ и инулиназы I, иммобилизованной на различных носителях. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

#### 6.2.4. Зависимость активности свободной и иммобилизованной инулиназы от температуры

Известно, что зависимость активности фермента от температуры дается формулой (Корниш-Боуден Э., 1979; Cornish-Bowden A., 2012):

$$v(T) = \frac{A_T \exp\left(-\frac{E_a}{RT_K}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT_K}\right)} = \frac{\exp\left(\alpha - \frac{E_a}{R(T_0 + Tc)}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{R(T_0 + Tc)}\right)} \quad (42),$$

где  $E_a$  – энергия активации процесса;  $\Delta S$ ,  $\Delta H$  – изменения энтропии и энтальпии изучаемой реакции. Мы будем пользоваться второй формулой (42), где для удобства введена температура в градусах Цельсия ( $T_0 = 273$  °С). Кроме этого, во второй формуле (39) вместо масштабирующей константы  $A_T$  введен ее логарифм  $\alpha = \ln A_T$ , который проще вычисляется в оптимизационных процедурах.

В табл. 55 и на рис. 145 представлены результаты аппроксимации экспериментально измеренной активности инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованной на нескольких носителях, по формуле (42). Параметр  $\alpha$  безразмерный, энергетические величины  $E_a$  и  $\Delta H$  даны в кДж/моль; изменение энтропии  $\Delta S$  – кДж/(моль • К); значения температуры даны в °С. В таблицу занесены только результаты аппроксимации с помощью тех комбинаций модель:метод, которые давали лучшую визуальную картину. Как видно из табл. 53, подгонка дает разумный порядок величины и достаточно узкие доверительные интервалы для параметров  $\alpha$ ,  $E_a$ ,  $\Delta S$  и  $\Delta H$ . Некоторое исключение представляет случай с КУ-2, в котором несколько (довольно близких) наборов параметров, приведенных в табл. 55, давали сравнимые визуальные картины аппроксимации (они представлены на рис. 146).

Таблица 55

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности  $A(t)$  инулиназы из

*Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Образец	$E_a$ , кДж/моль	$\alpha$	$\Delta H$ , кДж/моль	$\Delta S$ , кДж/(моль • К)	$R^2$	Модель: метод
<b>Препараты дрожевой инулиназы</b>						
Свободная инулиназа	101,0 ± 3,0 99,8 ± 3,0	37,8 ± 1,2 37,4 ± 1,1	222,0 ± 3,2 224,0 ± 3,2	0,686 ± 0,010 0,690 ± 0,010	0,998 0,998	ul:CG ul:QN
Инулиназа/ВИОН КН-1	45,0 ± 5,9 43,8 ± 5,5	14,4 ± 2,1 13,9 ± 2,0	248,0 ± 32,0 264,0 ± 34,0	0,704 ± 0,088 0,750 ± 0,094	0,995 0,995	ul:CG ul:QN
Инулиназа/AB-17-2П	31,7 ± 6,4	11,0 ± 2,3	228,0 ± 56,0	0,655 ± 0,160	0,997	ul:QN
Инулиназа/AB-16-ГС	82,5 ± 15,0	27,5 ± 5,5	197,0 ± 17,0	0,573 ± 0,048	0,998	ul:CG
	81,7 ± 15,0	27,2 ± 5,4	199,0 ± 18,0	0,577 ± 0,049	0,998	ul:QN
	92,0 ± 17,0	31,0 ± 6,2	197,0 ± 15,0	0,573 ± 0,042	0,998	cl:IP
Инулиназа/AM 21A	111,0 ± 41,0	37,1 ± 15,0	288,0 ± 74,0	0,835 ± 0,210	0,998	ul:CG
	103,0 ± 35,0	34,2 ± 12,0	323,0 ± 93,0	0,932 ± 0,260	0,999	ul:N
Инулиназа/КУ-2	57,4 ± 9,5	20,6 ± 3,6	190,0 ± 34,0	0,567 ± 0,098	0,962	ul:NM
	49,8 ± 9,0	17,7 ± 3,4	153,0 ± 29,0	0,450 ± 0,082	0,993	ul:N
<b>Препараты растительной инулиназы</b>						
Инулиназа I	80,0 ± 12,0	34,2 ± 4,7	186,0 ± 9,0	0,584 ± 0,030	0,992	cl:IP
	87,9 ± 12,0	37,5 ± 4,6	184,0 ± 9,0	0,582 ± 0,030	0,976	cg:IP
	76,5 ± 11,0	32,7 ± 4,5	192,0 ± 9,0	0,603 ± 0,029	0,992	ul:CG
	90,0 ± 14,0	38,0 ± 5,5	183,0 ± 10,0	0,576 ± 0,034	0,980	ul:NM
Инулиназа II	80,0 ± 34,0	33,5 ± 13,0	180,0 ± 27,0	0,570 ± 0,084	0,996	cl:IP
	95,0 ± 38,0	39,3 ± 15,0	183,0 ± 26,0	0,580 ± 0,085	0,994	cg:IP
	89,2 ± 38,0	37,1 ± 15,0	183,0 ± 26,0	0,580 ± 0,084	0,995	ul:CG
	89,2 ± 37,0	37,1 ± 15,0	183,0 ± 26,0	0,581 ± 0,082	0,994	ul:NM
Инулиназа III	92,0 ± 27,0	37,3 ± 11,0	188,0 ± 14,0	0,590 ± 0,046	0,984	cl:IP
	89,4 ± 27,0	36,3 ± 11,0	184,0 ± 14,0	0,578 ± 0,046	0,980	ul:CG
	89,2 ± 28,0	36,5 ± 11,0	183,0 ± 15,0	0,577 ± 0,052	0,957	ul:NM
	90,2 ± 21,0	36,5 ± 8,2	204,0 ± 15,0	0,640 ± 0,045	0,991	ul:QN
Инулиназа/AB-17-2П	90,0 ± 14,0	31,2 ± 5,2	183,0 ± 14,0	0,550 ± 0,041	0,902	cl:IP
Инулиназа/КУ-2	90,0 ± 13,0	32,7 ± 5,0	184,0 ± 13,0	0,550 ± 0,037	0,931	cl:IP
	97,6 ± 15,0	35,4 ± 5,7	191,0 ± 13,0	0,572 ± 0,040	0,922	cg:IP
Инулиназа/КУ-2-8ЧС	90,0 ± 19,0	31,8 ± 7,1	183,0 ± 15,0	0,550 ± 0,045	0,919	cl:IP
	94,6 ± 22,0	33,1 ± 8,1	190,0 ± 16,0	0,567 ± 0,048	0,879	ul:NM

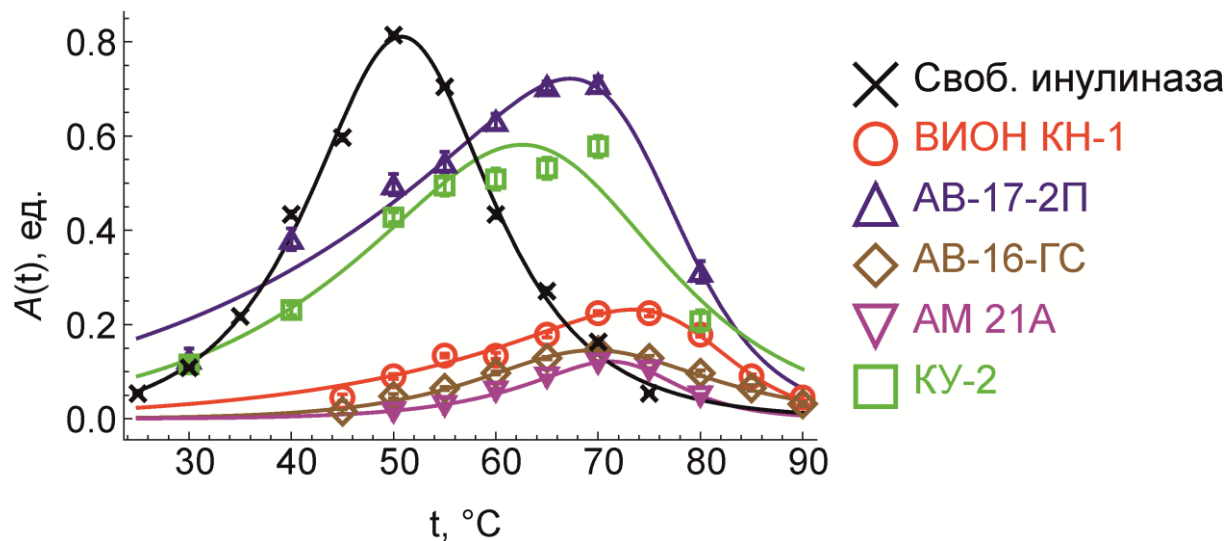


Рис. 145. Зависимости каталитической активности  $A(t)$  от температуры для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, свободной и иммобилизованной на различных носителях. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

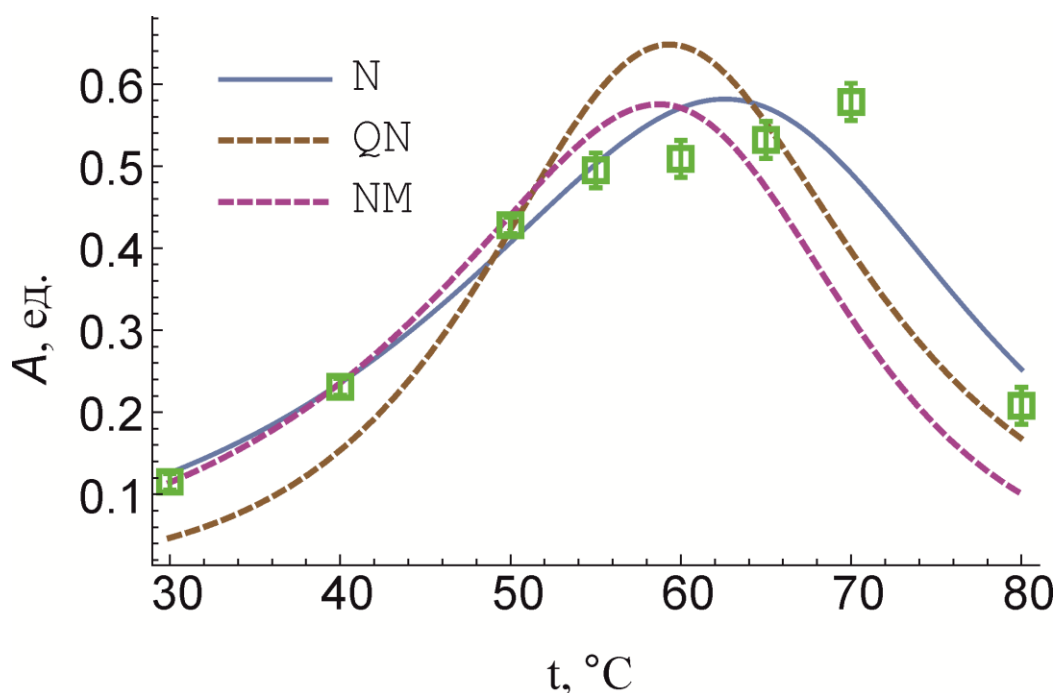


Рис. 146. Зависимости каталитической активности  $A(t)$  от температуры для дрожжевой инулиназы, иммобилизованной на КУ-2. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

На основании полученных расчетных данных интересно проверить линейную связь между  $\Delta H$  и  $\Delta S$  (энтальпийно-энтропийный компенсационный эффект). Отражающий эту связь рис. 147 построен по данным, приведенным в 4 и 5 колонках табл. 55.

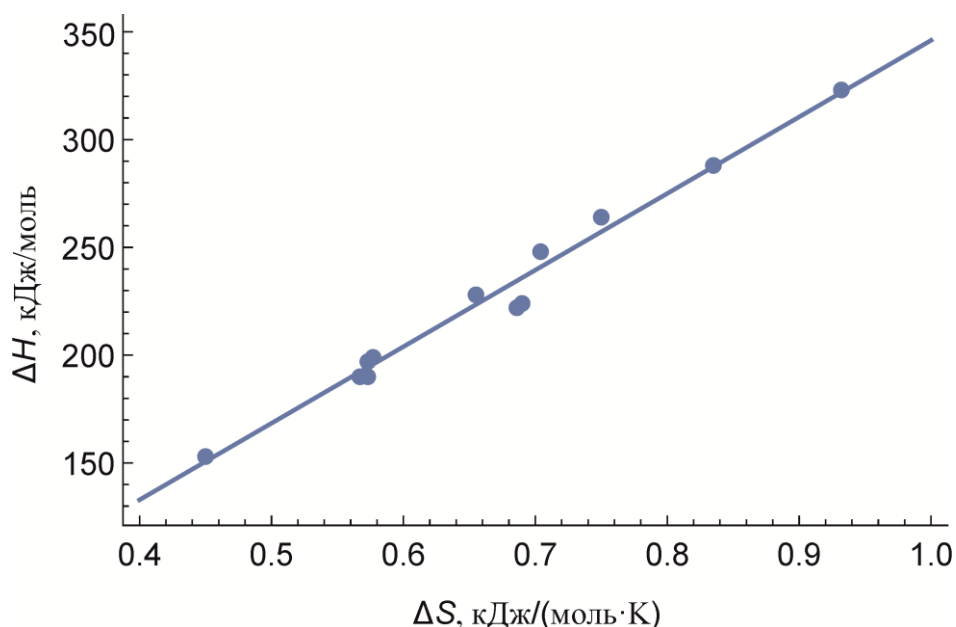


Рис. 147. График, отражающий энтальпийно-энтропийный компенсационный эффект, построенный по значениям  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , рассчитанным для инулиназы из *Kluveromyces marxianus*

В табл. 55 и на рис. 148 представлены результаты аппроксимации экспериментально измеренной активности растительной инулиназы, иммобилизованной на нескольких носителях, по формуле (42). Как видно из таблицы, подгонка дает разумный порядок величины и достаточно узкие доверительные интервалы для параметров  $\alpha$ ,  $E_a$ ,  $\Delta S$  и  $\Delta H$  при использовании большинства методов. Пример визуальной аппроксимации для разных методов подгонки показан для КУ-2 на рис. 149. Верхний рисунок построен только по «рекомендованным значениям» (NM), нижний – по значениям, полученным всеми используемыми нами методами.

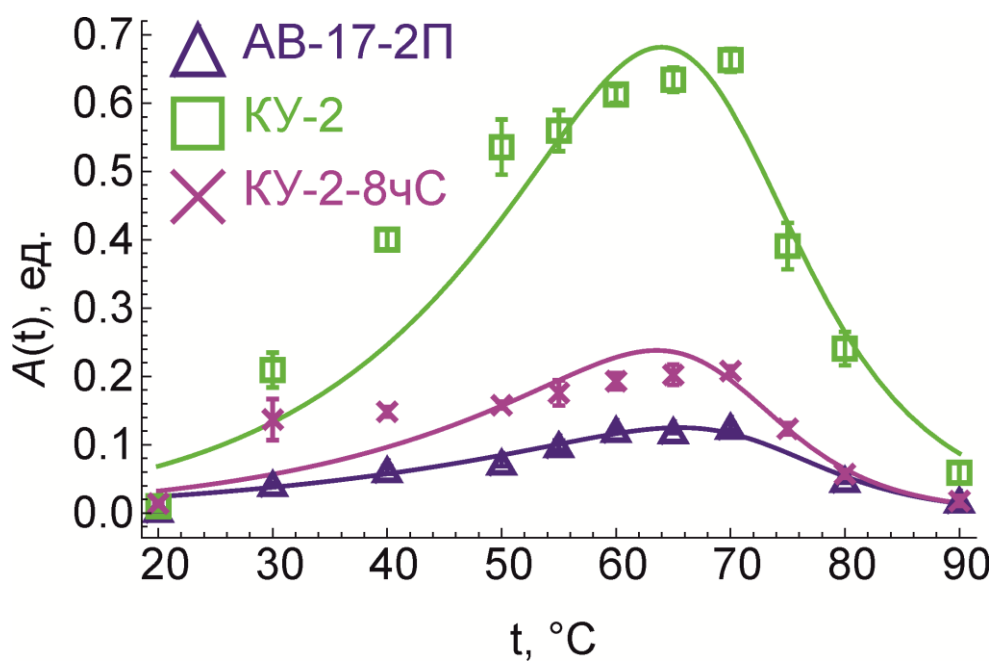
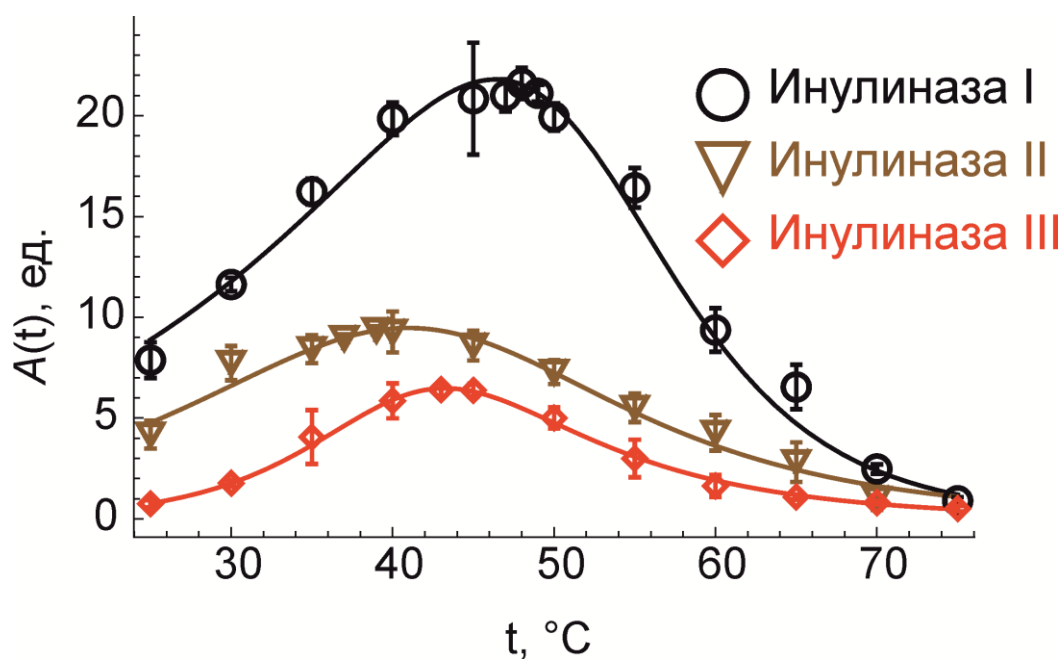


Рис. 148. Зависимости каталитической активности  $A(t)$  от температуры для трех растительных инулиназ и инулиназы I, иммобилизованной на различных носителях. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

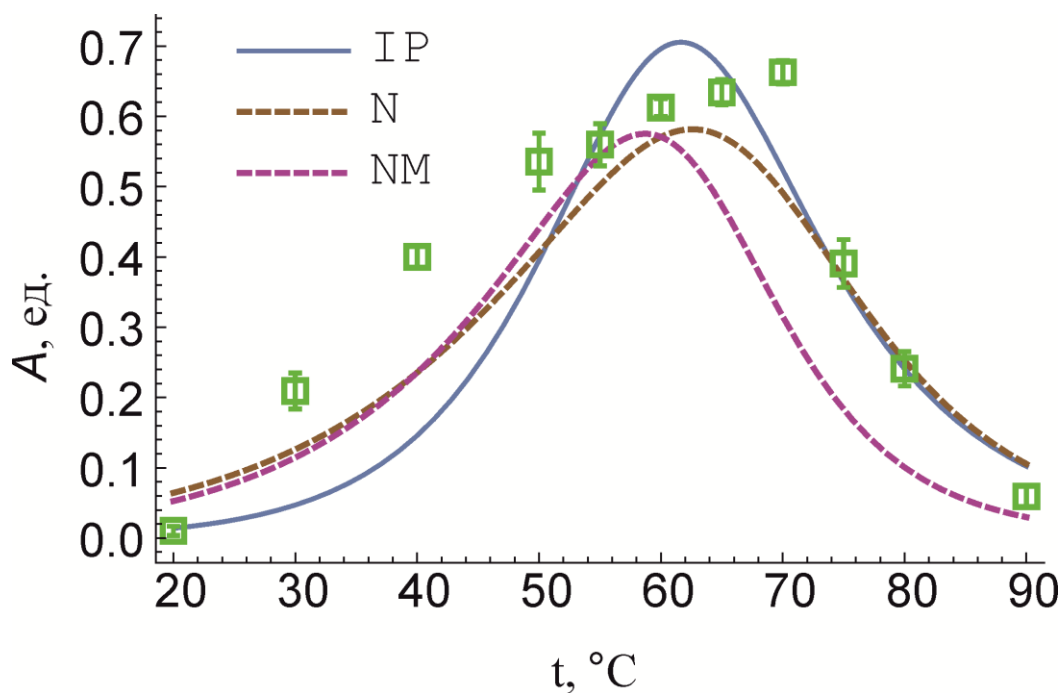


Рис. 149. Зависимости каталитической активности  $A(t)$  от температуры для растительной инулиназы I, иммобилизованной на КУ-2. Точки – результаты эксперимента, кривые – расчетные данные

На основе полученных данных интересно проверить линейную связь между  $\Delta H$  и  $\Delta S$  (энтальпийно-энтропийный компенсационный эффект). Отражающий эту связь рис. 150 построен по данным, приведенным в 4 и 5 колонках табл. 55. Верхний рисунок построен только по «рекомендованным значениям» (NM), нижний – по значениям, полученным всеми используемыми нами методами.



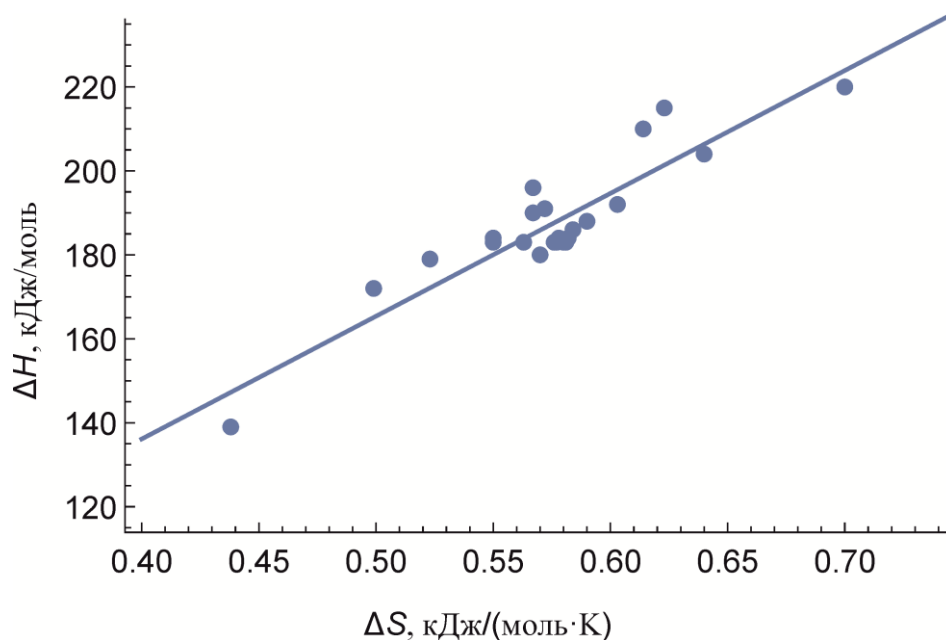
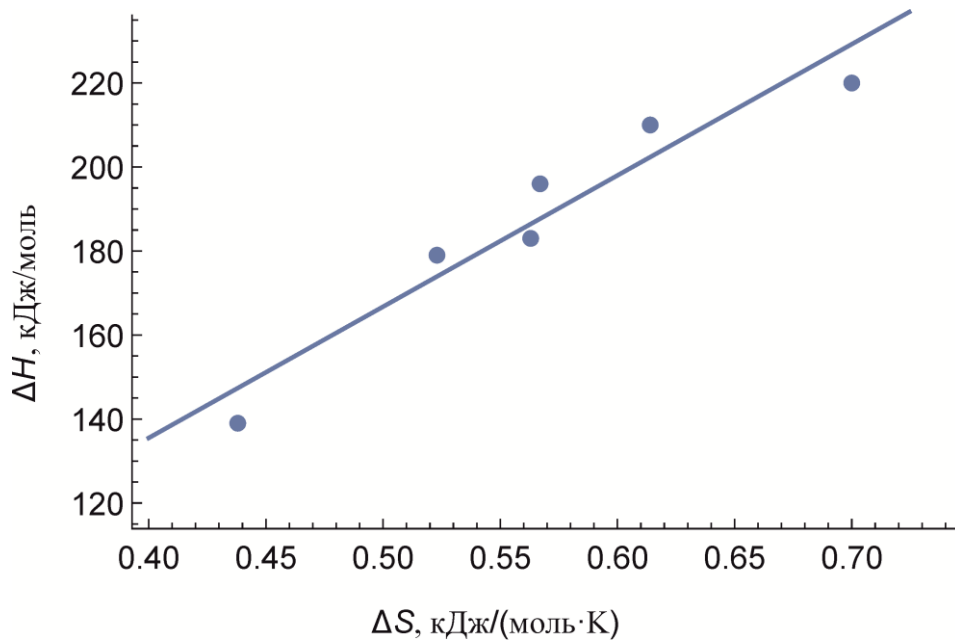


Рис. 150. График, отражающий энтальпийно-энтропийный компенсационный эффект, построенный по значениям  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , рассчитанным для инулиназы из *Helianthus tuberosus*. Верхний рисунок построен только по «рекомендованным значениям» (NM), нижний – по всем рассчитанным значениям

### 6.3. Исследование закономерностей процесса термической инактивации иммобилизованной инулиназы

Исследованы закономерности термической модификации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованной на ВИОН КН-1, в различном интервале температур. На рис. 151 представлены кривые термоинактивации связанного с носителем фермента. За 100% принята максимальная ферментативная активность иммобилизованной инулиназы без какой-либо предварительной обработки, наблюдаемая нами при 70 °С, рН 4,5. Установлено, что нагревание раствора в течение 60 мин в диапазоне температур 50-80 °С не приводит к полной инактивации гетерогенного ферментного препарата, лишь инкубация при 90 °С в течение 1 ч лишает инулиназу способности гидролизовать инулин. Кривые термоинактивации инулиназы, связанной с волокном ВИОН КН-1, при 50-70 °С сходны по форме. При инкубации иммобилизованного препарата в течение 1 ч при указанных температурах каталитическая активность снижалась на 70 %. Кривые термопревращений иммобилизованной инулиназы при 80-90 °С имеют 2 участка: первый (время инкубирования менее 10 мин) характеризуется высокой скоростью снижения каталитической способности, и второй (время инкубирования от 20 до 60 мин) отличается стабилизацией остаточной активности. Аналогичную закономерность мы наблюдали в процессе инкубации свободного фермента при 60, 70 и 80 °С.

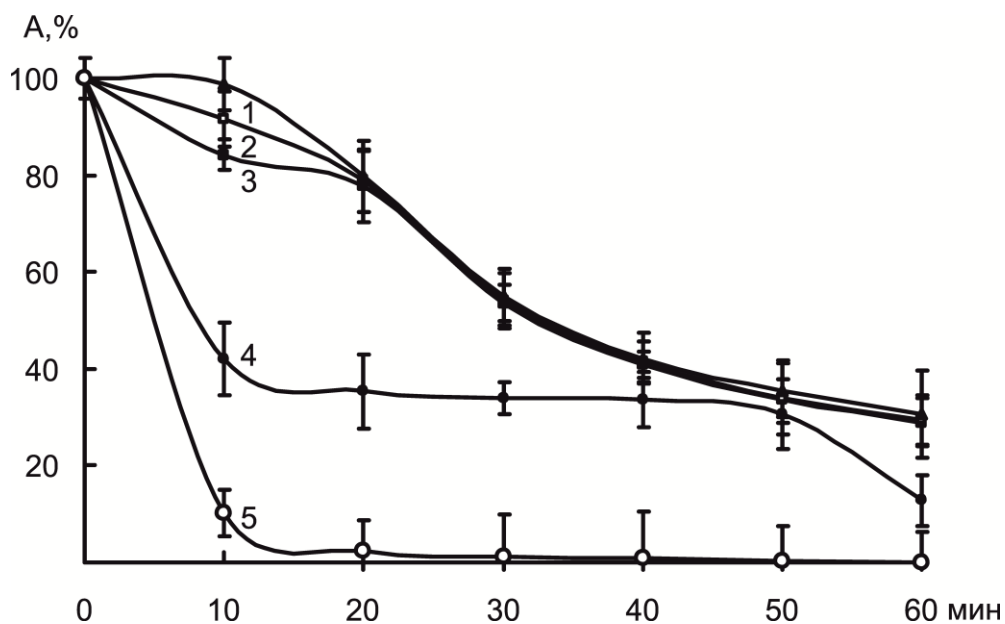


Рис. 151. Зависимость каталитической активности (А) иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 от времени термической инактивации: 1 – 50, 2 – 60, 3 – 70, 4 – 80, 5 – 90 °С

Данные, полученные посредством дифференциального термического анализа, для иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы, показывают (рис. 152), что пики на кривой для фермента, связанного с матрицей носителя, смещены в область более высоких температур. Анализ полученных результатов свидетельствует о более высокой термоустойчивости иммобилизованной инулиназы по сравнению со свободной. Взаимодействие поверхностных аминокислотных остатков белка с матрицей ионообменного волокна ВИОН КН-1, по-видимому, препятствует формированию макромолекулярных агрегатов, увеличивая стабильность ферментного образца по отношению к денатурирующим воздействиям.

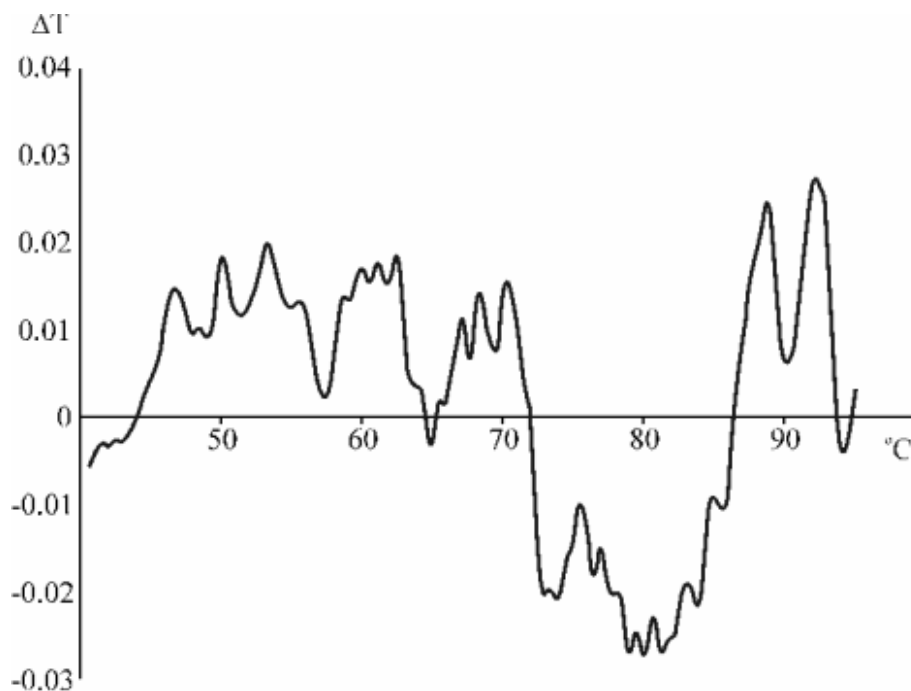


Рис. 152. Кривая дифференциального термического анализа процесса плавления иммобилизованной инулиназы

Форма кривых термической инактивации растворимой формы дрожжевой инулиназы при температурах 60, 70 и 80 °С и иммобилизованного на катионообменном волокне ВИОН КН-1 фермента при 80 и 90 °С указывает на возможность участия четвертичной структуры в регуляции каталитической активности за счет процессов взаимодействия субъединиц. Изменение олигомерного состояния аллостерических ферментов при варьировании условий среды (рН, ионная сила, температура) является одним из механизмов регуляции активности ферментов в клетке (Курганов Б.И., 1978).

На рис. 153 показана динамика процесса инактивации иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus*. Установлено, что при 50 и 60 °С инкубация инулиназы не приводит к скачкообразным изменениям каталитической активности препарата, фермент инактивируется постепенно, сохраняя соответственно 84 и 81 % каталитической способности при 60-минутном прогревании образцов. После 40 минут инкубации при 70 °С наблюдается резкое уменьшение каталитической активности образца,

которая снижается до 40 % при 60-минутном прогревании. При 80 °С процесс инактивации происходит интенсивнее и через 60 минут сохраняется лишь 15 % активности препарата. Высокая потеря каталитической способности отмечается при 90 °С: уже после 10 минут инкубации энзима в буферном растворе процент сохранения активности составляет 59 %, а через 60 минут – лишь 7 % первоначальной активности.

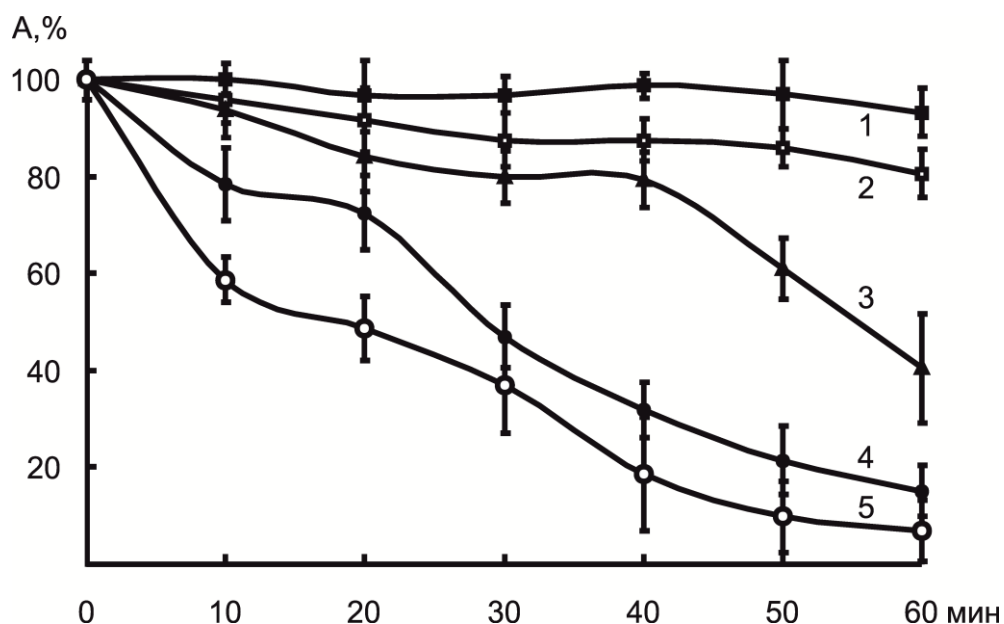
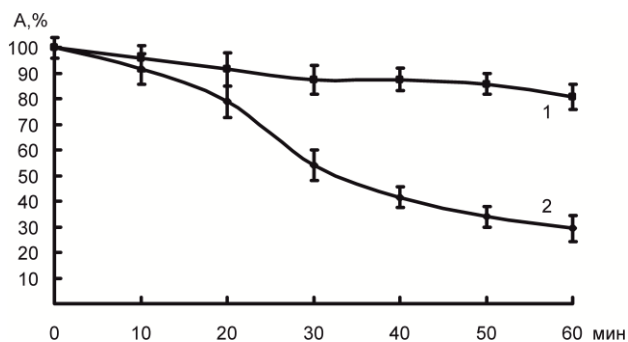
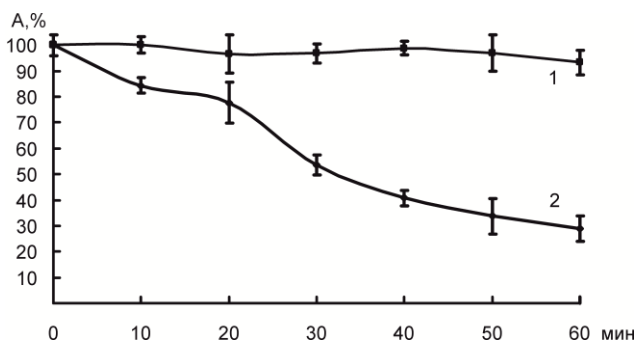


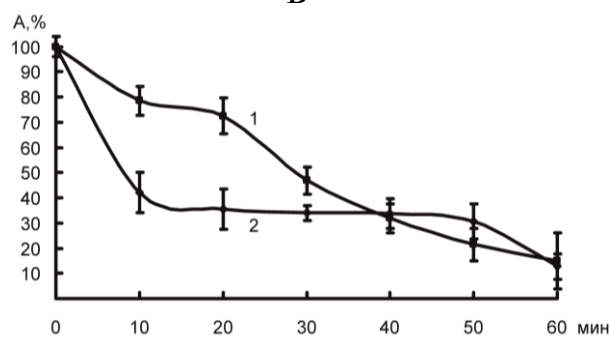
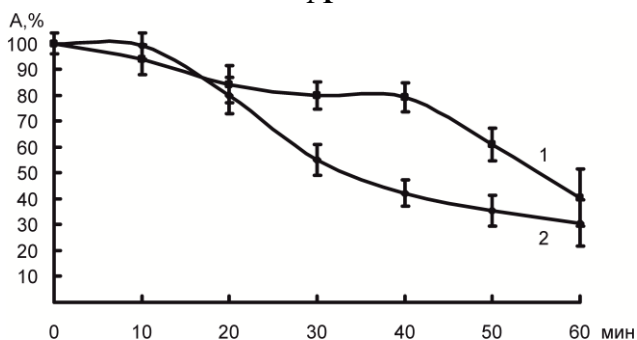
Рис. 153. Зависимость каталитической активности (А) иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus* от времени термической инактивации: 1 – 50, 2 – 60, 3 – 70, 4 – 80, 5 – 90 °С

При сравнении между собой иммобилизованных инулиназ растительного и дрожжевого происхождения отчетливо видно (рис. 154), что фермент, выделенный из *Helianthus tuberosus*, однозначно более устойчив при 50, 60, 70 и 90 °С, чем инулиназа, полученная из *Kluveromyces marxianus*. Интересно, что при этом в ходе инкубации при 80 °С в интервале времени 40-60 мин оба фермента не отличаются по тестируемому показателю.



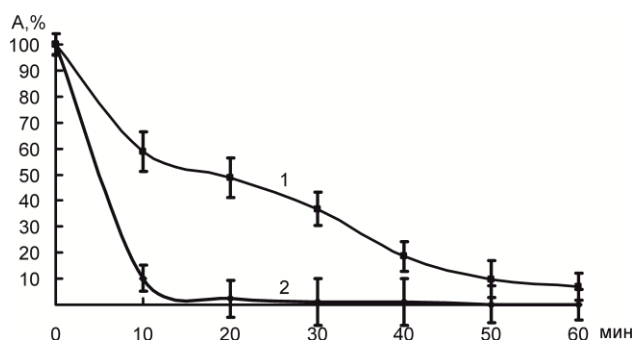
А

Б



В

Г



Д

Рис. 154. Процент сохранения активности (А) иммобилизованных инулиназ из *Helianthus tuberosus* (1) и *Kluveromyces marxianus* Y-303 (2) А – при 50 °С, Б – при 60 °С, В – при 70 °С, Г – при 80 °С, Д – при 90 °С

Несмотря на различие в закономерностях протекания процесса термической инактивации иммобилизованных инулиназ дрожжевого и растительного происхождения, адсорбция на ионообменных смолах и волокнах не только позволяет увеличить диапазон значений температурного оптимума их функционирования, стабилизирует конформацию молекул, но также защищает пространственную структуру ферментов, повышая термоустойчивость препаратов.

#### 6.4. Взаимодействие молекул инулиназы с матрицей хитозана, УФ-индуцированные изменения функциональных свойств иммобилизованной инулиназы

Хитозан является одним из наиболее перспективных полимеров в биоинженерии из-за его высокой лабильности, способности образовывать гели, пленки, гранулы. (Скрябин К.Г., 2002). В настоящее время приоритетными направлениями в развитии исследований по созданию и изучению аналогов хитозана и хитина являются разработки производных гликанов с повышенной катионоактивностью, используемых для иммобилизации биологически активных веществ. Относительно новым направлением является подготовка аналогов хитозана для создания наносистем, используемых далее в качестве носителей биопрепаратов медицинского и промышленного назначения (Сливкин Д.А., 2011).

Исследования изменений структурно-функциональных свойств ферментов под действием различных денатурирующих факторов (в том числе УФ-облучения) и стабилизирующих агентов (полимерные матрицы для иммобилизации) обладают высокой актуальностью.

Цель следующего блока представленной работы состояла в выявлении механизма сорбции инулиназы на матрице хитозанов и изучении УФ-индуцированных изменений функциональных свойств иммобилизованной инулиназы.

Объектом исследования был препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия), который мы подвергали дополнительной очистке. В роли носителя для иммобилизации выступали матрицы хитозанов различной молекулярной массы и степени деацетилирования, синтезированные ЗАО «Биопрогресс»: хитозан кислоторастворимый среднемолекулярный ХТЗ №07 ( $M_r = 200$  кДа, степень деацетилирования – СД – 82 %), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ХТЗ №12 ( $M_r = 350$  кДа, СД = 94,85%), хитозан пищевой ( $M_r < 100$  кДа) и сукцинат хитозана.

#### 6.4.1. Механизм сорбции инулиназы на матрице хитозанов

В первой серии экспериментов мы подбирали условия для иммобилизации инулиназы на матрице хитозанов различной молекулярной массы и степени деацетилирования.

Хитозан является слабым основанием с  $pK_a = 6,5$ , что близко к значению  $pK_a$  остатков D-глюкозамина (MacLaughlin F.C., 1998). Изоэлектрическая точка инулиназы составляет 3,9-4,5 (Arand M., 2002, Pessoa A., 1997, Xiao R., 1989, Ji Y., 1998, Warchol M., 2002).

Иммобилизацию осуществляли в ацетатных буферах (pH 4,0 и 5,0) и в фосфатном буфере (pH 7,4). При pH 4,0 суммарный заряд молекулы инулиназы и матрицы хитозана положительный; при pH 5,0 матрица хитозана по-прежнему характеризуется положительным зарядом, общий заряд инулиназы отрицательный; при pH 7,4 молекула инулиназы заряжена отрицательно, заряд хитозана близок к нулевому значению.

На рис. 155 и 156 отражены значения таких показателей, как содержание белка и удельной активности гетерогенных препаратов. При pH 4,0 сорбция белка минимальна. Можно предположить, что в процессе иммобилизации инулиназы на матрице хитозанов высокое значение имеют электростатические взаимодействия (при pH 4,0 оба компонента системы заряжены положительно).

Наибольшая степень сорбции белка на матрице всех хитозанов детектировалась при pH 7,4 (хитозан имеет заряд, близкий к нулевому значению), а не 5,0 (компоненты системы имеют разноименные заряды), что свидетельствует о существенном вкладе в механизм взаимодействия инулиназы и матрицы носителя не только электростатических, но и гидрофобных взаимодействий.



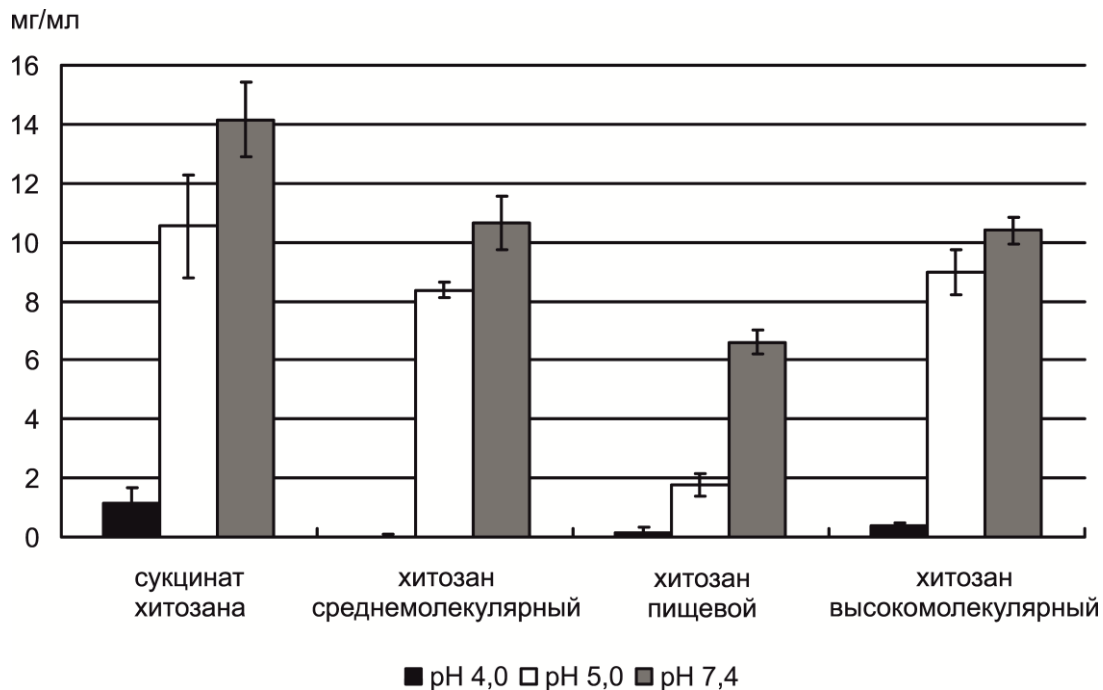


Рис. 155. Содержание белка в гетерогенных препаратах на основе инулиназы и матрицы хитозанов

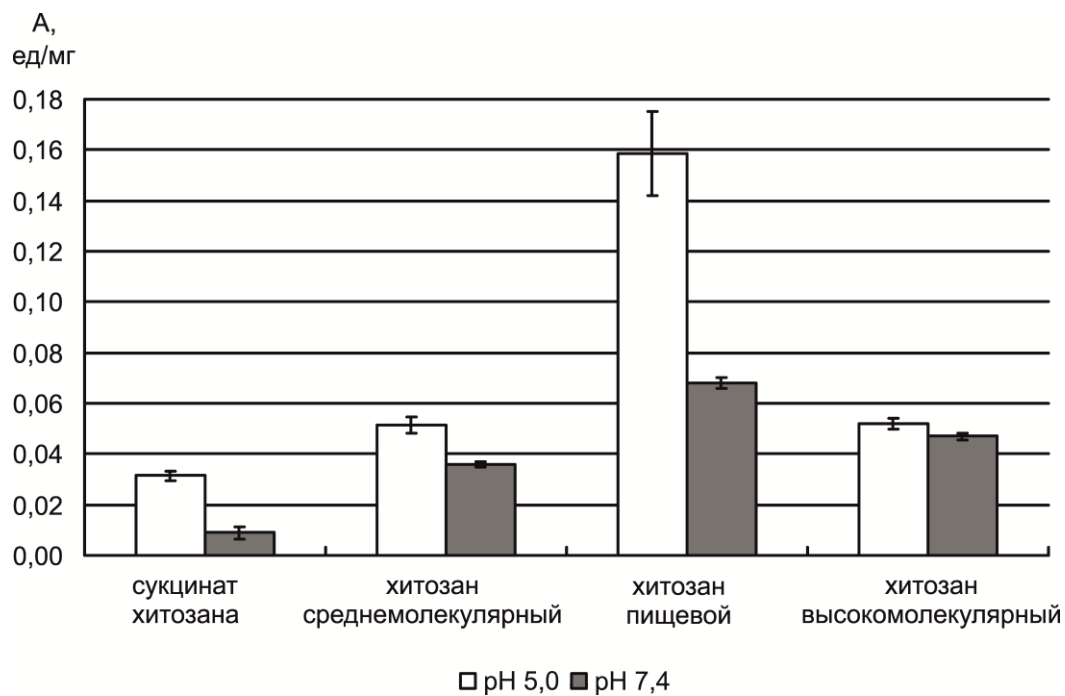


Рис. 156. Удельная каталитическая активность (А) гетерогенных препаратов на основе инулиназы и матрицы хитозанов

Для выявления механизма адсорбции фермента на матрице хитозанов мы использовали метод ИК-спектроскопии. Анализ ИК-спектров хитозанов показывает, что наиболее интенсивными являются полосы поглощения с максимумами в областях  $1000-1050\text{ см}^{-1}$  (отвечает валентным колебаниям –CN– связей в первичной аминогруппе),  $1330-1400\text{ см}^{-1}$  (обусловлена плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп),  $1500-1560\text{ см}^{-1}$ , (отвечает за деформационные колебания –N–H и –C–NH<sub>2</sub>– группировок),  $780-860\text{ см}^{-1}$  (проявляется за счет пульсационных колебаний пиранозного цикла структуры элементарного звена хитозана). Наблюдается и ряд других менее интенсивных полос поглощения:  $2200-2400\text{ см}^{-1}$  (соответствует валентным колебаниям атома углерода) и  $2800-3000\text{ см}^{-1}$  (обусловлена асимметричными и симметричными колебаниями –CH и –CH<sub>2</sub>– групп). Необходимо отметить, что, несмотря на наличие некоторых различий в интенсивности полос поглощения, их положение и форма остаются неизменными для всех выбранных нами типов хитозанов (рис. 133-136).

Об успешной иммобилизации инулиназы свидетельствует наличие следующих полос поглощения, типичных для белков: амид I ( $1630-1690\text{ см}^{-1}$ ), амид II ( $1520-1560\text{ см}^{-1}$ ), амид III ( $1200-1250\text{ см}^{-1}$ ) и амид IV ( $1050\text{ см}^{-1}$ ).

Перекрытие ряда пиков поглощения фермента и носителя значительно затрудняет анализ ИК-спектров иммобилизованных препаратов (табл. 56). В связи с этим нам пришлось ограничиться рассмотрением лишь неперекрывающихся полос поглощения для инулиназы (амид I и амид III) и матрицы хитозана.

## Основные пики поглощения инулиназы и матрицы хитозана

Матрица хитозана	Инулиназа
780-860 $\text{cm}^{-1}$	–
1000-1050 $\text{cm}^{-1}$	1050 $\text{cm}^{-1}$
–	1200-1250 $\text{cm}^{-1}$
1330-1400 $\text{cm}^{-1}$	–
1500-1560 $\text{cm}^{-1}$	1520-1560 $\text{cm}^{-1}$
–	1630-1690 $\text{cm}^{-1}$
2200-2400 $\text{cm}^{-1}$	–
2800-3000 $\text{cm}^{-1}$	–

По отношению к основным пикам поглощения матрицы хитозана полоса амид I ( $1630-1690 \text{ cm}^{-1}$ ) более выражена в препаратах инулиназы, полученных при ее иммобилизации при pH 7,4 на всех четырех типах носителя (рис. 157-160). Полоса амид III имеет сходную интенсивность у всех иммобилизованных образцов, за исключением инулиназы, сорбированной на сукцинате хитозана при pH 7,4, где пик  $1200-1250 \text{ cm}^{-1}$  выражен в наибольшей степени. Полученные данные свидетельствуют о более высокой степени сорбции инулиназы на матрице всех четырех типов хитозанов при pH 7,4. Интересно отметить, что полоса  $780-860 \text{ cm}^{-1}$ , соответствующая пульсационным колебаниям пиранозного цикла структуры элементарного звена хитозана, также в большей степени выражена у препаратов инулиназы, иммобилизованных при pH 7,4, что может косвенно указывать на формирование локальных участков с высокой концентрацией инулиназы на поверхности матрицы хитозана за счет адсорбции фермента не на матрицу носителя, а на молекулы самого белка.

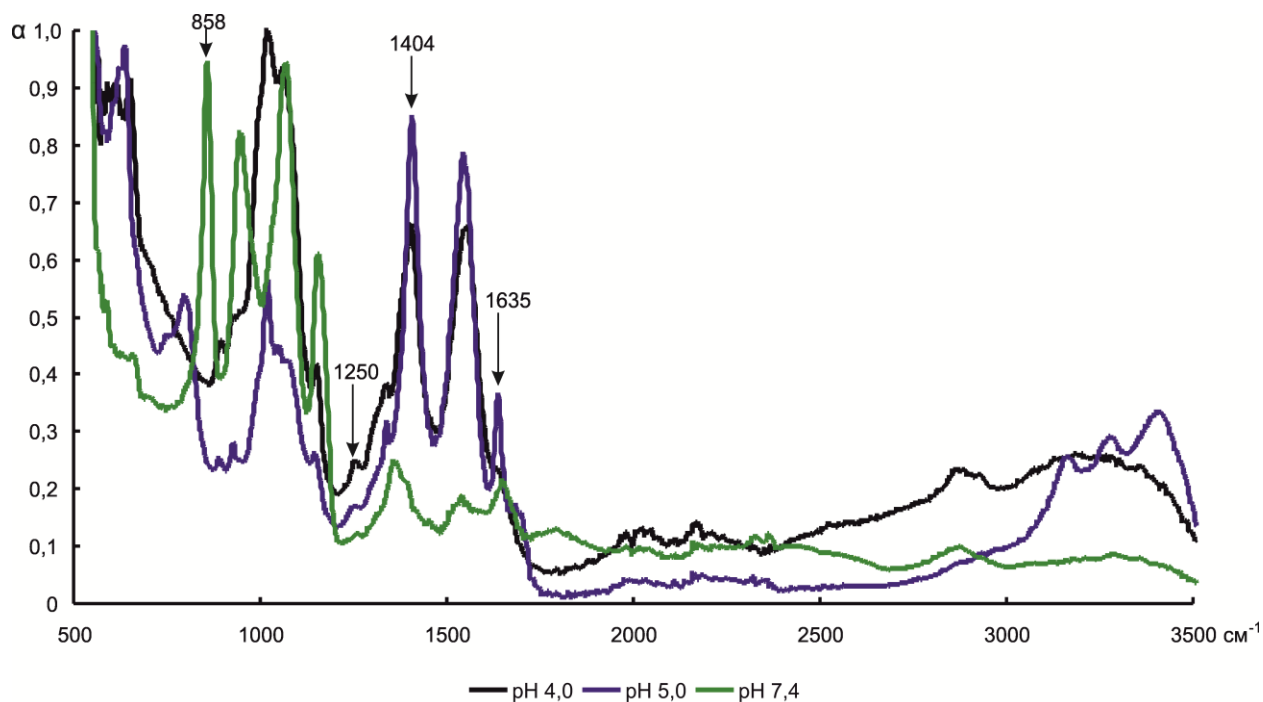


Рис. 157. ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице среднемолекулярного хитозана при различных значениях рН среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата

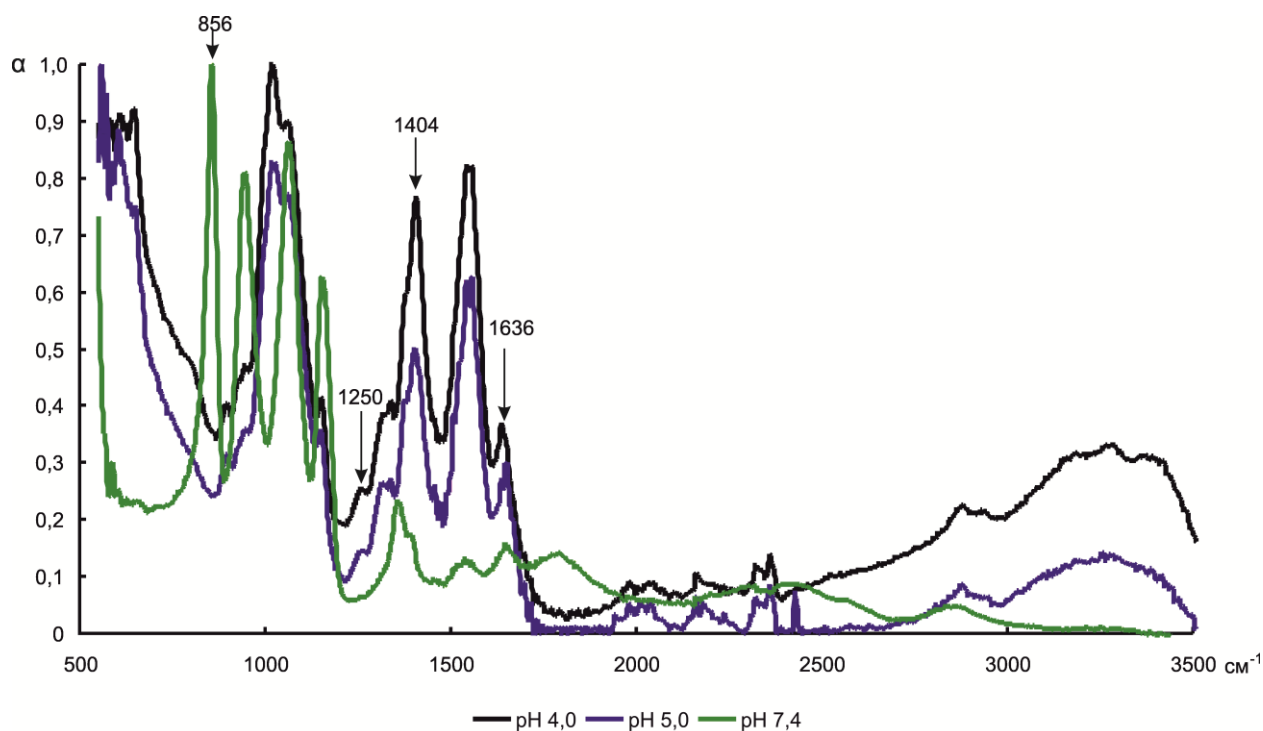


Рис. 158. ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице хитозана высокомолекулярного при различных значениях рН среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата

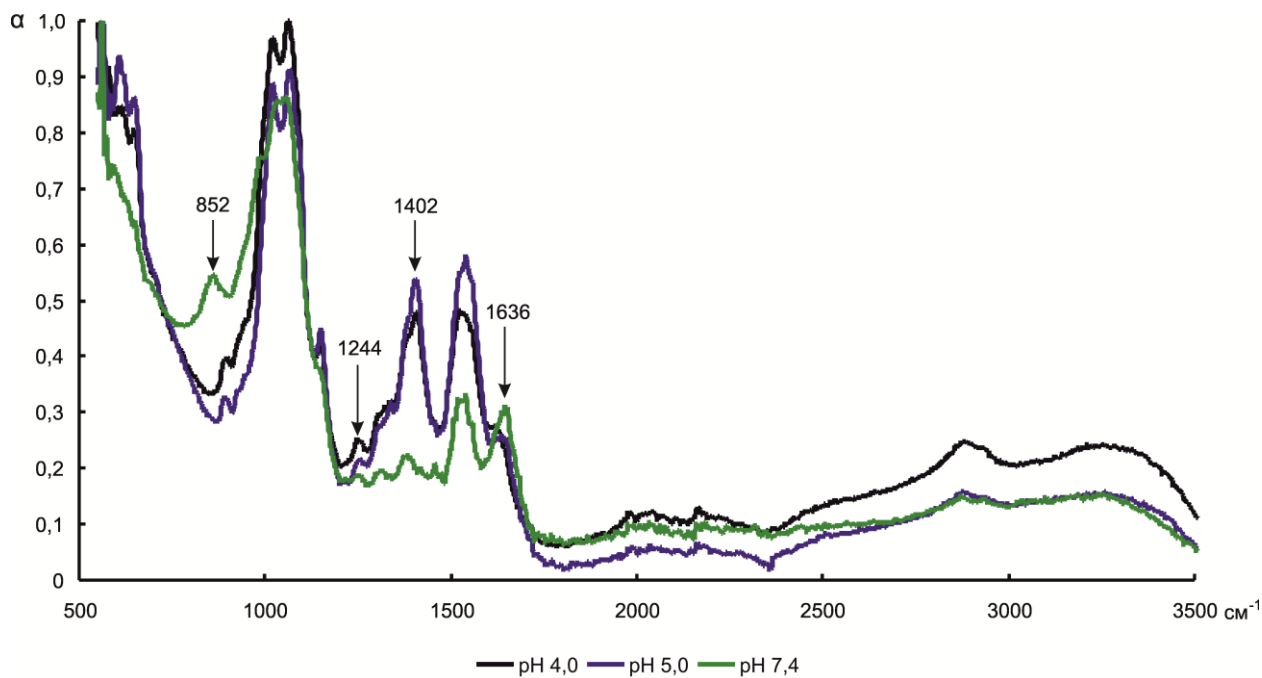


Рис. 159. ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице пищевого хитозана при различных значениях pH среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата

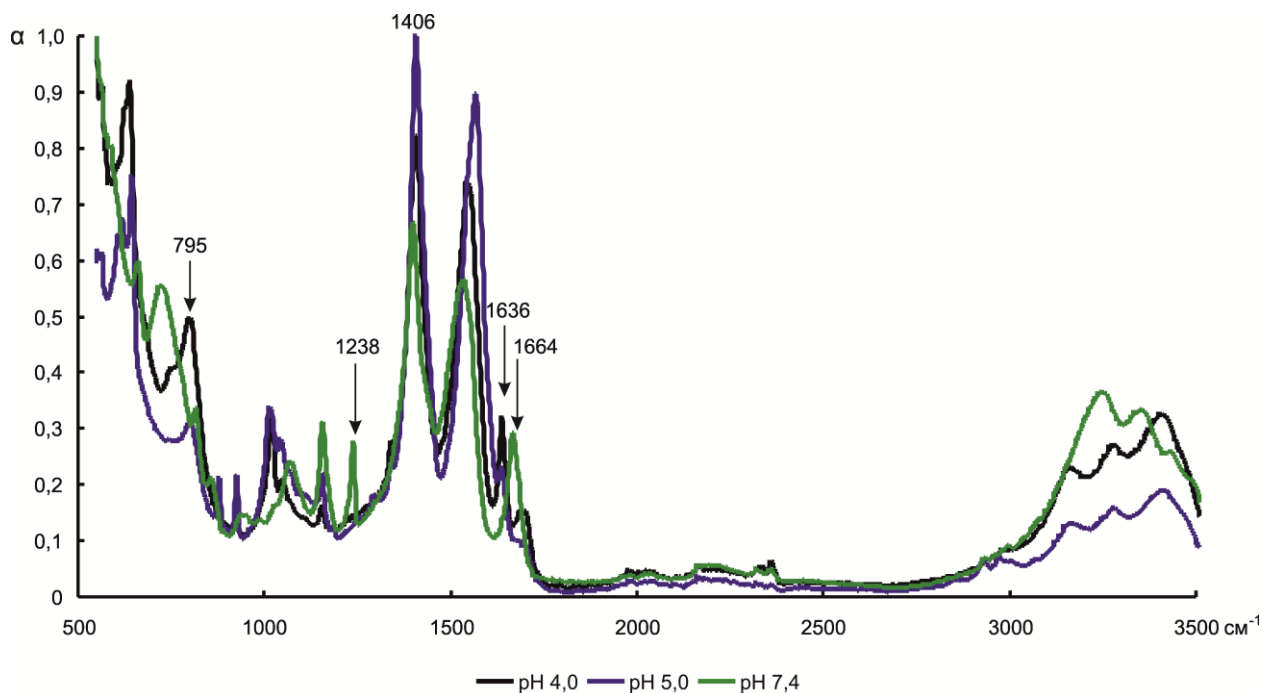


Рис. 160. ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице сукцината хитозана при различных значениях pH среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата

Полоса 1330-1410  $\text{cm}^{-1}$ , обусловленная плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп, более интенсивна у препаратов инулиназы, иммобилизованных при pH 4,0 и 5,0 на всех типах хитозанов, что свидетельствует о наличии большего количества свободных (от адсорбированного фермента) аминогрупп матрицы носителя, чем при использовании в качестве иммобилизационной среды фосфатного буфера с pH 7,4.

Таким образом, можно заключить, что наиболее перспективными для иммобилизации инулиназы среди природных полимеров являются хитозан кислоторастворимый среднемолекулярный ( $M_r = 200$  кДа, степень деацетилирования 82 %) и хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ( $M_r = 350$  кДа, СД = 94,85 %), т.к. они позволяют получить оптимальное соотношение степени сорбции и удельной каталитической активности препаратов инулиназы. При использовании в качестве носителя пищевого хитозана ( $M_r < 100$  кДа) наблюдается самая высокая удельная активность препарата, однако, при нескольких контактах с рабочим (ацетатным буфером) носитель образует локальные участки геля, что делает затруднительным многократное использование ферментного катализатора, иммобилизованного на его матрице.

Формирование комплекса инулиназа-матрица хитозана происходит в основном за счет гидрофобных взаимодействий, существенную роль играют также электростатические взаимодействия.

В табл. 57 отражены оптимальные условия функционирования гетерогенных ферментных препаратов иммобилизованной инулиназы. Сукцинат хитозана мы не использовали в дальнейших исследованиях из-за высокой потери активности фермента в ходе адсорбции на его матрице.

Оптимальные условия функционирования гетерогенных ферментных препаратов иммобилизованной инулиназы

Параметр	Свободный фермент	Фермент, иммобилизованный на		
		средне-молекулярном хитозане	высокомолекулярном хитозане	пищевом хитозане
pH	4,5-4,7	6,0-7,5	5,0-7,0	5,8-7,0
t, °C	50	50-55	50-70	70

Выявлено, что после иммобилизации инулиназы температурный оптимум ее функционирования сдвигается в сторону более высоких значений. При адсорбции на матрице пищевого хитозана он увеличивается до 70 °C, что на 20 °C выше, чем для нативного энзима. Оптимум значений pH для всех гетерогенных препаратов смещается в более щелочную сторону. При связывании белка с кислоторастворимым среднемолекулярным хитозаном pH оптимум сдвигается до 6,0-7,5.

6.4.2. УФ-индуцированные изменения функциональных свойств иммобилизованной инулиназы

Установлено, что при УФ-облучении инулиназы, иммобилизованной на матрице пищевого и кислоторастворимого высокомолекулярного хитозанов, во всем диапазоне выбранных нами доз (от 151 до 6040 Дж/м<sup>2</sup>) не происходит статистически значимых изменений активности фермента по сравнению с необлученными образцами (рис. 161). При иммобилизации энзима на кислоторастворимом среднемолекулярном хитозане варьирования значений активности препарата не происходит в интервале доз 151-3020 Дж/м<sup>2</sup>, при дозах 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> каталитическая способность иммобилизованной инулиназы увеличивается, вероятно, за счет десорбции фермента в раствор с матрицы носителя.

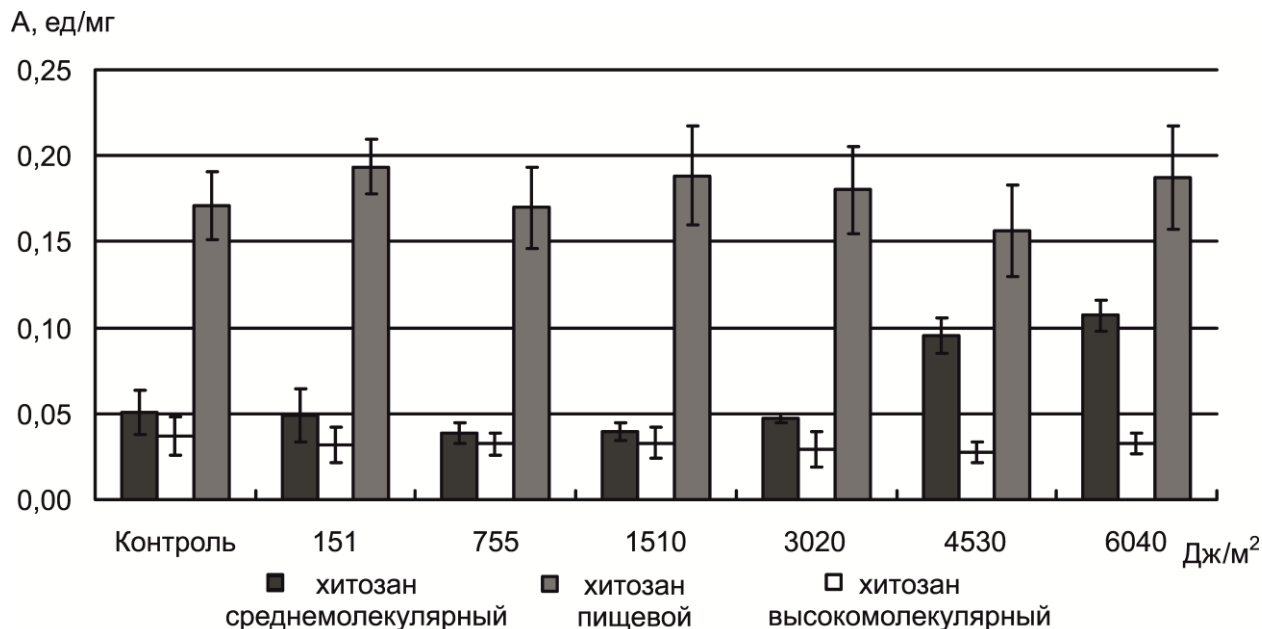


Рис. 161. УФ-индуцированные изменения удельной каталитической активности (А) инулиназы, иммобилизованной на матрице хитозанов

В пользу этой гипотезы свидетельствуют результаты ИК-спектроскопии (рис. 162). После УФ-облучения в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup> в ИК-спектре инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого среднемoleкулярного хитозана, происходят следующие изменения: пики 1035 и 1085 см<sup>-1</sup> формируют единый максимум – 1050 см<sup>-1</sup>, соответствующий валентным колебаниям –СN– связей в первичной аминогруппе, появляются новые пики – 2818, 2875 и 2976 см<sup>-1</sup>, обусловленные асимметричными и симметричными колебаниями –СН и –СН<sub>2</sub>–групп, что может свидетельствовать об уменьшении доли белка в составе иммобилизованного препарата инулиназы.

Интересно отметить, что в ИК-спектре инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана, после УФ-облучения в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup> усиливается интенсивность полос в области 1200-1240 см<sup>-1</sup>, которая соответствует области амид III (рис. 163).



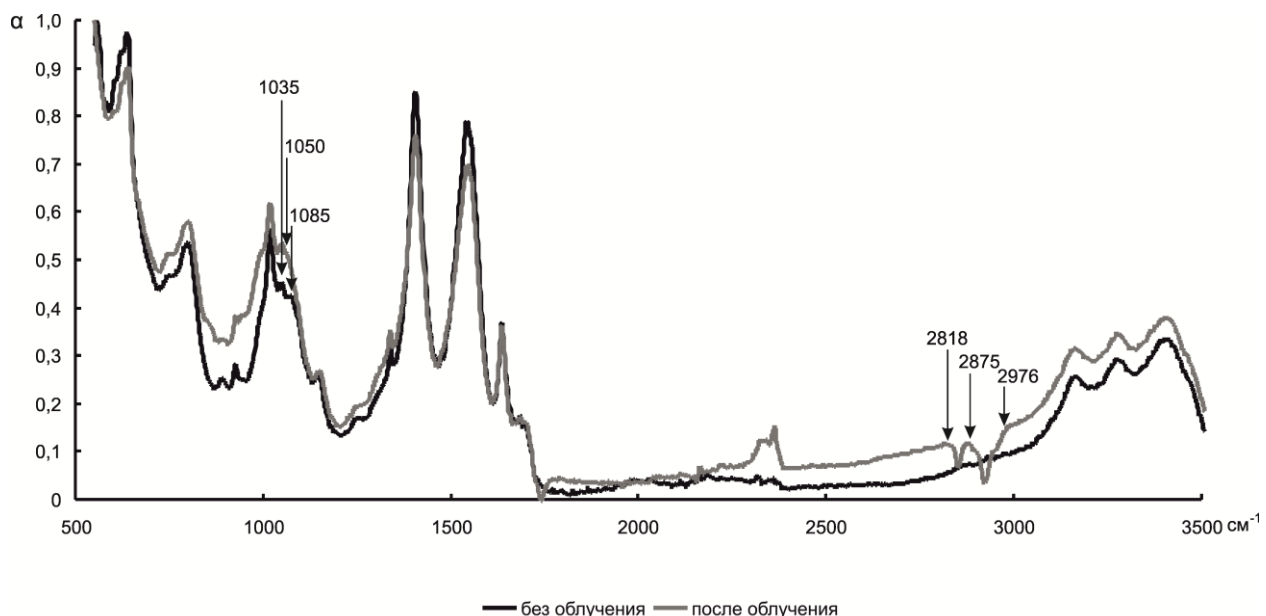


Рис. 162. ИК-спектры поглощения инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана, до и после УФ-облучения препарата в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup>

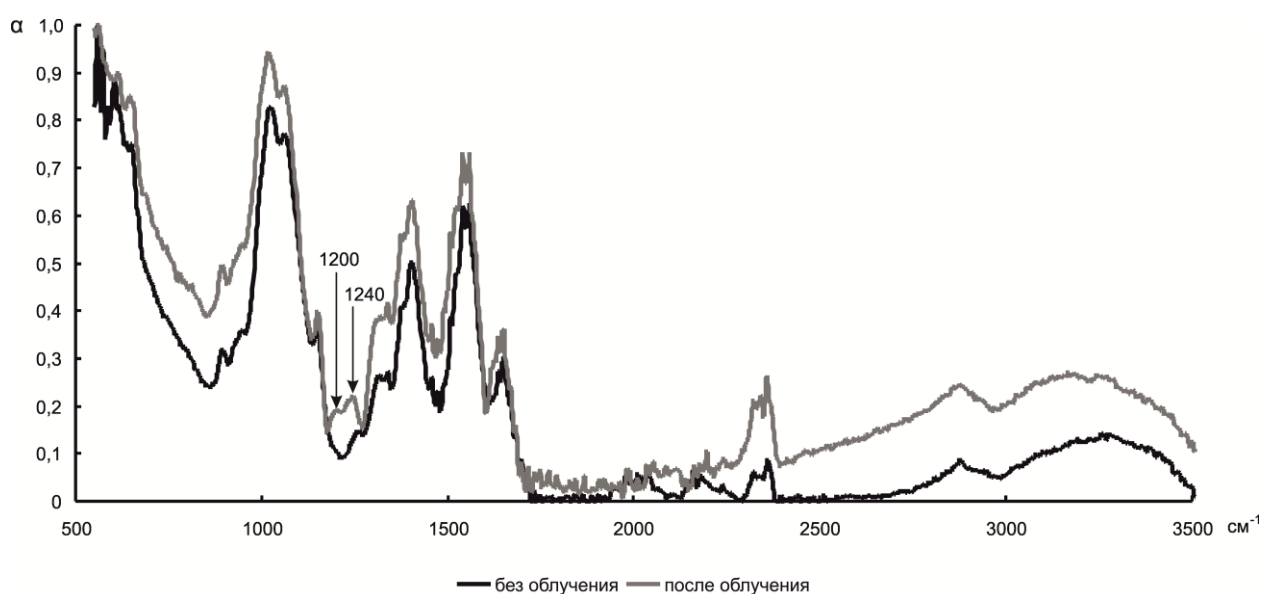


Рис. 163. ИК-спектры поглощения инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана, до и после УФ-облучения препаратов в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup>

В спектре инулиназы, иммобилизованной на матрице пищевого хитозана, после облучения в дозе  $6040 \text{ Дж/м}^2$  происходит смещение обусловленного пульсационными колебаниями пиранозного цикла хитозана пика с  $850 \text{ см}^{-1}$  к  $890 \text{ см}^{-1}$ ; также наблюдается сдвиг пика полосы амид I с  $1637 \text{ см}^{-1}$  к  $1610 \text{ см}^{-1}$  (рис. 164). Кроме того, более выраженными становятся следующие максимумы:  $1016$  и  $1058 \text{ см}^{-1}$  (отвечающие валентным колебаниям  $-\text{CN}-$  связей в первичной аминогруппе),  $1232 \text{ см}^{-1}$  (соответствующий полосе амид III),  $1371$  и  $1398$  (обусловленные плоскими и неплоскими деформационными колебаниями  $\text{NH}$ -групп),  $1506$  (отвечающий за деформационные колебания  $-\text{N}-\text{H}$  и  $-\text{C}-\text{NH}_2-$  группировок), что указывает на структурные перестройки как в матрице хитозана, так и в молекуле иммобилизованного на нем фермента под действием УФ-облучения.

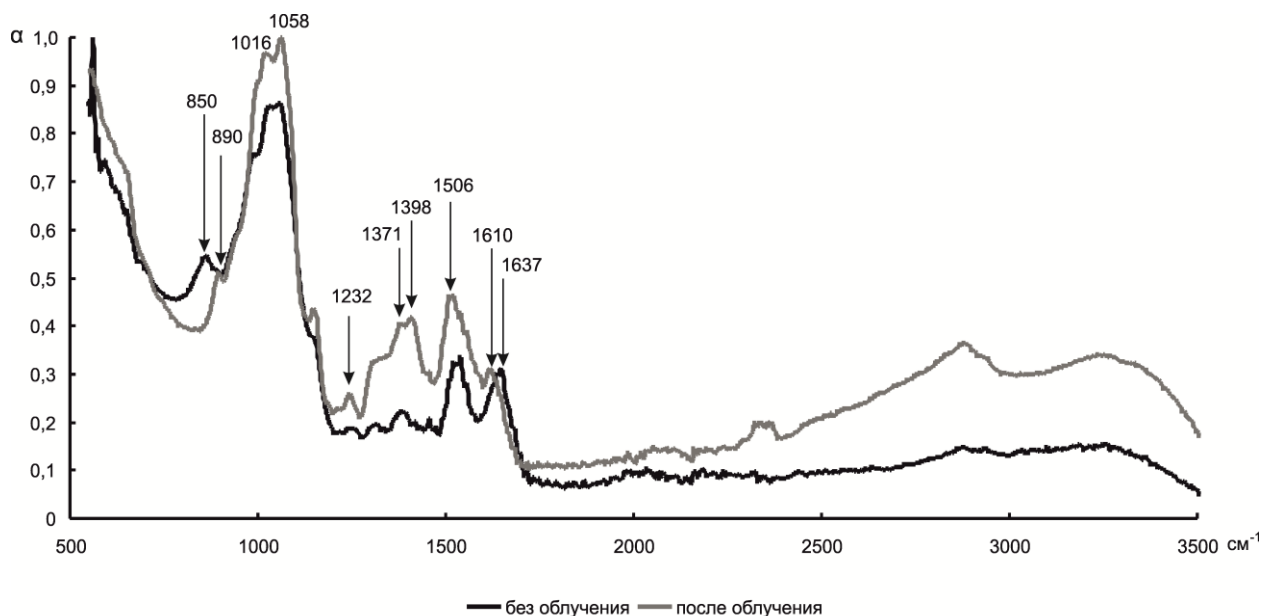


Рис. 164. ИК-спектры поглощения инулиназы, иммобилизованной на матрице пищевого хитозана, до и после УФ-облучения препарата в дозе  $6040 \text{ Дж/м}^2$

Приведенные выше данные свидетельствуют о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующим: хитозан вступает во взаимодействие с молекулой инулиназы, образуя комплекс, более фоторезистентный, чем нативные молекулы белка.

### 6.5. Исследование каталитических характеристик гетерогенного биокатализатора на основе иммобилизованной инулиназы в реакторах периодического и непрерывного действия

Мы проводили изучение влияния условий хранения и работы на активность иммобилизованной инулиназы. Установлено, что инулиназа из *Kluyveromyces marxianus*, адсорбированная на ионообменных материалах – волокне ВИОН КН-1 и смолах АВ-16-ГС, АМ 21А, а также инулиназа из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованная на матрицах катионообменных смол КУ-2, КУ-2-8чС и анионита АВ-17-2П, не снижают своей каталитической активности при 10-кратном использовании препарата в реакторе периодического действия. По критерию стабильности полученные нами гетерогенные биокатализаторы оказались перспективными для промышленного применения, так как, например, по данным Е.А. Ghada et al. (2017), даже при ковалентной иммобилизации инулиназы из *Aspergillus terreus* в альгинатный гель с добавлением карбоксиметилцеллюлозы после 10 циклов гидролиза субстрата сохраняется лишь 60 % первоначальной активности энзима, 100 % сохранение каталитической способности образцов авторы наблюдали лишь при 5-кратном их использовании.

Устойчивость гетерогенных ферментных препаратов в процессе хранения также является важнейшей технологической характеристикой для биокатализаторов промышленного назначения, поэтому целью следующего этапа работы был анализ каталитических характеристик иммобилизованных инулиназ дрожжевого и растительного происхождения. Удельная каталитическая активность указанных выше гетерогенных биокатализаторов не претерпевала статистически значимых изменений в течение года хранения.

Научные технологии, которые предполагается использовать в комплексной переработке клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*), могут дать новый мощный импульс развитию различных областей биотехнологии, поэтому мы проанализировали различные методики экстракции инулина из

клубней топинамбура (Абелян В.А., 1998, Hu N., 2012, Kim S., 2013, Jiang L., 2017).

Экстракцию инулина мы проводили в периодическом и непрерывном режиме модельного технологического процесса в интервале температур от 50 до 100 °С. При температуре 90 °С и выше, вероятно, происходил температурный гидролиз инулина, что в наших исследованиях было нежелательно. Использование противоточного метода оказалось слишком трудоемким и поэтому нецелесообразным, так как к заметному повышению активности иммобилизованной инулиназы этот подход не приводил. Рассмотрев работы других авторов и учитывая результаты, полученные в нашей лаборатории, мы выбрали следующую методику.

Предварительно высушенный растительный материал тщательно промывали и измельчали, затем добавляли дистиллированную воду в соотношении 1 часть растительной биомассы и 9 частей воды. Подобное соотношение растительного материала и воды в пробах было выбрано для получения сопоставимой концентрации инулина в контрольных (коммерческий препарат инулина) и опытных (растительных) образцах, исходя из того факта, что в клубнях топинамбура содержание инулина колеблется в пределах 16 % (Чепурной И.П., 2001). Далее препарат инкубировали при 70 °С в течение 45 мин, затем его фильтровали для удаления балластных веществ.

В настоящее время существует ряд работ, посвященных оптимизации конфигурации биореакторов для производства инулиназы (Mazutti M.A., 2010), хотя имеющиеся данные об иммобилизованных инулиназах в реакторных системах проточного типа очень ограничены. Возрастает интерес к поиску наилучших условий для производства фруктозы путем энзиматического гидролиза инулина (Ricca E., 2007) с использованием методов иммобилизации (Nakamura T., 1995, Wei W., 1999) и оптимизации типа реактора (Diaz E.G., 2006, Gill P.K., 2006). На сегодняшний день широкий спектр практических аспектов, связанных с использованием иммобилизованного фермента в непрерывных реакторах, нуждается в

дальнейшей разработке. Только несколько работ было опубликовано о непрерывных процессах с иммобилизованной инулиназой. В большинстве из них использовались реакторы колоночного типа, за исключением статьи E.G. Diaz et al. (2006), которые применили мембранный реактор. Интересные результаты были получены A.K. Gupta et al. (1992), которые использовали инулиназу, иммобилизованную на DEAE-целлюлозе, T. Nakamura et al. (1995), которые использовали Amino-cellulofine в качестве носителя, W. Wei et al. (1999), которые использовали макропористые ионные полистирольные гранулы, P.K. Gill et al. (2006), которые тестировали различные носители: хитин, QAE-Sephadex и ConA-связанную аминоктивированную двуокись кремния.

Гранулы альгината-хитозана (Missau J., 2014), микрочастицы  $\text{CaCO}_3$  с покрытием из поли-D-лизина (Karimi M., 2014), различные композиционные мембраны, состоящие из хитозановых нетканых материалов (Mohamed T.M., 2014), макропористый криогель с конканавалином A (Altunbas C., 2013), монтмориллонит (de Oliveira G.K., 2013) также были использованы в качестве носителей для иммобилизации инулиназы.

Большинство работ, упомянутых выше, посвящены описанию экспериментальных результатов, подтверждающих хорошую воспроизводимость и универсальность рассматриваемого процесса. Однако стабильность и производительность в широких диапазонах промышленных условий не были тщательно исследованы. Знания в области кинетики реакции, скорости дезактивации и их общего влияния на ход реакции могут быть очень полезными инструментами для дальнейшего улучшения процесса получения фруктозы путем ферментативного гидролиза инулина и обеспечения правильной оптимизации рабочих условий.

Нами была предложена модель учета кинетики реакции для иммобилизованной инулиназы и дезактивации фермента как инструмент для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде в системах реакторов колоночного типа.

Реакторы непрерывного действия, позволяющие автоматизировать технологический процесс, являются более предпочтительными в промышленных условиях. Поэтому мы изучили особенности реакции гидролиза инулина иммобилизованными дрожжевой и растительной инулиназой в реакторе колоночного типа (табл. 58, 59). За 100 % принималось максимальное значение каталитической активности при использовании гетерогенного ферментного препарата в реакторе периодического действия (ферментере) при оптимальных условиях гидролиза (70 °С, рН 4,5).

Было показано, что при миграции раствора инулина сверху вниз (нисходящий ток) через колонку, заполненную иммобилизованными препаратами инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*, со скоростью 3 мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза. Активность препарата в реакторе колоночного типа для растительного фермента в этом случае на 20 %, а для дрожжевого – на 69 % превысила его активность в ферментере при периодическом способе гидролиза субстрата. При увеличении скорости протока субстрата каталитическая активность иммобилизованной инулиназы снижалась в обоих случаях.

Далее была изучена активность иммобилизованной инулиназы при перемещении раствора инулина через реактор колоночного типа по восходящему току. Показано, что при миграции раствора инулина снизу вверх (восходящий ток) через колонку со скоростью 5 мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза. Каталитическая активность растительного препарата в реакторе колоночного типа в этом случае на 10 % превысила его активность в ферментере, для дрожжевого фермента увеличение активности составило 97 %.

Каталитическая активность (%) иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* при использовании гетерогенного биокатализатора в модельном реакторе непрерывного действия

Скорость тока субстрата, мл/мин	При использовании в качестве субстрата инулина		При использовании в качестве субстрата экстракта топинамбура	
	Нисходящий ток	Восходящий ток	Нисходящий ток	Восходящий ток
2	130	111	155	109
3	169	130	182	120
4	76	173	84	173
5	48	197	39	218
7	-	64	-	62
15	-	32	-	50

Таблица 59

Каталитическая активность (%) иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus* при использовании гетерогенного биокатализатора в модельном реакторе непрерывного действия

Скорость тока субстрата, мл/мин	При использовании в качестве субстрата инулина		При использовании в качестве субстрата экстракта топинамбура	
	Нисходящий ток	Восходящий ток	Нисходящий ток	Восходящий ток
1	103	96	129	122
2	104	102	132	125
3	120	102	134	132
4	115	105	136	134
5	90	110	146	134
7	81	105	148	126
10	72	89	145	108

В следующей серии экспериментов в реакторах колоночного типа мы использовали экстракт топинамбура. Было показано, что при перемещении раствора сверху вниз через колонку, заполненную иммобилизованным препаратом инулиназы из *Helianthus tuberosus*, со скоростью 5-10 мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза. Активность препарата в реакторе колоночного типа до 48 % превышала его активность при периодическом способе гидролиза экстракта топинамбура. При перемещении экстракта топинамбура снизу вверх через колонку со скоростью 3-5 мл/мин также создаются благоприятные условия гидролиза. Активность препарата в реакторе колоночного типа в этом случае до 34 % превышала его активность в ферментере периодического действия.

Для иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* оптимальные скорости протока экстракта топинамбура через реактор совпали с оптимальными скоростями протока инулина: 3 мл/мин для нисходящего тока и 5 мл/мин для восходящего тока.

Исследования показали, что с увеличением скорости протока субстрата (химически чистого инулина и экстракта топинамбура) увеличивается ферментативная активность иммобилизованной инулиназы. Усиление массопереноса приводит к ослаблению диффузионных ограничений доступа гидролизующих молекул к активному центру энзима, что сопровождается повышением каталитической способности гетерогенного биокатализатора.

Различные авторы уже пытались разработать гетерогенный катализатор для получения фруктозы из растительных экстрактов. Например, Singh R.S. et al. (2007) иммобилизовали инулиназу из *Kluyveromyces marxianus* YS-1 на Duolite A568, что привело к образованию основания Шиффа между карбонильными группами активированного носителя и свободными белковыми аминокетильными группами. Активацию носителя осуществляли глутаровым альдегидом. Гидролиз чистого инулина и инулина из *Asparagus racemosus* проводили при перемешивании (125 об/мин) при 55 °С, что привело к выходу фруктозы 39,2 г/л через 4 часа, что составляет 85,5 % от общего количества редуцирующих сахаров. Чистый инулин был гидролизован на 78,3 % в



течение 4 ч и на 83,3 % в течение 6 ч, выход фруктозы составлял 40,25 г/л через 4 часа, а именно 92,6 % от общего содержания редуцирующих сахаров. Имобилизованный препарат снижал каталитическую активность на 10 % при использовании в течение 4 циклов, на 20 % и 50 % – в течение 7 циклов и 55 циклов соответственно.

Частично очищенная внутриклеточная инулиназа из *Kluyveromyces* sp.У-85 была иммобилизована ковалентно путем сшивания с макропористыми гранулами полистирола. Используя 4,5 % раствор фруктана из топинамбура в качестве субстрата в реакторе колоночного типа и непрерывного действия, заполненном 70 мл гранул иммобилизованной инулиназы, W. Wei et al. (1999) получили следующий продукт – смесь 85 % D-фруктозы и 15 % D-глюкозы. Период полужизни биореактора составил 32 дня.

Был предложен новый высокостабильный носитель для иммобилизации инулиназы – сополимер глицидилметакрилата, содержащий большое количество эпоксильных групп и обладающий множеством поперечных сшивок. Основные параметры гидролиза инулина гетерогенным биокатализатором были исследованы, протестированы режимы применения полученного препарата в непрерывных условиях. Инулин в концентрации 0,5 % практически полностью гидролизировался до фруктозы (с выходом 98 %) при низкой скорости тока 0,1 мл/мин. Увеличение скорости тока приводило к появлению в растворе до 41 % сахаров со степенью полимеризации 2-6. Фермент показал хорошую эксплуатационную стабильность в колонке в течение 28 дней. Выход иммобилизации инулиназы на исследуемом типе микросфер был выше, чем у коммерческого носителя Eupergit C (Trytek M., 2015).

Приведенные выше результаты, хотя и являются достаточно весомыми с точки зрения технологии гидролиза, тем не менее они несут мало информации о выборе и сравнении условий для гидролиза химически чистого инулина и инулина из растительных экстрактов в реакторных системах колоночного типа, чему и были посвящены наши эксперименты.

С целью описания кинетики гидролиза инулина в присутствии инулиназы в рамках кинетических уравнений, используемых в энзимологии, мы воспользовались следующей моделью.

Пусть в системе присутствуют: инулин в концентрации  $[L_N]$  и степень полимеризации  $N \gg 1$  и инулиназа в концентрации  $[I_0]$ , катализирующая гидролиз инулина по схеме реакции Михаэлиса-Ментен с помоллекулярным отщеплением фруктозы от инулина. Пусть константа Михаэлиса для гидролиза инулина инулиназой с отщеплением одной молекулы фруктозы равна  $K_{mLI}$ , константа скорости распада комплекса инулин-инулиназа –  $k_{LI}$  (т.е. молекулярная активность фермента  $k_{LI} = V_{maxLI}/[I_0]$ , где  $V_{maxLI}$  – максимальная скорость реакции). Будем считать, что гидролиз сахарозы, как завершающей стадии гидролиза инулина, также протекает с параметрами  $K_{mLI}$  и  $k_{LI}$  (ошибка этого допущения при вышеобозначенном условии  $N \gg 1$  является незначительной).

Для введенных обозначений и допущений зависимость концентрации фруктозы  $[\Phi p]$  от времени задается уравнением

$$[\Phi p] = \frac{k_{LI} [L_N] [I_0]}{K_{mLI} + [L_N]} t_N \quad (43)$$

Условием полного гидролиза инулина является ситуация, когда концентрация фруктозы равняется исходной концентрации инулина, помноженной на степень полимеризации

$$[\Phi p] = N [L_N] \quad (44)$$

Приравнивая правые части уравнений (43) и (44), получаем оценку времени полного гидролиза

$$t_N = N \frac{K_{mLI} + [L_N]}{k_{LI} [I_0]} \quad (45)$$

Параметр  $t_N$  может быть измерен экспериментально.

В табл. 60 приведены результаты сравнения теоретического расчета по формуле (45) с экспериментом. Расхождение расчетных и экспериментальных данных для свободных инулиназ составляет в среднем 18 %, для иммобилизованных – 20 %.

Таким образом, нами были изучены режимы работы гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованной инулиназы дрожжевого и растительного происхождения в реакторе непрерывного действия, предложена и экспериментально протестирована модель процесса ферментативного гидролиза инулина, которая позволяет с вероятностью порядка 80 % предсказать время его полного расщепления.

Выявлены оптимальные условия для гидролиза как химически чистого инулина, так и содержащегося в экстрактах клубней топинамбура, для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (иммобилизованной на ионообменном волокне ВИОН КН-1) и инулиназы из *Helianthus tuberosus* (адсорбированной на ионообменной смоле КУ-2). В этих условиях мы наблюдали увеличение эффективности процесса гидролиза примерно в 2 раза для дрожжевой инулиназы и в 1,5 раза для растительной инулиназы. Результаты могут быть использованы при проектировании работы проточных реакторов непрерывного действия.

Расчетные и экспериментальные значения времени полного гидролиза  
инулина свободными и иммобилизованными инулиназами из *Kluyveromyces  
marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Концентрация инулина в системе	Время гидролиза, мин		Время гидролиза, ч	
	расчет	эксперимент	расчет	эксперимент
<b>Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i></b>				
	свободная		иммобилизованная на ВИОН КН-1	
1 %	6	7	0,29	0,33
2 %	11	13	0,54	0,67
5 %	26	30	1,3	1,5
10 %	52	60	2,5	3,0
20 %	103	120	5,0	6,5
<b>Инулиназа из <i>Helianthus tuberosus</i></b>				
	свободная		иммобилизованная на КУ-2	
1 %	11	13	2,0	2,3
2 %	17	20	2,5	3,0
5 %	34	40	3,7	4,5
10 %	63	80	5,9	7,0
20 %	120	140	10,2	12,0

\*Концентрация свободной инулиназы (как дрожжевой, так и растительной) в системе 100 мг/л, концентрация иммобилизованного на ВИОН КН-1 препарата – 20 г/л (содержание в нем фермента 5 мг/г носителя), концентрация иммобилизованного на КУ-2 препарата – 50 г/л (содержание в нем фермента 2 мг/г носителя).

Для системы инулин – инулиназа свободная из *Kluyveromyces marxianus* действуют параметры:  $N=27$ ,  $K_{mLI}=0,22 \cdot 10^{-3}$  М и  $V_{maxLI}=102 \cdot 10^{-6}$  моль/(мг×мин).

Для системы инулин – инулиназа из *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованная на ВИОН КН-1, действуют параметры:  $N=27$ ,  $K_{mLI}=0,33 \cdot 10^{-3}$  М и  $V_{maxLI}=35 \cdot 10^{-6}$  моль/(мг×мин).

Для системы инулин – инулиназа свободная из *Helianthus tuberosus* действуют параметры:  $N=27$ ,  $K_{mLI}=1,89 \cdot 10^{-3}$  М и  $V_{maxLI}=91 \cdot 10^{-6}$  моль/(мг×мин).

Для системы инулин – инулиназа из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованная на КУ-2, действуют параметры:  $N=27$ ,  $K_{mLI}=7,3 \cdot 10^{-3}$  М и  $V_{maxLI}=20 \cdot 10^{-6}$  моль/(мг×мин).

## 6.6. Использование растительных экстрактов в качестве субстратов для гетерогенного биокатализатора на основе иммобилизованной инулиназы

Описанную выше для топинамбура схему эксперимента мы применяли для получения экстрактов из цикория (*Cichorium intybus*), девясила (*Inula helenium*), георгина (*Dahlia variabilis*), лопуха (*Arctium lappa*), одуванчика (*Taraxacum officinale*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), лука (*Allium cepa*), чеснока (*Allium sativum*). Общеизвестно, что эти растения характеризуются высоким содержанием инулина, локализованного в нижней части стебля, корнях, клубнях или луковичах (Galindo Leva L.A., 2016, Chi Z.M., 2011, Muthuselvi S., 2012, Kango N., 2011, He M., 2014, Pontes A.G.O., 2016, Hughes S.R., 2017, Ujor V., 2015).

Полученные нами результаты (рис. 165, 166) показывают, что иммобилизованные препараты дрожжевой и растительной инулиназы проявляют максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, луковиц георгина, которые по этой причине, на наш взгляд, являются перспективными для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем.

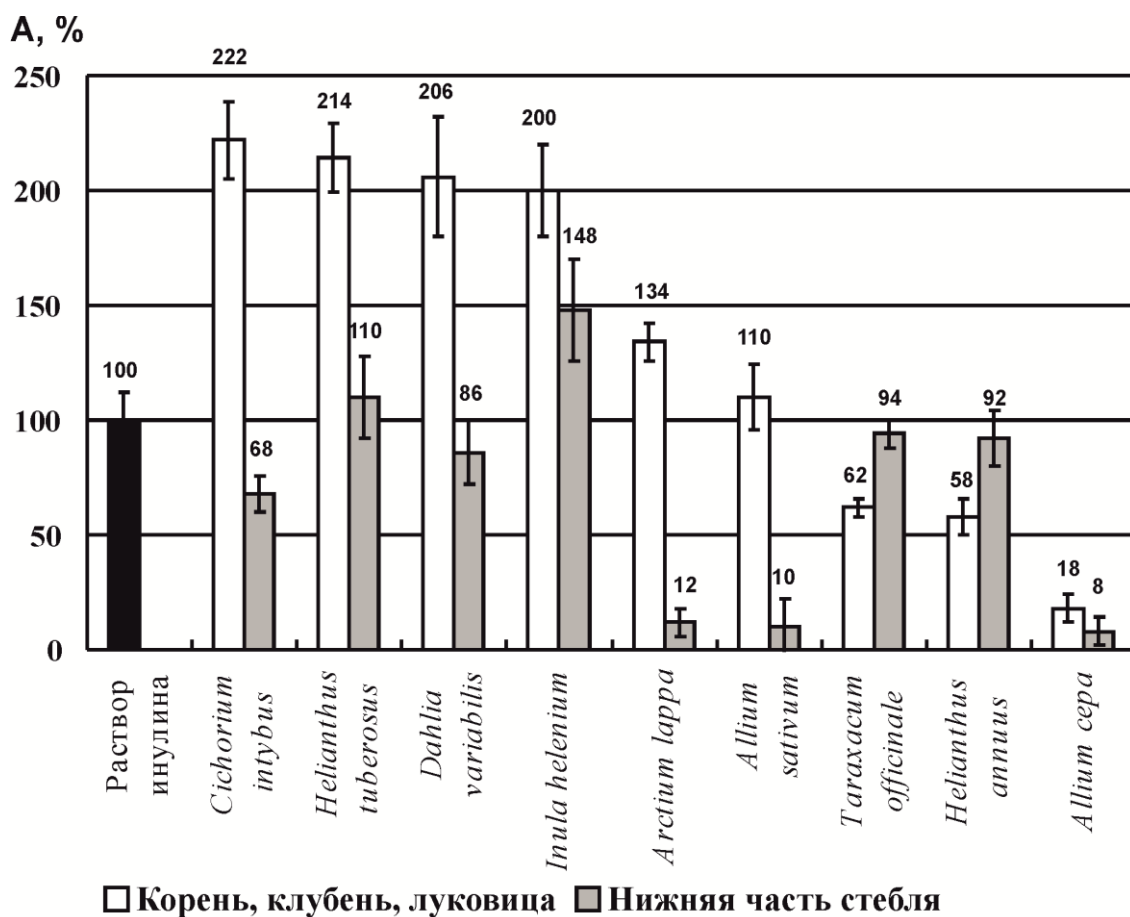


Рис. 165. Каталитическая активность (А) препарата инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованного на ионообменной смоле АВ-17-2П, при гидролизе инулина из различных растительных экстрактов (за контроль принималось значение активности гетерогенного препарата по отношению к чистому инулину)

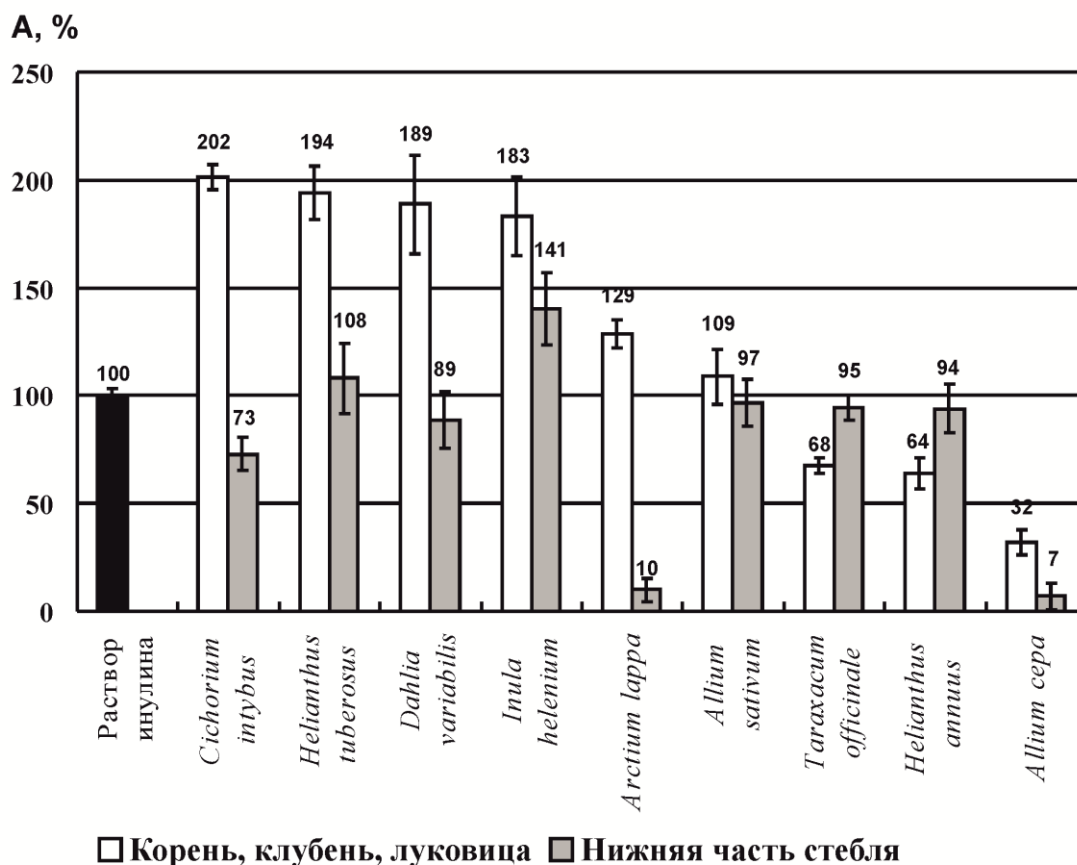


Рис. 166. Каталитическая активность (А) препарата инулиназы из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованного на ионообменной смоле КУ-2, при гидролизе инулина из различных растительных экстрактов (за контроль принималось значение активности гетерогенного препарата по отношению к чистому инулину)

Каталитическая активность иммобилизованной инулиназы по отношению к экстрактам из клубней топинамбура, луковиц георгина, корней девясила и цикория была примерно в 2 раза выше, чем в реакции с чистым инулином. Растительные материалы, такие как топинамбур, георгин, цикорий, сауссурия и спаржа уже описывались в литературе как перспективное сырье для производства сиропа с высоким содержанием фруктозы. В ряде работ показано, что накопление редуцирующих сахаров идет интенсивнее при ферментативном гидролизе экстрактов топинамбура и спаржи, чем при расщеплении чистого инулина. Это явление связано с тем

фактом, что в растениях вместе с инулином всегда встречаются родственные углеводы: псевдоинулин, инуленин, левулин, гелиантенин, синистрин, иризин (Шкутина И.В., 2012), которые, очевидно, гидролизуются инулиназой с большей скоростью.

#### 6.7. Характеристика гено- и цитотоксичности иммобилизованных на полимерных матрицах препаратов инулиназ

Обязательным этапом при создании катализаторов для пищевой промышленности является проверка их токсичности и мутагенности. В работе для оценки мутагенности (генотоксичности) был использован тест Эймса (Ames B.N., 1976). Метод основан на регистрации частоты мутаций, приводящих к реверсии ауксотрофного по гистидину штамма *Salmonella typhimurium* к прототрофности (Nylund L., 1993). Положительным контролем служил известный мутаген: азид натрия в концентрациях 3, 15, 75 мкг/чашку (Oda Y., 1985).

Цитотоксичность соединений исследовали на линии MCF7 клеток рака молочной железы человека. Клетки инкубировали в 96-луночных планшетах на среде DMEM, дополненной глутамином, FBS и пенициллином и стрептомицином, в присутствии инулиназы в концентрациях 40, 200 и 1000 мкг/мл, и носителей в концентрациях 0,2, 1 и 5 мг/мл. Цитотоксичность определяли с помощью метаболического MTS-теста.

Результаты тестирования мутагенной активности сорбентов для иммобилизации инулиназ на штамме *Salmonella typhimurium* TA100 представлены в табл. 61.



Оценка мутагенности и ДНК-повреждающей активности сорбентов для  
иммобилизации инулиназ

Соединение	Тест Эймса	SOS-хромотест
	Превышение над контролем, раз (кол-во клеток)	Превышение активности над контролем, раз
КУ 2	0,7(28±3,5)	1,8±0,8
АН-12П	1,2(79±9,0)	0,1±0,1
ЭДЭ-10	0,8(8±8,7)	1,1±0,2
КУ-2-8чС	0,8(31±9,1)	1,2±0,2
PUROLITE	2,0(58±15,4)	1,2±0,3
ИМАС-НР	1,3(85±9,5)	1,2±0,3
АМ 21А	0,2(44±10,6)	1,2±0,2
АВ-16-ГС	0,8(7±7,6)	1,2±0,4
АВ-17-2П	0,4(34±3,8)	1,0±0,3
Положительный контроль (Азид натрия/митомин С)	9,5 (181±13,1)	13,5
Отрицательный контроль	1,0 (19±2,1)	1,0

Была оценена генотоксичность инулиназ, нативных и иммобилизованных на синтетических носителях. Концентрация чистых ферментов и иммобилизованных инулиназ в пересчете на количество фермента составила 10 мкг/мл, что соответствует превышению планируемой концентрации в промышленном ферментере в 10 раз. Установлено, что сама инулиназа и все варианты носителей не продемонстрировали мутагенного действия в тесте Эймса и ДНК-повреждающей активности в SOS-хромотесте (табл. 62).

Оценка мутагенности и ДНК-повреждающей активности нативных и иммобилизованных инулиназ

Инулиназа/сорбент	Тест Эймса	SOS-хромотест
	Превышение над контролем, раз (кол-во клеток)	Превышение активности над контролем, раз
Растительная инулиназа	0,1(7±5,2)	0,2±0,2
Растительная инулиназа/КУ-2	1,4(91±7,5)	0,2±0,2
Растительная инулиназа/КУ-2-8чС	1,4(32±16,1)	1,0±0,1
Растительная инулиназа/АВ-17-2П	0,3(16±14,8)	1,1±0,4
Дрожжевая инулиназа	1,3(85±19,5)	1,8±0,1
Дрожжевая инулиназа/КУ-2	1,0(69±15,8)	1,1±0,2
Дрожжевая инулиназа/АВ-17-2П	1,7(55±38,8)	1,1±0,2
Дрожжевая инулиназа/ВИОН КН-1	1,7(55±38,8)	1,1±0,2

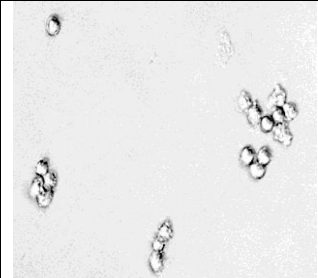
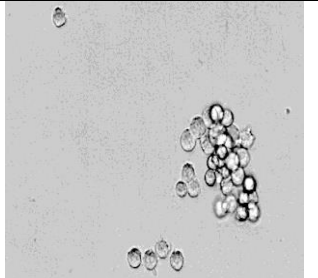
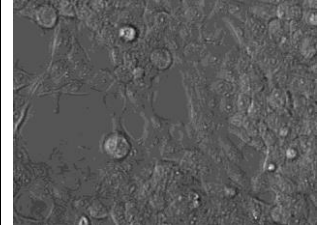
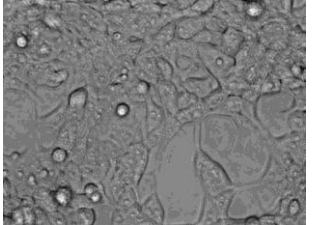
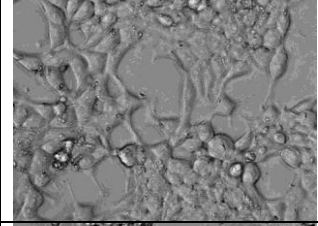
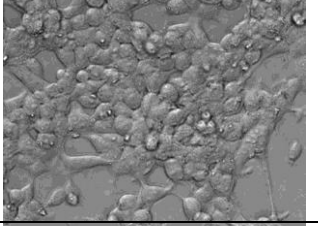
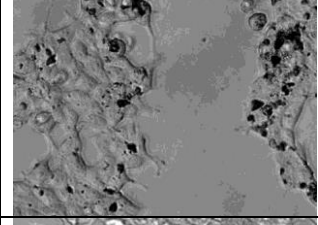
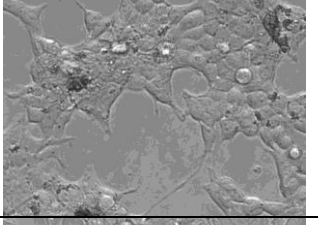
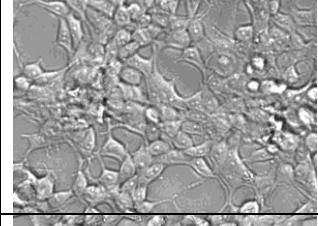
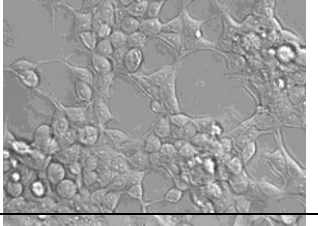
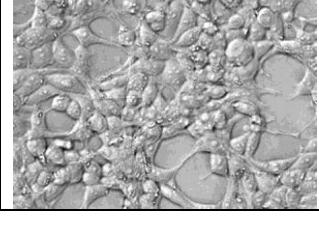
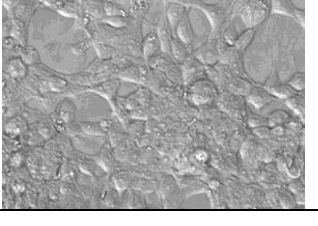
Результаты MTS-теста показали, что ни одно из исследуемых соединений (сорбенты, свободные и иммобилизованные инулиназы) не приводило к снижению активности митохондриальной дегидрогеназы по окислению MTS. Следовательно, все соединения не являются токсичными и могут быть использованы в пищевой промышленности (табл. 63).

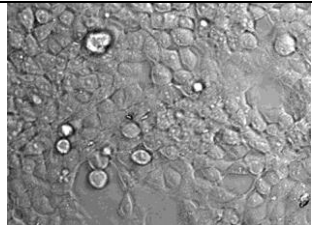
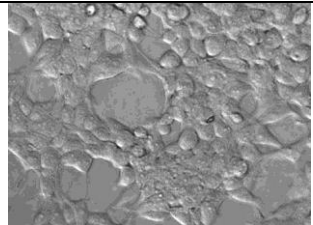
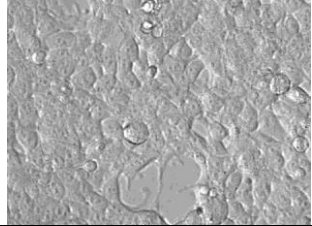
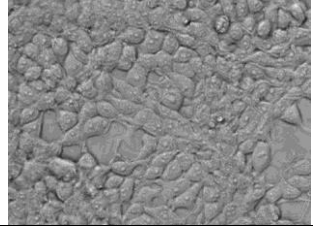
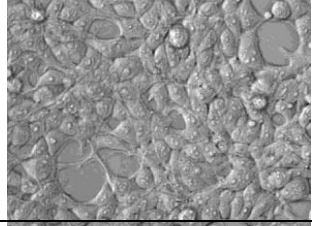
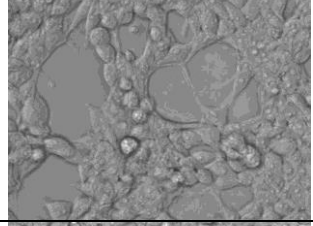
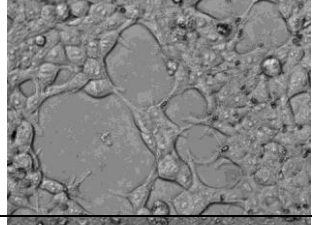
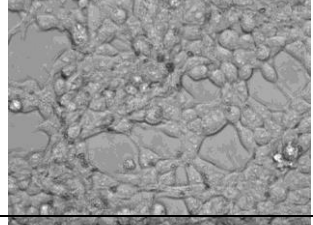
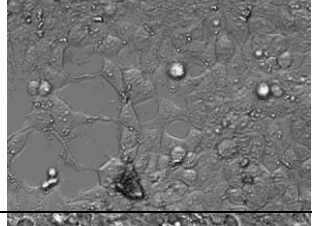
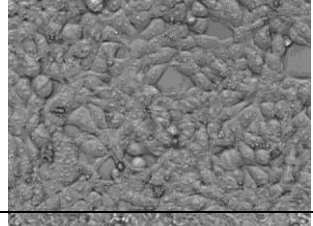
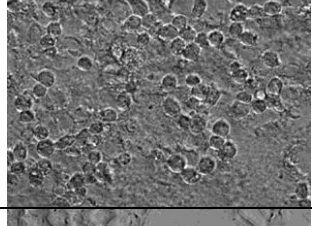
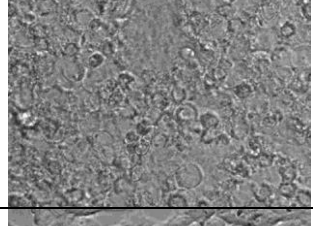
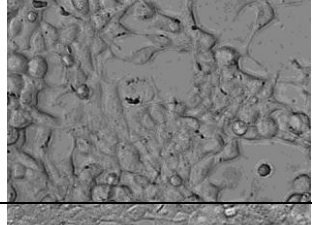
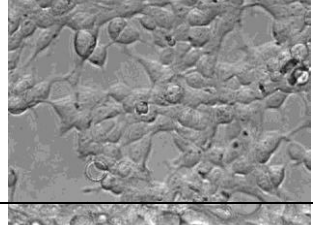
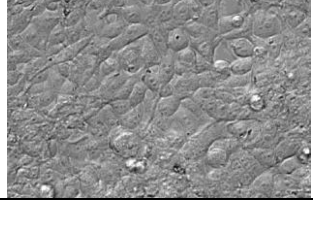
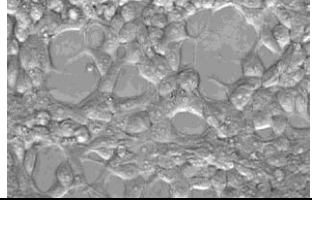
Цитотоксичность носителей, свободных и иммобилизованных инулиназ в  
MTS-тесте

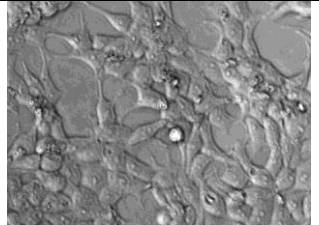
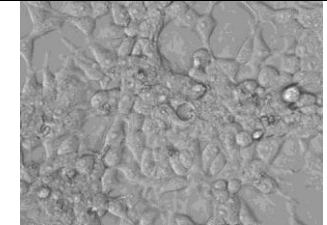
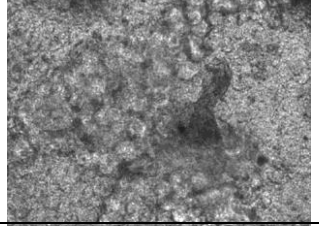
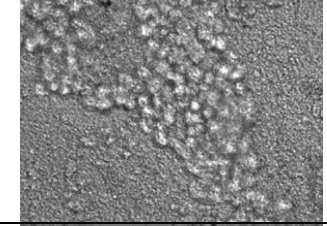
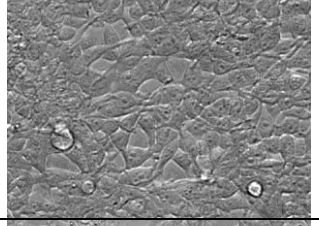
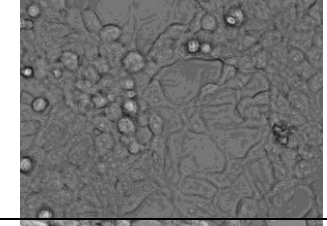
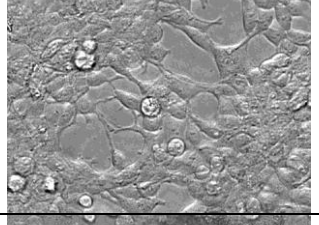
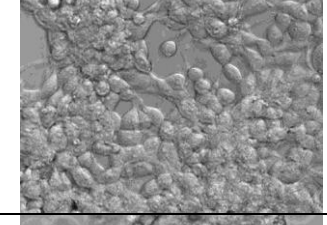
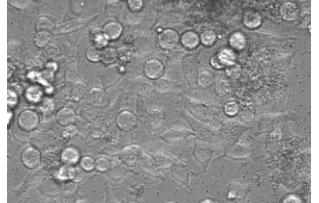
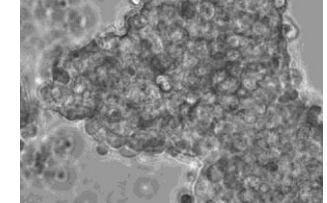
Препарат	Остаточная дегидрогеназная активность, % от контроля
Азид натрия	3±1,2
КУ-2	98±5,2
АН-12П	95±10,1
ЭДЭ-10	102±7,5
КУ-2-8чС	95±5,3
АМ 21А	110±11,4
АВ-16-ГС	104±9,9
АВ-17-2П	112±8,9
PUROLITE	95±13,3
ИМАС-НР	106±7,8
Растительная инулиназа	96±15,5
Растительная инулиназа/КУ2	98±9,8
Растительная инулиназа/КУ-2-8чС	103±9,5
Растительная инулиназа/АВ-17-2П	116±10,1
Дрожжевая инулиназа	89±11,2
Дрожжевая инулиназа/КУ-2	94±10,7
Дрожжевая инулиназа/АВ-17-2П	96±12,4
Дрожжевая инулиназа/ВИОН КН-1	103±15,8

Далее мы исследовали морфологию клеток, пролиферирующих в присутствии сорбентов, свободных и иммобилизованных ферментов (табл. 64). Как видно из результатов микроскопии, ни одно из испытуемых соединений не вызывало изменений в морфологии клеток и не оказывало цитостатического эффекта, в отличие от положительного контроля – азида натрия.

Оценка цитотоксичности сорбентов, свободных и иммобилизованных  
инулиназ

Сорбент	24 часа инкубации	48 часов инкубации
Азид натрия		
Контроль		
КУ-2		
АН-12П		
ЭДЭ-10		
КУ2-8-чС		

AM 21A		
AB-16-ГС		
AB-17-2П		
PUROLITE		
IMAC-HP		
Растительная инулиназа		
Растительная инулиназа/КУ-2		
Растительная инулиназа/КУ-2-8чС		

Растительная инулиназа/АВ-17-2П		
Дрожжевая инулиназа		
Дрожжевая инулиназа/КУ-2		
Дрожжевая инулиназа/АВ-17-2П		
Дрожжевая инулиназа/ВИОН КН-1		

Таким образом, нами впервые оценены генотоксические и цитотоксические свойства препаратов инулиназы, иммобилизованной на различных синтетических носителях. Показано, что исследованные сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать к использованию в качестве катализаторов для промышленного получения фруктозы из растительного сырья.

## 6.8. Иммобилизация как один из перспективных путей регулирования активности молекул инулиназ

Исследования структурно-функциональных свойств инулиназ в условиях различного микроокружения заслуживают особого внимания. При иммобилизации энзима его микроокружение представляет собой систему регуляции, контроля и стабилизации ферментативной активности. В связи с вышесказанным работы в области получения высокостабильных биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов приобретают все большую актуальность.

Рассмотрев большое число работ и базируясь на результатах собственных исследований (табл. 65), мы убедились в том, что иммобилизация может приводить к значительной потере активности ферментного препарата, однако, подбирая соответствующий носитель и метод образования связи между взаимодействующими компонентами, можно значительно уменьшить неблагоприятное влияние матрицы на структурно-функциональные свойства энзима и тем самым повысить удельную активность иммобилизованного биокатализатора. К тому же, иммобилизация позволяет увеличить значение температурного оптимума для функционирования инулиназы (Kim W.Y., 1982, Wei W., 1999), стабилизирует конформацию ее молекулы, защищает пространственную структуру фермента от воздействия денатурирующих агентов.

Оптимальные значения температуры и рН среды для функционирования  
иммобилизованных инулиназ

Продуцент	Носитель	Сохранение активности, %	Параметры до иммобилизации		Параметры после иммобилизации		Источник литературы
			t, °C	pH	t, °C	pH	
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-303	AB-17-2П	75,5	50	4,7	70	4,5-	наши данные
	ВИОН КН-1	27,5				4,7	
	КУ-2	61,7				4,7	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	Duolite A568	35,6	50	5,5	55	5,5	(Singh R.S., 2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Макропористые полистериновые шарики	62	50	4,5	55	5,0	(Wenling W., 1999)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	На-альгинатные шарики	100	55	5,5	55	5,5	(Richetti A., 2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Amino-cellulofine	15	55	5,0	60	5,0	(Kim B., 1997)
	Amberite	4					
	Хитин	10					
<i>Aspergillus awamori</i>	AB-16-ГС	30 <sup>2</sup>	50	4,7	70	4,7	(Ковалева Т.А., 1998)
		60 <sup>3</sup>			75		
		85 <sup>4</sup>					
<i>Aspergillus awamori</i>	Стиросорб	90	50-55	4,7	50-75	4,0-5,0	(Шкутина И.В., 2012)
	MN-200	77					
<i>Aspergillus ficuum</i>	Шарики из пористого стекла	77,2	60	4,7	70	5,0	(Ettalibi M., 2001)
<i>Aspergillus fumigatus</i> C11	Хитозан	38,8	55	6,0	60	6,0	(Chen M., 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Са-альгинатный гель	80	50	5,0	50	5,0	(Rawat H.K., 2017)



1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Aspergillus niger</i>	Amberlite IRC 50	26	56	4,9	52	5,4	(Rocha J.R., 2005)
<i>Aspergillus niger</i>	Lentikat	48	60	4,5	50	4,5	(Fernandes P., 2008)
<i>Aspergillus niger</i>	Хитозан	83	60	4,0	60	3,0	(Yewale T., 2013)
<i>Aspergillus niger</i>	Магнетитовые хитозановые микрочастицы	81,4	70	6,0	50	4,6	(Paripoorani K.S., 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Магнитный золь-гель	80	60	4,5	60	5,0	(Santa G., 2011)
<i>Aspergillus terreus</i>	Альгинатный гель с добавлением карбоксиметилцеллюлозы	53,4	50	5,0	55	5,5	(Ghada E.A., 2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Полиакриламидный гель	45	37	6,0	45	6,2	(Gupta A.K., 1990)
<i>Helianthus tuberosus</i>	КУ-2	80,4	48	6,8	60-70	5-7	наши данные
	КУ-2-8чС	42,6					
	АВ-17-2П	22,5					
<i>Escherichia coli/</i> pMSiftOptR <sup>1</sup>	Duolite A561	4,5	60	5,25	65	5,25	(Letca D., 2004)
	Duolite A568	20,6					
	Amberlite IRA67	1,7					
	Amberlite IRA 94S	19,8					
<i>Escherichia coli/</i> pMSiftOptWT <sup>1</sup>	Duolite A561	4,2	60	5,25	65	5,25	(Letca D., 2004)
	Duolite A568	19,3					
	Amberlite IRA67	1,6					
	Amberlite IRA 94S	19,0					

<sup>1</sup> инулиназа была экспрессирована в данный организм

<sup>2</sup> при использовании адсорбционного способа иммобилизации

<sup>3</sup> при использовании глутаральдегидного метода иммобилизации

<sup>4</sup> при использовании модифицированного глутаральдегидного метода иммобилизации

По сравнению с препаратами, полученными другими учеными, разработанная нами методика иммобилизации инулиназы, позволяет увеличить ее температурный оптимум до 70 °С и расширить рН-оптимум растительного фермента до диапазона 5-7 единиц.

Анализ литературных данных позволяет предположить, что механизмы стабилизации иммобилизованных ферментов в условиях экстремальных значений рН, температуры, а также других денатурирующих агентов в главных чертах совпадают и обусловлены, прежде всего, изменением степени мобильности третичной структуры белка, ответственной за образование фермент-субстратного комплекса, а, следовательно, и продуктов реакции.

Проведенное и проанализированное нами детальное и разностороннее изучение влияния различных физико-химических агентов на свободные и иммобилизованные инулиназы, вероятно, будет способствовать выявлению механизмов регулирования каталитической активности ферментных препаратов и способов целенаправленного изменения их характеристик за счет варьирования микроокружения путем связывания поверхности белковых глобул с матрицами нерастворимых носителей природного и синтетического происхождения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рамки инженерной энзимологии гораздо шире, чем создание катализаторов нового типа. Фундаментальная задача данной отрасли состоит в том, чтобы разработать научные основы получения и применения ферментных катализаторов для создания новых биотехнологических процессов в промышленности, новых методов в терапии и медицинской диагностике, анализе, органическом синтезе и в других областях практической деятельности. Несмотря на определенные сложности, исследования в области иммобилизации биологических систем разного уровня организации чрезвычайно важны и, по-видимому, сохранят свое значение в обозримом будущем. Развитие инженерной энзимологии и способов модификации ферментов и клеток будет зависеть от теоретических и практических результатов этих исследований все в большей степени.

Незначительное число работ посвящено вопросам изучения биофизических (физико-химических) основ стабилизации ферментов путем иммобилизации, а также разработке условий получения и применения гетерогенных биокатализаторов и биосенсоров на их основе. Решение многих вопросов и задач, связанных с методическими приемами иммобилизации, подбором носителей, определением кинетических параметров катализа, является необходимым условием для создания новых технологических разработок, конструирования реакторов и проектирования более эффективных гетерогенных биокатализаторов пролонгированного действия для промышленности, медицины и аналитических целей.

В настоящее время, чтобы двигаться вперед в плане получения новых конкурентоспособных биокатализаторов необходимо досконально изучить молекулярные механизмы взаимодействия целевого биообъекта с матрицей носителя, а полученные результаты следует принимать во внимание при разработке новых способов оценки и регулирования структурного состояния белковых молекул в условиях их иммобилизации на различных типах полимеров. В этом плане современному биотехнологу приходят на помощь

методы компьютерного и математического моделирования, которые позволяют прогнозировать принципиально новые комплексы препаратов на основе использования направленного конструирования материалов – носителей для иммобилизации и сшивающих агентов.

В диссертационной работе раскрыты особенности физико-химических, кинетических и структурно-функциональных свойств свободных и иммобилизованных инулиназ с точки зрения фундаментальной и прикладной науки. В сравнительном аспекте проанализированы методы регулирования их активности, дана характеристика гетерогенных препаратов на основе иммобилизованного энзима и предложены пути их применения. Особое внимание уделено описанию функциональных свойств инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* в условиях различного микроокружения, выявлению оптимальных для их функционирования параметров системы, характеристике стабильности белковых макромолекул, устойчивости их к температурным воздействиям и экстремальным значениям рН среды. Обсуждены перспективы развития биотехнологических процессов с использованием свободных и иммобилизованных инулиназ.

Многосторонне исследована структурная организация инулиназ микробного и растительного происхождения. Для изучения размера, молекулярной массы, надмолекулярной организации был разработан комплексный подход, заключающийся в сочетании атомно-силовой микроскопии с методами динамического светорассеяния, ИК-спектроскопии, гель-хроматографии и электрофореза. Показано, что инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger* образуют гетеродимеры, а инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* представлены как димерной, так и мономерной формами. Был рассмотрен вопрос о роли различных форм фермента в проявлении его функциональной активности. Выявлены закономерности образования энзимом надмолекулярных комплексов при его различных концентрациях в системе, варьировании значений температуры, рН-среды, воздействии УФ-облучения.

Продemonстрировано, что сравнение аминокислотных последовательностей и соотношения типов вторичных структур инулиназ из различных продуцентов является полезным на первых этапах изучения структурно-функциональных свойств ферментов, так как позволяет сэкономить временные и материальные ресурсы, его вполне достаточно для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик белковых молекул и экспресс-оценки их динамического состояния. Однако, для получения более точных результатов расчетные данные должны быть подкреплены рядом работ биофизического и биохимического характера.

Показано, что одним из эффективных путей регулирования и стабилизации активности инулиназ является их иммобилизация. Методами компьютерного моделирования был выполнен виртуальный скрининг высокоаффинных лигандов для адсорбции инулиназы. Изученный нами набор лигандов представлял собой высокомолекулярные соединения – поликатиониты и полианиониты, гликопротеины, пролино-фенилаланиновый пептид, полилактат. На основе сравнительного анализа величин полной энергии и локализации мест связывания лигандов, а также литературных данных, были высказаны соображения о механизмах взаимодействия предлагаемых нами матриц для иммобилизации молекул фермента и структурных особенностях таких комплексов.

Предложен ряд ионообменных смол и волокон для получения гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы. Установлено, что хитозаны различной молекулярной массы, ионообменные смолы АВ-17-2П, КУ-2, АВ-16-ГС, АМ 21А, ИМАС-НР, PUROLITE и волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 могут применяться в качестве носителей для иммобилизации инулиназы. Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием методов последовательного (каскадного) докинга и ИК-спектроскопии. Выявлены сходства и отличия путей сорбции инулиназ из

*Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана.

С помощью компьютерного моделирования визуализированы вероятные сайты связывания полимерных матриц с молекулой фермента при адсорбционной иммобилизации. Установлено, что образование комплекса инулиназы с заряженными матрицами носителей происходит в основном за счет водородных связей, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

Оптимизирована методика сорбционной иммобилизации инулиназы, позволяющая сохранить до 80 % первоначальной ферментативной активности. Исследованы физико-химические и кинетические свойства гетерогенных препаратов. Установлено, что иммобилизованная инулиназа проявляет максимальную каталитическую активность в диапазоне температур до 70 °С, тогда как оптимум функционирования ее растворимой формы составляет 50 °С.

При сополимеризации (ковалентной иммобилизации без использования носителя) молекул инулиназы с различными концентрациями глутарового альдегида нам не удалось сохранить более 20 % каталитической активности нативного ферментного препарата, поэтому мы сочли данный метод менее перспективным по сравнению с сорбционной иммобилизацией энзима.

Созданы математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназы от значений температуры, рН среды, концентрации инулина, предложена модель процесса гидролиза инулина гетерогенным ферментным препаратом. Установлено, что для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованной на АВ-17-2П и КУ-2, лучшая аппроксимация экспериментальных данных наблюдается при использовании модели двух ферментов. Можно предположить, что при иммобилизации дрожжевой инулиназы на матрицах АВ-17-2П и КУ-2 мы имеем в системе одновременно две формы фермента, отличающиеся друг от друга по кинетическим характеристикам. Для свободной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и энзима, иммобилизованного на ВИОН КН-1, АВ-16-ГС и АМ

21А, больше подходит модель с субстратным ингибированием. Для трех инулиназ из *Helianthus tuberosus* и для иммобилизованных на КУ-2, КУ-2-8С и АВ-17-2П препаратов растительной инулиназы лучшая аппроксимация экспериментальных данных наблюдается при использовании простой модели Михаэлиса.

Протестированы экстракты некоторых инулинсодержащих растений в качестве субстрата для иммобилизованного фермента. Установлено, что иммобилизованный препарат инулиназы проявляет максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов топинамбура, цикория, георгина, девясила, которые по этой причине являются перспективным сырьем для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем. Показано, что исследованные сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их для использования в качестве катализаторов для пищевой промышленности.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger* являются гетеродимерами, а инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* представлены как димерной, так и мономерной формами. Активность инулиназ из всех исследуемых нами продуцентов в димерной форме ниже, чем суммарная активность их субъединиц.
2. Установлено, что при концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  моль/л инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* на 70-80 % диссоциирована на субъединицы. В диапазоне концентраций  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л преобладают димерные (максимум до ~80 %) и тетрамерные формы фермента (максимум до ~40 %). Рассчитано значение константы димеризации дрожжевой инулиназы ( $K$ ), равное  $617\,000\text{ M}^{-1}$  ( $R^2 = 0,87$ ).
3. Показано, что при оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении температуры (50 и 48 °С соответственно) молекулы энзима из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* находятся преимущественно в димерной форме. В диапазоне от 25 до 40 °С процессы ассоциации-диссоциации молекул белка практически не зарегистрированы. Интенсивная агрегация макромолекул при концентрациях энзима в растворе 1, 5 и 10 мг/мл наблюдалась соответственно при 60, 58 и 50 °С для растительной инулиназы и при 70, 64 и 62 °С – для дрожжевой.
4. Выявлено, что при оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении pH 4,7 молекулы энзима из *Kluyveromyces marxianus* находятся преимущественно в димерной форме. При pH 3,5 детектируется образование октамерных форм (до 11,5 % от общего числа частиц в системе) и более крупных ассоциатов.
5. По критерию термической устойчивости инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* оказалась наиболее перспективной для промышленного применения по сравнению с другими изучаемыми нами ферментами: константы скорости термической инактивации и доля инактивированных молекул ниже при всех исследуемых температурах.



6. Установлено, что при УФ-облучении в дозах 755 Дж/м<sup>2</sup> и выше происходит фотомодификация ароматических и серосодержащих аминокислотных остатков белка, приводящая к ассоциации молекул дрожжевой и растительной инулиназы. Следствием воздействия доз УФ-излучения в диапазоне 4530-6040 Дж/м<sup>2</sup> является падение каталитической активности инулиназ.

7. Методами компьютерного моделирования выполнен виртуальный скрининг лигандов для иммобилизации инулиназы. Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием методов последовательного (каскадного) докинга и ИК-спектроскопии.

8. *In silico* показано, что при сорбции инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluveromyces marxianus* на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана выявляются следующие сходства: 1) при взаимодействии обоих видов инулиназ с матрицей КУ-2 водородные связи образуются только между сульфогруппами носителя и молекулой белка; 2) между матрицей анионита АВ-17-2П и ферментами выявляется наличие лишь ван-дер-ваальсовых взаимодействий и отсутствие водородных связей; 3) хитозан образует с обеими инулиназами наибольшее количество водородных связей из исследуемых нами носителей.

9. Выявлены отличительные особенности инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluveromyces marxianus* при сорбции на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90: 1) аффинности связывания дрожжевой инулиназы с поверхностью смолы КУ-2 в целом выше, а число водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий больше, чем у грибного фермента; 2) аффинности связывания и число ван-дер-ваальсовых взаимодействий для инулиназы из *Kluveromyces marxianus* при сорбции на анионите АВ-17-2П также превышают их значения для энзима из *Aspergillus ficuum*; 3) в отличие от грибного энзима, у которого 21 аминокислотный остаток входит в состав сайтов связывания со всеми исследуемыми нами носителями, у дрожжевой инулиназы такой остаток только один.

10. Установлено, что при увеличении в растворе количества инулиназы по отношению к доле катионита КУ-2, она образует локальные участки с высоким содержанием на его поверхности. После заполнения пор и активных заряженных групп ионита адсорбция фермента осуществляется не на матрицу носителя, а на молекулы самого белка, т.е. в системе инулиназа/носитель присутствует определенное количество необменно сорбированного энзима, закрепленного с помощью сорбат-сорбатных взаимодействий.

11. Созданы математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназ от значений температуры (20-95 °С), pH (3,0-8,5), концентрации инулина (до 1,2 мМ), а также модель учета кинетики реакции как инструменты для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде.

12. Экстракты клубней топинамбура, корней цикория и девясила, луковиц георгина предложены как перспективные субстраты для промышленного использования с целью одностадийного получения фруктозы ферментативным путем.

13. Впервые оценены генотоксические и цитотоксические свойства инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*, иммобилизованных на КУ-2, КУ-2-8чС, АВ-17-2П, ВИОН КН-1: исследованные сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их к использованию в качестве катализаторов для промышленного получения фруктозы из растительного сырья.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абелян В.А. Иммуобилизация микробной инулиназы на различных носителях / В.А. Абелян, Л.С. Манукян // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28, № 3. – С. 356–361.
2. Абелян В.А. Получение фруктозо-глюкозного сиропа из инулинсодержащего сырья с применением иммуобилизованных клеток дрожжей / В.А. Абелян, Л.С. Манукян, Э.Г. Африкян // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34, № 5. – С. 544–548.
3. Абелян В.А. Характеристика экзо-инулаз *Kluveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* / В.А. Абелян, Л.С. Манукян // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 6. – С. 1028–1036.
4. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа / А.Ф. Жуков [и др.]. – М. : Химия, 2001. – 496 с.
5. Биофизика: Учебник для вузов / В.Г. Артюхов [и др.] – М.: Академический Проект. – 2009. – 294 с. (гриф УМО по биол. наукам Минобрнауки РФ, 2010).
6. Бруцкус Т.К. Иониты. Каталог / Т.К. Бруцкус, Е.В. Замбровская, И.В. Самборский. –Черкассы, 1975. – 36 с.
7. Влияние температуры на протонирование низкоосновных анионитов / А.А. Загородний [и др.] // Журнал физической химии. – 1995. – Т. 69, № 4. – С. 661–663.
8. Выделение и свойства рекомбинантных инулиназ *Aspergillus* sp. / П.В. Волков [и др.] // Биохимия. – 2012. – Т. 77, № 5. – С. 611–621.
9. Горбунов Н.В. О кондиционировании катионитов / Н.В. Горбунов, Н.Г. Полянский. // Журнал физической химии. – 1978. – Т. 52, № 5. – С. 1259–1262.
10. Диксон М. Ферменты: в 2 т. / М. Диксон, Э. Уэбб – М. : Мир, 1982. – Т. 1. – 389 с.
11. Еременко В.А. Влияние температуры на необменную сорбцию ароматических аминокислот низкоосновным анионообменником АН-31 /

- В.А. Еременко, О.Н. Хохлова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007. – Т.7, № 6. – С. 1032–1038.
12. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош. – Л. : Агропромиздат, 1987. – 429 с.
13. Ефременко Е.Н. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов / Е.Н. Ефременко, Н.Ю. Татарина // Микробиология. – 2007. – Т. 76. № 3. – С. 383–389.
14. Жеребцов Н.А. Биосинтез инулиназ бактериями рода *Bacillus* / Н.А. Жеребцов, С.А. Шеламова, И.Н. Абрамова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, № 6. – С. 634–638.
15. Жеребцов Н.А. Выделение экстрацеллюлярной бактериальной инулиназы и изучение ее физико-химических свойств / Н.А. Жеребцов, Н.И. Абрамова, С.А. Шеламова // Биотехнология. – 2002. – № 3. – С. 13–20.
16. Жеребцов Н.А. О механизме каталитического действия карбогидраз (обзор) / Н.А. Жеребцов, О.С. Корнеева, Т.Н. Тертычная // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 2. – С. 123–132.
17. Идентификация каталитически активных групп инулиназы *Bacillus poytuxa* 722 / Н.А. Жеребцов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 619–624.
18. Иммобилизованные грибные биокатализаторы для получения комплекса целлюлаз, гидролизующего возобновляемое растительное сырье / Е.Н. Ефременко [и др.] // Катализ в промышленности. – 2013. – № 1. – С. 68–77.
19. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов / В.А. Углянская [и др.]. – Воронеж : Изд-во Воронежского государственного университета, 1989. – 208 с.
20. Ионные равновесия в растворах аминокислот при различных температурах / В.Ю. Хохлов [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: «Химия. Биология. Фармация». – 2003, № 1. – С. 18–24.

21. Ковалева Т.А. Кинетико-термодинамические аспекты катализа полисахаридов свободными и иммобилизованными амилазами / Т.А. Ковалева // Биофизика. – 2000. – Т. 45, № 3. – С. 439–444.
22. Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобилизованными амилазами : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.02 : защищена 21.10.98 : утв. 1.04.99 / Т.А. Ковалева. – Воронеж, 1998. – 421 с.
23. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды / О.С. Корнеева. – Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. – 184 с.
24. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики / Э. Корниш-Боуден. – Москва : Мир, 1979. – 280с.
25. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты / Б.И. Курганов. – М.: Наука, 1978. – 248 с.
26. Курганов Б.И. Анализ колоколообразных рН-зависимостей скорости ферментативной реакции / Б.И. Курганов, Е.В. Петушкова // Биохимия. – 1992. – Т. 57, № 3. – С. 348–361.
27. Лурье А.А. Сорбенты и хроматографические носители / А.А. Лурье. – М. : Химия, 1972. – 320 с.
28. Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз / Д.Г. Наумов // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 6. – С. 764–780.
29. Наумов Д.Г. Фуранозидазное суперсемейство: поиск гомологов / Д.Г. Наумов // Молекулярная биология. – 2012. – Т. 46, № 2. – С. 354–360.
30. Необменная сорбция фенилаланина низкоосновными анионообменниками из солянокислых растворов / Т.С. Карлашова [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2014. – Т. 14, № 4. – С. 648–653.
31. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В.Г. Артюхов [и др.]. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1997. – 264 с.

32. Особенности адсорбции инулазы на волокнистых полиэлектролитах / И.В. Шкутина [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2004. – Т. 4, № 4. – С. 422–427.
33. Остатки Trp 17 и Glu 20 консервативной последовательности WMN(D/E)PN необходимы для активности эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* / С. Парк [и др.] // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 6. – С. 805–809.
34. Полянский Н.Г. Методы исследования ионитов / Н.Г. Полянский, Н.В. Горбунов, Н.Л. Полянская. – М. : Химия, 1976. – 208 с.
35. Применение теории поверхностных комплексов для описания сорбции аминокислот ионообменниками / В.Ю. Хохлов [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10, № 6. – С. 911–915.
36. Ранозаживляющий материал / В.Л. Белобородов [и др.] // Патент RU 2229311. – 2004.
37. Самоассоциация и вторичная структура бета-казеина / Д.А. Файзуллин [и др.] // Биоорганическая химия. – 2013. – Т. 39, № 4. – С. 411–417.
38. Сердюк И. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика : учебное пособие: в 2 т. / И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи; [пер. с англ.: А.Ю. Хмельницкий и др.; науч. ред. И. Сердюк]. – М.: КДУ, 2009. – Т. 2. – 733 с.
39. Сердюк И.Н. Физические методы и молекулярная биология / И.Н. Сердюк. – Биофизика. – 2009. – Т. 54, № 2. – С. 343–381.
40. Скрыбин К.Г. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / К.Г. Скрыбин. – М: Наука, 2002 – 360 с.
41. Сливкин А.И. Физико-химические и биологические методы оценки качества лекарственных средств / А.И. Сливкин, В.Ф. Селеменев, Е.А. Суховерхова. – Воронеж : Изд-во Воронежского государственного университета, 1999. – 368 с.
42. Соколенко Г.Г. Изучение экспрессии гена инулиназы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluveromyces marxianus* / Г.Г. Соколенко, Н.А. Карпеченко // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 1. – С. 37–42.

43. Соколенко Г.Г. Новый штамм *Saccharomyces cerevisiae*-G, обладающий инулиназной активностью и хорошими хлебопекарными свойствами / Г.Г. Соколенко, Н.А. Карпеченко // Биотехнология. – 2013. – № 6. – С. 18–22.
44. Соколенко Г.Г. Применение инулинсодержащей биодобавки при сбраживании молочной сыворотки и пивного суслу дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluveromyces marxianus* / Г.Г. Соколенко, С.А. Яровой, К.К. Полянский // Биотехнология. – 2010. – № 6. – С. 42–46.
45. Структура и свойства комплексов альфа-химотрипсина с гидроксилсодержащими геминальными дикатионными ПАВ с варьируемой длиной спейсерного фрагмента / Ю.А. Валиуллина [и др.] // Журнал структурной химии. – 2014. – Т. 55, Прил. № 2. – С. S376 – S383.
46. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот / В.Ф. Селеменев [и др.]. – Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета, 2001. – 300 с.
47. Финкельштейн А.В. Физика белка: Курс лекций с цв. и стереоскоп. ил.: Учебное пособие для студ. вузов, обуч. по биол. специальностям / А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицын; Ин-т белка РАН. – М.: Университет, 2002. – 374 с.
48. Хёлль В.Х. Теория образования поверхностных комплексов и ее применение для описания многокомпонентных сорбционных динамических систем / В.Х. Хёлль, А.И. Калиничев // Успехи химии. – 2004. – Т. 73. № 4. – С. 383–403.
49. Хитозан для фармации и медицины / Д.А. Сливкин [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация. 2011. – № 2. – С. 214–232.
50. Холявка М.Г. Исследование структурно-функциональных свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы: дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 : защищена 29.06.10 : утв. 01.10.10 / М.Г. Холявка. – Воронеж, 2010. – 178 с.
51. Хохлов В.Ю. Сорбция ароматических и гетероциклических аминокислот высокоосновными анионообменниками в многокомпонентных системах : автореф. дис. ... д-ра. хим. наук / В.Ю. Хохлов. – Воронеж, 2008. – 38 с.

52. Хохлова О.Н. Некоторые особенности необменной сорбции ароматических аминокислот низкоосновными анионообменниками в динамических условиях. II. Влияние температуры / О.Н. Хохлова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12, № 3. – С. 433–438.
53. Чепурной И.П. Проблемы создания инновационного производства по переработке клубней топинамбура для высокой выработки лечебно-профилактических препаратов и пищевых продуктов / И.П. Чепурной // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: сб. науч. тр. – Москва, Изд-во РАЕН-МААНОИ, 2001. – Вып. 5. – С. 88–93.
54. Шкутина И.В. Влияние ионной формы полиамфолита АНКБ-2 на иммобилизацию ферментов / И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.В. Лунина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, № 2. – С. 247–253.
55. Шкутина И.В. Влияние ионной формы полиамфолита АНКБ-2 на иммобилизацию ферментов / И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.В. Лунина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, № 2. – С. 247–253.
56. Шкутина И.В. Гидролиз инулина с помощью гетерогенных биокатализаторов / И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.Ф. Селеменев // Химия растительного сырья. – 2012. – № 2. – С. 27–31.
57. Шкутина И.В. ИК-спектроскопия для исследования комплекса инулаза-носитель / И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.Ф. Селеменев // Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация. – 2004. – № 1. – С. 110–113.
58. Шуваева Г.П. Исследование физико-химических свойств инулиназы *Saccharomyces cerevisiae* ВГШ-2 / Г.П. Шуваева, Т.Р. Рудковская, О.С. Корнеева // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. – 2010. – № 10–12(31). – С. 60–64.



59. A comparison of properties of inulinases of *Fusarium oxysporum* immobilised on various supports / A.K. Gupta [et al.] // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 1992. – Vol. 53. – P. 293–296.
60. A novel alginate–CMC gel beads for efficient covalent inulinase immobilization / E.A. Ghada [et al.] // Colloid. Polym. Sci. – 2017. – Vol. 295. – P. 495–506.
61. A novel low-temperature-active exo-inulinase identified based on Molecular-Activity strategy from *Sphingobacterium* sp. GN25 isolated from feces of *Grus nigricollis* / J. Zhou [et al.] // Process Biochemistry. – 2014. – Vol. 49. – P. 1656–1663.
62. A preliminary study on high-density cell cultivation of *Kluyveromyces marxianus* IW9801 (CGMCC0360) secreting inulinase and recombinant *Pichia pastoris* EXI2086 overexpressing inulinase / J.-H. Wang [et al.] // Symposium of the international conference on agricultural sciences and technology. – 2001 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&list\\_uids=50096312](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&list_uids=50096312))
63. A review on the production and partial characterization of microbial inulinases / H. Treichel [et al.] // Global Journal of Biochemistry. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–13.
64. A simple method for biocatalyst immobilization using PVA - based hydrogel particles / P. Fernandes [et al.] // Journal of chemical technology and biotechnology. – 2009. – Vol. 84, № 4. – P. 561–564.
65. Addition of polybrene improves stability of organophosphate hydrolase immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel carrier / E.N. Efremenko [et al.] // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 2002. – Vol. 51, № 2. – P. 195–201.
66. Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on Streamline DEAE resin / Y. Makino [et al.] // Brazilian Journal of Chemical Engineering. – 2005. – Vol. 22, № 4. – P. 539–545.

67. Ali S. Nutritional optimizations for improved exo-inulinase production from *Aspergillus oryzae* for high fructose syrup preparations / S. Ali, H. Shahzadi // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – Vol. 4, № 5. – P. 618–631.
68. Allais J. Continuous production of ethanol with *Zymomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice / J. Allais, E. Torres // Biotechnol. and Bioeng. – 1987. – Vol. 29, № 6. – P. 778–782.
69. Ames B.N. A simple method for detecting environmental carcinogens as mutagens / B.N. Ames, J.A. McCann // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1976. – Vol. 271. – P. 5–13.
70. An efficient method for the immobilization of inulinase using new types of polymers containing epoxy groups / M. Trytek [et al.] // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2015 – Vol. 42, № 7. – P. 985–996.
71. Ansari S.A. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review / S.A. Ansari, Q. Husain // Biotechnol. Adv. – 2012. – Vol. 30. – P. 512–523.
72. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization / H. Vaghari [et al.] // Biotechnology Letters. – 2016. – Vol. 38. – P. 223–233.
73. Asparagine 42 of the conserved endo-inulinase INU2 motif WMNDPN from *Aspergillus ficuum* plays a role in activity specificity / A.M. Vandamme [et al.] // FEBS Open Bio. – 2013. – Vol. 3. – P. 467–472.
74. *Aspergillus niger* inulinase immobilized in polyurethane foam and treated in pressurized LPG: A potential catalyst for enzymatic synthesis of fructooligosaccharides / G. de Oliveira Kuhn [et al.] // Biocatalysis and Biotransformation. – 2016. – Vol. 34, № 6. – P. 1–4.
75. Automated UV-C mutagenesis of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1109 and selection for microaerophilic growth and ethanol production at elevated temperature on biomass sugars / S.R. Hughes [et al.] // J. Lab. Autom. – 2013. – Vol. 18, № 4. – P. 276–290.
76. Bajpai P. Characterization of molecular-sieve-bound inulinase / P. Bajpai, A. Margaritis // J. Fermen. Technol. – 1987. – Vol. 65, № 20. – P. 239–242.

77. Balcao V.M. Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art / V.M. Balcao, M.M. Vila // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2015. – Vol. 93. – P. 25–41.
78. Bezzate S. Cloning, sequencing, and disruption of a levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43 / S. Bezzate, M. Steinmetz, S. Aymerich // *J. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – P. 2177–2183.
79. Bienzyme amperometric biosensor using gold nanoparticle-modified electrodes for the determination of inulin in foods / J. Manso [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2008. – Vol. 375, № 2. – P. 345–353.
80. Biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms in the production of bioethanol and biobutanol / E.N. Efremenko [et al.] // *Catalysis in Industry*. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 41–46.
81. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis / A.A. Kulminskaya [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – Vol. 1650, № 1. – P. 22–29.
82. Bioethanol production by heterologous expression of two individual 1-FEH genes from *Helianthus tuberosus* in *Saccharomyces cerevisiae* 6525 / X. Zhang [et al.] // *Bioenerg. Res.* – 2016. – Vol. 9. – P. 884–893.
83. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses / Z.M. Chi [et al.] // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – P. 4295–4303.
84. Butanol production from inulin-rich chicory and *Taraxacum kok-saghyz* extracts: determination of sugar utilization profile of *Clostridium saccharobutylicum* P262 / V. Ujor [et al.] // *Ind. Crops Prod.* – 2015. – Vol. 76. – P. 739–748.
85. Carbohydrate binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition / A.B. Boraston [et al.] // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 382. – P. 769–781.
86. Carbon nanotubes as supports for inulinase immobilization / T.B. Garlet [et al.] // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19, № 9. – P. 14615–14624.
87. Catalytic mechanism of inulinase from *Arthrobacter* sp. S37 / K.Y. Kim [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 371, № 4. – P. 600–605.

88. *Cellvibrio japonicus*  $\alpha$ -L-arabinanase A43 has a novel five-blade  $\beta$ -propeller fold / D. Nurizzo [et al.] // Nature Struct. Biol. – 2002. – Vol. 9. – P. 665–668.
89. Characterization of a purified  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 / M. Warchol [et al.] // Lett. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 35, № 6. – P. 462–467.
90. Characterization of an exo-inulinase from *Arthrobacter*: a novel NaCl-tolerant exo-inulinase with high molecular mass / J. Shen [et al.] // Bioengineered. – 2015. – Vol. 6. – P. 99–105.
91. Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase / I. Martin [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1987. – Vol. 208. – P. 177–184.
92. Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7 / W. Gao [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 157, № 3. – P. 498–506
93. Chen X.-M. Expression, purification and characterization of exo-inulinase gene / X.-M. Chen, X.-M. Xu, Z.-Y. Jin – 2010 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADM21204.1>)
94. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery / F.C. MacLaughlin [et al.] // J. Control. Release. – 1998. – Vol. 56. – P. 259–272.
95. Claessens G. / Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.) / G. Claessens, A. Van Laere, M. De Proft // J. Plant Physiol. – 1990. – Vol. 136, № 1 – P. 35–39.
96. Cloning and analysis of the inulinase gene from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS4857 / T.Q. Wen [et al.] // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2003. – Vol. 19. – P. 423–426.
97. Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa* / H.J. Kwon [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2003. – Vol. 25, № 2. – P. 155–159.
98. Cloning and characterization of an inulinase gene from the marine yeast *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3 and its expression in

- Saccharomyces* sp.W0 for ethanol production / L.L. Zhang [et al.] // Mol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 57. – P. 337–347
99. Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.) / K. Ueno [et al.] // Chemistry Central Journal. – 2011. – Vol. 5. – P. 16–24.
100. Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficuum* / T.B. Uhm [et al.] // Biotechnology Letters. – 1998. – Vol. 20. – P. 809–812.
101. Cloning and sequence analysis of the invertase gene *INV1* from the yeast *Pichia anomala* / J.A. Perez [et al.] // Current. Genetics. – 1996. – Vol. 29. – P. 234–240.
102. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424 / O. Laloux [et al.] // FEBS Lett. – 1991. – Vol. 289, № 1. – P. 64–68.
103. Cloning of exoinulinase gene from *Penicillium janthinellum* strain B01 and its high-level expression in *Pichia pastoris* / L. Wang [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2011. – Vol. 111. – P. 1371–1380.
104. Cloning, characterization and heterologous expression of the INU1 gene from *Cryptococcus aureus* HYA / T.S. Cao [et al.] // Gene. – 2013. – Vol. 516, № 2. – P. 255–262.
105. Cloning, expression, characterization, and mutagenesis of a thermostable exoinulinase from *Kluyveromyces cicerisporus* / J.Y. Ma [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2016. – Vol. 178. – P. 144–158.
106. Cloning, overexpression, and characterization of a highly active endoinulinase gene from *Aspergillus fumigatus* Cl1 for production of inulo-oligosaccharides / M. Chen [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 175. – P. 1153–1167.
107. Cold-active and NaCl-tolerant exo-inulinase from a cold-adapted *Arthrobacter* sp. MN8 and its potential for use in the production of fructose at low temperatures / J. Zhou [et al.] // J Biosci Bioeng. – 2015. – Vol. 119. – P. 267–274.

108. Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions / F.V. Risso [et al.] // Braz. J. Chem. Eng. – 2010. – Vol. 27, № 4. – P.507–516.
109. Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production / C. Flores [et al.] // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2014. – Vol. 119. – P. 421–426.
110. Consolidated ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at elevated temperature by *Saccharomyces cerevisiae* engineered with inulinase expression through cell surface display / M.M. Khatun [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 44. – P. 295–301.
111. Continuous generation of fructose from *Taraxacum officinale* tap root extract and inulin by immobilized inulinase in a packed-bed reactor / H.K. Rawat [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2017. – Vol. 9. – P. 134–140.
112. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85 / W. Wei [et al.] // Proc. Biochem. – 1999. – Vol. 34. – P. 643–646.
113. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817 / T. Nakamura [et al.] // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1995. - Vol. 80, № 2. – P. 164–169.
114. Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase / Q.D. Nguyen [et al.] // Process Biochem. – 2011. – Vol. 46. – P. 298–303.
115. Cornish-Bowden A. Fundamentals of enzyme kinetics / Athel Cornish-Bowden. – Weinheim : Wiley–VCHVerlag&Co. – 2012. – 510 p.
116. Crystal structure of exoinulinase from *Aspergillus awamori* : the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition / R.A. Nagem [et al.] // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 344, № 11 – P. 471–480.
117. Crystal structure of inactivated *Thermotoga maritima* invertase in complex with the trisaccharide substrate raffinose / F. Alberto [et al.] // Biochem. J. – 2006. – Vol. 395. – P. 457–462.

118. Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose / W. Lammens [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 377. – P. 378–385.
119. Crystal structures of the apo form of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose / A. Bujacz [et al.] // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 1728–1744.
120. Crystallization and general properties of an extracellular inulase from *Aspergillus* sp. IV. Studies on microbial inulase / T. Nakamura [et al.] // *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* – 1978. – Vol. 52. – P. 159–166.
121. Crystallization and X-ray diffraction studies of a two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus* / S. Tishchenko [et al.] // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications.* – 2015. – Vol. 71. – P. 1200–1204.
122. Danial E.N. Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods / E.N. Danial, M.M. Elnashar, G.E. Awad // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2010. – Vol. 49. – P. 3120–3125.
123. Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger* / X.L. Yuan [et al.] // *Microbiology.* – 2006. – Vol. 152. – P. 3061–3073.
124. de Moura F.A. Oligosachharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review / F.A. de Moura, F.T. Macagnan, L.P. da Silva // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2014. – Vol. 50. – P. 275–281.
125. De Roover J. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus* L.) / J. De Roover, A. Van Laere, W. Van den Ende // *Physiol. Plant.* – 1999. – Vol. 106. – P. 158–163.
126. Deletion of loop fragment adjacent to active site diminishes the stability and activity of exo-inulinase / M.R. Arjomand [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – Vol. 92. – P. 1234–1241.
127. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis / J.R. Rocha [et al.] // *Food Chemistry.* – 2006. – Vol. 95. – P. 77–82.

128. Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505 / P. Petrova [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2015. – Vol. 186. – P. 329–333.
129. Discovery of novel bacterial elongation condensing enzyme inhibitors by virtual screening / Z. Zheng [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2014. – Vol. 24. – P. 2585–2588.
130. Efficient utilization of inulin and glycerol as fermentation substrates in erythritol and citric acid production using *Yarrowia lipolytica* expressing inulinase / M. Rakicka [et al.] // *Chemical Papers*. – 2017. – Vol. 70, № 11. – P. 1452–1459.
131. Effect of inulin concentration on the production of inulo-oligosaccharides by soluble and immobilized endoinulinase / J.W. Yun [et al.] // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1997. – Vol. 84. – P. 365–368.
132. Efficient conversion of inulin to inulooligosaccharides through endoinulinase from *Aspergillus niger* / Y. Xu [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2016. – Vol. 64, № 12. – P. 2612–2618.
133. Efficient ethanol production from inulin by two-stage aerate strategy / J. Gao [et al.] // *Biomass. Bioenergy*. – 2015. – Vol. 80. – P. 10–16.
134. Elnashar M.M. Novel carrier of grafted alginate for covalent immobilization of inulinase / M.M. Elnashar, E.N. Danial, G.E. Awad // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2009. – Vol. 48. – P. 9781–9785.
135. Endo- and exo-inulinases: enzyme-substrate interaction and rational immobilization / A. Basso [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 2010. – Vol. 26, № 2. – P. 397–405.
136. Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production / M. He [et al.] // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 41. – P. 105–114.
137. Enhancement of 2,3-butanediol production from Jerusalem artichoke tuber extract by a recombinant *Bacillus* sp. strain BRC1 with increased inulinase



- activity / J.M. Park [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 44. – P. 1107–1113.
138. Ettalibi M. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases / M. Ettalibi, J.C. Baratti // Agric. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 54. – P. 61–68.
139. Ettalibi M. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum* / M. Ettalibi, J.C. Baratti // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1987. – Vol. 26. – P. 13–20.
140. Ettalibi M. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum* / M. Ettalibi, J.C. Baratti // Enzyme Microb Technol. – 2001. – Vol. 28. – P. 596–601.
141. Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens / Y. Oda [et al.] // Mutat. Res. – 1985. – Vol. 147. – P. 219–229.
142. Expression of an alpha-galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus* / R.J. Bergkamp [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1993. – Vol. 40. – P. 309–317.
143. Expression of an endoinulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 in *Escherichia coli* and its characterization / X.M. Chen [et al.] // Carb. Pol. – 2012. – Vol. 88. – P. 748–753.
144. Expression of recombinant exo-inulinase of *Kluyveromyces marxianus* IW9801 (CGMCC0360) in *Pichia pastoris* exi2086 / Wang J.H. [et al.] // Patent: China CN 02124145.7-B 12-MAY-2004, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China.
145. Fed-batch saccharification and ethanol fermentation of Jerusalem artichoke stalks by an inulinase producing *Saccharomyces cerevisiae* MK01 / M.M. Khatun [et al.] // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5. – P. 107112–107118.
146. Fermentation of inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from various habitats / W.J. Drent [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – Vol. 57, № 2. – P. 455–462.

147. Fermentative hydrogen production from Jerusalem artichoke by *Clostridium tyrobutyricum* expressing exo-inulinase gene / L. Jiang [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 7940.
148. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation / R. Fernandez-Lafuente // Enzyme Microb. Technol. – 2009. – Vol. 45. – P. 405–418.
149. First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity / J. Pouyez [et al.] // Biochimie. – 2012. – Vol. 94, № 11. – P. 2423–2430.
150. Flores A.C. Inulin potential for enzymatic obtaining of prebiotic oligosaccharides / A.C. Flores, J.A. Morlett, R. Rodriguez // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2016. – Vol. 56, № 11. – P. 1893–1902.
151. From inulin to fructose syrups using sol-gel immobilized inulinase / G.L. Santa [et al.] // Appl Biochem Biotechnol. – 2011. – Vol. 165, № 1. – P. 1–12.
152. Fructan 1-exohydrolases.  $\beta$ -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms // W. Van der Ende [et al.] // Plant Physiology. – 2003. – Vol. 131. – P. 621–631.
153. Fructose production by inulinase covalently immobilized on sepabeads in batch and fluidized bed bioreactor / E. Ricca [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2010. – Vol. 11. – P. 1180–1189.
154. Functional analysis of the binding model of microbial inulinases using docking and molecular dynamics simulation / P.K. Singh [et al.] // J. Mol. Model. – 2016. – Vol. 22. – P. 69.
155. Gene cloning, expression, and characterization of an exo-inulinase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 / J. Gao [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – Vol. 173. – P. 1419–1430.
156. Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289 / Y. Tsujimoto [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Vol. 62, № 2. – P. 180–185.

157. Genetic modification and optimization of endo-inulinase for the enzymatic production of oligofructose from inulin / J.K. Yang [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. – Vol. 134, Part A. – P. 225–232.
158. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 / H.J. Pel [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2007. – Vol. 25. – P. 221–231.
159. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* / N.D. Fedorova [et al.] // PLoS Genet.- 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 1000046.
160. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* / W.C. Nierman [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 438, № 7071. – P. 1151–1156.
161. Gill P.K. Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme) inulinase / P.K. Gill, R.K. Manhas, P. Singh // Bioresour. Technol. – 2006. – Vol. 97, № 2. – P. 355–358.
162. Gill P.K. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus* / P.K. Gill, R.K. Manhas, P. Singh // J. Food Engineer. – 2006. – Vol. 76. – P. 369–375.
163. Gill P.K. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus* / P.K. Gill, R.K. Manhas, P. Singh // Bioresource Technology. – 2006. – Vol. 97. – P. 894–902.
164. Goosen C. Identification and characterization of glycoside hydrolase family 32 enzymes from *Aspergillus niger* / C. Goosen – 2007. (<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/2007/c.goosen/>)
165. Growth, ethanol production, and inulinase activity on various inulin substrates by mutant *Kluyveromyces marxianus* strains NRRL Y-50798 and NRRL Y-50799 / L.A. Galindo-Leva [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 43. – P. 927–939.

166. Gunasekaran P. Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis* / P. Gunasekaran [et al.] // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172. – P. 6727–6735.
167. Guzik U. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties – Application to oxidoreductases / U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszynska // Molecules. – 2014. – Vol. 19. – P. 8995–9018.
168. Häckel M. Partial molar volumes of proteins: amino acid side-chain contributions derived from the partial molar volumes of some tripeptides over the temperature range 10-90 degrees C / M. Häckel, H.J. Hinz, G.R. Hedwig // Biophys Chem. – 1999. – Vol. 82, № 1. – P. 35–50.
169. Heavy oils (mainly alkanes) over-production from inulin by *Aureobasidium melanogenum* 9-1 and its transformant 88 carrying an inulinase gene / F.H. Xin [et al.] // Renewable Energy. – 2017. – Vol. 105. – P. 561–568.
170. Heikamp K. The future of virtual compound screening / K. Heikamp, J. Bajorath // Chemical Biology & Drug Design. – 2013. – Vol. 1. – P. 33–40.
171. Henson C.A. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages / C.A. Henson, D.P. Livingston // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 36. – P. 715–720.
172. High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase / S.F. Zhang [et al.] // Process Biochemistry. – 2012. – Vol. 47. – P. 151–155.
173. High-level secretory expression of *Aspergillus* exo-inulinase and its use in the preparation of fructose syrup from inulin / G.J. Chena [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. – Vol. 133, Supplement 1. – P. S543–S551.
174. Housseiny M.M. Production of an endoinulinase from *Aspergillus niger* AUMC 9375, by solid state fermentation of agricultural waste, with purification and characterization of the free and immobilized enzyme / M.M. Housseiny // J. Microbiol. – 2014. – Vol. 52. – P. 389–398.

175. Identification and determination of the inulin content in the roots of North east Brazilian species of *Pombalia calceolaria* L. / A.G.O. Pontes [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2016. – Vol. 149. – P. 391–398.
176. Identification of aldehyde dehydrogenase 1A1 modulators using virtual screening / V. Kotraiah [et al.] // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2013. – Vol. 28. – P. 489–494.
177. Immobilisation of endoinulinase on polyhydroxybutyrate microfibrils / M. Beran [et al.] // Czech. J. Food Sci. – 2016. – Vol. 34, № 6. – P. 541–546.
178. Immobilization and characterization of inulinase from *Ulocladium atrum* on nonwoven fabrics / T.M. Mohamed [et al.] // J Biosci. – 2014. – Vol. 39, № 5. – P. 785–794.
179. Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads / J. Missau [et al.] // Sustainable Chemical Processes. – 2014. – Vol. 2. – P. 13.
180. Immobilization of endo-inulinase on non-porous amino functionalized silica nanoparticles / M. Karimi [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2014. – Vol. 104. – P. 48–55.
181. Immobilization of endo-inulinase on poly-D-lysine coated CaCO<sub>3</sub> microparticles / M. Karimi [et al.] // Food Research International. – 2014. – Vol. 66. – P. 485–492.
182. Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis / R. Catana [et al.] // Food Chem. – 2005. – Vol. 91. – P. 517–520.
183. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* on octadecyl substituted nanoporous silica; Inulin hydrolysis in a continuous mode operation / M. Karimi [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2016. – Vol. 7. – P. 174–180.
184. Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads / A. Richetti [et al.] // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2012. – Vol. 35. – P. 383–388.
185. Immobilization of inulinase on concanavalin A-attached super macroporous cryogel for production of high-fructose syrup / C. Altunbas [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2013. – Vol. 170, № 8. – P. 1909–1921.

186. Immobilization of recombinant inulase II from a genetically modified *Escherichia coli* strain / D. Letca [et al.] // Roum. Biotechnol. Lett. – 2004. – Vol. 9, № 5. – P. 1879–1886.
187. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cell in barium alginate for inulin hydrolysis / E. Barranco-Flórido [et al.] // Process Biochemistry. – 2001. – Vol. 37, № 5. – P. 513–519.
188. Improved inulinase activity by *Penicillium purpurogenum* grown in microwave pretreated coffee spent by L16 orthogonal design of experiment / S. Muthuselvi [et al.] // Innovative Romanian Food Biotechnology. – 2012. – Vol. 11. – P. 44–50.
189. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C. Mateo [et al.] // Enzyme Microb. Technol. – 2007 – Vol. 40. – P. 1451–1463.
190. Insights into the catalytic properties of bamboo vacuolar invertase through mutational analysis of active site residues / T.H. Chen [et al.] // Phytochemistry. – 2009. – Vol. 70. – P. 25–31.
191. Insolubilization of inulinase on magnetite chitosan microparticles, an easily recoverable and reusable support / K.S. Paripoorani [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2015. – Vol. 113. – P. 47–55.
192. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase / X.Y. Liu [et al.] // Metab. Eng. – 2010. – Vol. 12. – P. 469–476.
193. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases / Z. Chi [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 82. – P. 211–220.
194. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases / Z.M. Chi [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 82. – P. 211–220.
195. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes / L. Gao [et al.] // Microb. Ecol. – 2007. – Vol. 54, № 4. – P. 722–729.

196. Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains with inulinase activity / J. Allais [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1987. – Vol. 53, № 5. – P. 942–945.
197. Isolation of a mutant of *Kluyveromyces* sp. Y-85 resistant to catabolite repression / W. Wei [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 1999. – Vol. 87. – P. 816–818.
198. Jafarizadeh-Malmiri H. Potential applications of chitosan nanoparticles as novel supports in enzyme immobilization / H. Jafarizadeh-Malmiri, M.A. Ghaz-Jahanian, A. Berenjian // Am. J. Biochem. Biotechnol. – 2012. – Vol. 8. – P. 203–219.
199. Jahnz U. Screening-automation auf basis hohlkugel verkapselter zellen und enzymatische bildung von difructoseanhydrid III aus inulin unter thermophilen bedingungen (screening, charakterisierung, immobilisierung): Dissertation Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. - 2001 ([http://rzbl04.biblio.etc.tu-bs.de:8080/docportal/servlets/MCRFileNodeServlet/DocPortal\\_derivate\\_00001267/Document.pdf;jsessionid=56B12F6D1A4996AD12211CBD2CBE2083](http://rzbl04.biblio.etc.tu-bs.de:8080/docportal/servlets/MCRFileNodeServlet/DocPortal_derivate_00001267/Document.pdf;jsessionid=56B12F6D1A4996AD12211CBD2CBE2083)).
200. Jain S.C. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract / S.C. Jain, P.C. Jain, N. Kango // Braz. J. Microbiol. – 2012. – Vol. 43, № 1. – P. 62–69.
201. Janecek S. Sterategies for obtaining stable enzymes / S Janecek // Process Biochem. – 1993. – Vol. 28. – P. 435–445.
202. Ji Y. Purification and properties of inulinases from *Aspergillus niger* M89 / Y. Ji, X. Zhao // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 1998. – Vol. 38, № 2. – P. 120–125.
203. Kalil S.J. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracelular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* / S.J. Kalil, F. Maugeri, M.I. Rodrigues // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40. – P. 581–586.

204. Kang S. Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. / S. Kang, S. Kim // *Biotechnology Letters*. – 1999. – Vol. 21, № 7. – P. 569–574.
205. Kang S.I. Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp.S37 / S.I. Kang, S.I. Kim – 1998. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAB63119.1> )
206. Kango N. Production and properties of microbial inulinases: recent advances / N. Kango, S.C. Jain // *Food Biotechnology*. – 2011. – Vol. 25. – P. 165–212.
207. Kawamura M. Purification and some properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis* / M. Kawamura, S. Takahashi, T. Uchiyama // *Agric. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 52. – P. 3209–3210.
208. Kharat S.J. Density, viscosity and ultrasonic velocity studies of aqueous solutions of sodium acetate at different temperatures / S.J. Kharat // *Journal of Molecular Liquids*. – 2008. – Vol. 140, № 1–3. – P. 10–14.
209. Kim B. Continuous production of fructose-syrups from inulin by immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // B. Kim, H. Kim, S. Nam // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* – 1997. – Vol. 2. – P. 90–93.
210. Kim B.-W. Nucleotide sequence of exo-inulinase from *Bacillus polymyxa* MGL21 / B.-W. Kim, D.-J. You, H.-J. Kwon – 2002. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAL82575.1> )
211. Kim C.H. Ethanol production Jerusalem artichoke by inulinase and *Zymomonas mobilis* / C. Kim, S. Rhee // *Appl. Biochem Biotechnol.* - 1990. - Vol. 23, № 2. - P. 171–180.
212. Kim C.H. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin / C.H. Kim, S.K. Rhee // *Biotechnology Letters*. – 1989. – Vol. 11, № 3. – P. 201–206.
213. Kim K.Y. Role of the N-terminal domain of endoinulinase from *Arthrobacter* sp. S37 in regulation of enzyme catalysis / K.Y. Kim, S. Rhee, S.I. Kim // *J. Biochem.* – 2005. – Vol. 138. – P. 27–33.
214. Kim S. Ethanol production using whole plant biomass of Jerusalem artichoke by *Kluyveromyces marxianus* CBS1555 / S. Kim, J.M. Park, C.H. Kim // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 169, № 5. – P. 1531–1545.



215. Kim W.Y. Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethylcellulose / W.Y Kim., M.S. Byun // *Enzyme Microb. Technol.* – 1982. – Vol. 4, №2. – P. 239–244.
216. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor / M.A. Mazutti [et al.] // *Food Chemistry.* – 2010. – Vol. 120, № 1. – P. 163–173.
217. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain / A. Cruz-Guerrero [et al.] // *Journal of Fermentation and Bioengineering.* – 1995. – Vol. 80, № 2. – P. 159–163.
218. Ku M.A. Effect of inulin on yeast inulinase production in sauerkraut brine / M.A. Ku, Y.D. Hang // *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* – 1994. – Vol. 10, № 3. – P. 354–355.
219. Kushi R.T. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* / R.T. Kushi, R. Monti, J. Contiero // *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 25. – P. 63–69.
220. Kwon Y.M. Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase / Y.M. Kwon, H.Y. Kim, Y.J. Choi // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 10, № 2. – P. 238–243.
221. Kwon Y.-M. DNA sequences and expression in *Escherichia coli* of an exoinulinase gene (*inu2*) from *Pseudomonas mucidolens* / Y.-M. Kwon, Y.-J. Choi – 1999. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAF44125.1> )
222. Laloux D. Purification and partial characterization of the inulinase of *Kluyveromyces fragilis* / D. Laoux, J. Delcour, J. Vandehaute // *Arch. int. physiol. et biochim.* – 1989. – Vol. 97, № 6. - P. 161–165.
223. Laowklom N. Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated *Streptomyces* sp. CP01 / N. Laowklom, R. Chantanaphan, P. Pinphanichakarn // *Natural Resources.* – 2012. – Vol. 3. – P. 137–144.
224. Lei Z. Chitosan-tethered the silica particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization / Z. Lei, S. Bi, H. Yang // *Food Chem.* – 2007. – Vol. 104. – P. 577–584.

225. Letca D. Production of di-D-Fructofuranose 1,2':2,3' Dianhydride (DFA III) using Recombinant Inulase II: dissertation / D. Letca. – Bukarest, 2004. – 175 p. – ([http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=970064837&dok\\_var=d1&dok\\_ext=pdf&filename=970064837.pdf](http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=970064837&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=970064837.pdf))
226. Liese A. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications / A. Liese, L. Hilterhaus // Chemical Society Reviews. – 2013. – Vol. 42. – P. 6236–6249.
227. Marx S.P. Hydrolysis of fructan in grasses: a  $\beta$ -(2,6)-linkage specific fructan- $\beta$ -fructosidase from stubble of *Lolium perenne* / S.P. Marx, J. Nosberger, M. Frehner // New Phytol. – 1997. – Vol. 135. – P. 279–290.
228. Marx S.P. Seasonal variation of fructan- $\beta$ -fructosidase (FEH) activity and characterization of a  $\beta$ -(2,1)-linkage specific FEH / S.P. Marx, J. Nosberger, M. Frehner // New Phytol. – 1997. – Vol. 135. – P. 267–277.
229. Meng G. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase / G. Meng, K. Futterer // Nature Struct. Biol. – 2003. – Vol. 10. – P. 935–941.
230. Micro-scale procedure for enzyme immobilization screening and operational stability assays / L. Fernandez-Arrojo [et al.] // Biotechnology Letters. – 2015. – Vol. 37, № 8. – P. 1593–1600.
231. Min K. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application / K. Min, Y.J. Yoo // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2014. – Vol. 19. – P. 553–567.
232. Modeling of exo-inulinase biosynthesis by *Kluyveromyces marxianus* in fed-batch mode: correlating production kinetics and metabolic heat fluxes / L. Santharam [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 101. – P. 1877–1887.
233. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization / R.C. Rodrigues [et al.] // Chem. Soc. Rev. – 2013. – Vol. 45. – P. 6290–6307.
234. Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris* / S. Moriyama [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2003. – Vol. 96. – P. 324–331.

235. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and gene encoding endo-inulinase from *Penicillium purpurogenum* / S. Onodera [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1996. – Vol. 60, № 11. – P. 1780–1785.
236. Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88 / H. Akimoto [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000 – Vol. 64, № 11. – P. 2328–2335.
237. Molecular cloning and sequence analysis of an inulinase gene from an *Aspergillus* sp. / S. Raba'atun Adawiyah [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 27. – P. 2173–2185.
238. Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger* / K. Ohta [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1998 – Vol. 62, № 9. – P. 1731–1738.
239. Mutanda T. Controlled production of fructose by an exoinulinase from *Aspergillus ficuum* / T. Mutanda, B. Wilhelmi, C.G. Whiteley // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 159, № 1. – P. 65–77.
240. Nakamura T. Culture conditions for inulase production by *Aspergillus* (P III) / T. Nakamura, S. Hoashi, S. Nakatsu // Nippon Nogeikagaku Kaishi. – 1978. – Vol. 52. – P. 105–110.
241. Nakamura T. General properties of extracellular inulase from *Penicillium* (P II) // T. Nakamura, S. Nakatsu // J. Agr. Chem. Soc. Jap. – 1977. – Vol. 51, № 12. – P. 681–689.
242. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends / E.P. Cipolatti [et al.] // RSC Advances. – 2016. – Vol. 6. – P. 104675–104692.
243. Naumoff D.G. Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional  $\beta$ -xylosidases and  $\alpha$ -L-arabinases / D.G. Naumoff // FEBS Letters. – 1999. – Vol. 448. – P. 177–179.
244. Nesterenko M.V. A simple modification of Blums silver stain method allows for 30 minute detection of protein in polyacrilamide gel / M.V. Nesterenko, M. Tilley, S.J. Upton // J. Biochem. Biol. – 1994. – Vol. 28. – P. 239.

245. Norman J.M. Characterization of *levJ*, a sucrose/fructanase-encoding gene from *Actinomyces naeslundii* T14V, and comparison of its products with other sucrose-cleaving enzymes / J.M. Norman, K.L. Bunny, P.M. Giffard // *Gene*. – 1995. – Vol. 152. – P. 93–98.
246. Nylund L. Mutagenicity testing of protein-containing and biological samples using the Ames/Salmonella plate / L. Nylund, P. Einisto // *Mutat. Res.* – 1993. – Vol. 298. – P. 237–246.
247. Ongen-Baysal G. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger* / G. Ongen-Baysal, S. Suha Sukan, N. Vassilev // *Biotechnology Letters*. – 1994. – Vol. 16, № 3. – P. 275–280.
248. Onodera S. Purification and substrate specificity of endo-type inulinases from *Penicillium purpurogenum* / S. Onodera, N. Shiomi // *Agric. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 52. – P. 2569–2576.
249. Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus* / D. Vranesic [et al.] // *Food Technol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 67–73.
250. Optimizing promoters and secretory signal sequences for producing ethanol from inulin by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *Kluyveromyces marxianus* inulinase / S.J. Hong [et al.] // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2015. – Vol. 38. – P. 263–272.
251. Overexpression of the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. S37 in *Yarrowia lipolytica* and characterization of the recombinant endo-inulinase / Y. Li [et al.] // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2012. – Vol. 74. – P. 109–115.
252. *Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase / S. Mansouri [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2013. – Vol. 103. – P. 1343–1157.
253. Permyakov S.E. Differential scanning microcalorimetry of intrinsically disordered proteins / S.E. Permyakov // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 896. – P. 283–296.

254. Pessoa A. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction / A. Pessoa, M. Vitolo // Braz. J. Chem. Eng. – 1999. – Vol. 16. – P. 237–245.
255. Pessoa A. Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction, / A. Pessoa, M. Vitolo // Biotechnology Techniques. – 1997. – Vol. 11, № 6. – C. 421–422.
256. Pessoni R.A. Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) / R.A. Pessoni, R.C. Figueiredo-Ribeiro, M.R. Braga // J. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 87, № 1. – P. 141–147.
257. Pessoni R.A. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources / R.A. Pessoni, M.R. Braga, R.C. Figueiredo-Ribeiro // Mycologia. – 2007. – Vol. 99, № 4. – P. 493–503.
258. Polgar T. Integration of virtual and high throughput screening in lead discovery settings / T. Polgar, G.M. Keseru // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2011. – Vol. 14. – P. 889–897.
259. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance / C. Garcia-Galan [et al.] // Adv. Synth.Catal. – 2011. – Vol. 353. – P. 2885–2904.
260. Prediction of a common  $\beta$ -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity / T. Pons [et al.] // Protein Sci. – 2000. – Vol. 9. – P. 2285–2291.
261. Process for producing the potential food ingredient DFA III from inulin: screening, genetic engineering, fermentation and immobilisation of inulase II / U. Jahnz [et al.] // Int. J. Pharm. – 2003. – Vol. 256, № 1. – P. 199–206.
262. Production and localization of  $\beta$ -fructosidase in asynchronous and synchronous chemostat cultures of yeasts / R J Rouwenhorst [et al.] // Appl. Environ. Microboil. – 1990. – Vol. 57, № 2. – P. 557–562.
263. Production and properties of a bacterial thermostable exo-inulinase / K. Uzunova [et al.] // Z. Naturforsch. – 2001. – Vol. 56, № 11. – P. 1022–1028.

264. Production of copper and cobalt aluminate spinels and their application as supports for inulinase immobilization / E.R. Abaide [et al.] // *Materials Research*. – 2015. – Vol. 18. – P. 1062–1069.
265. Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii* / S. Sirisansaneeyakul [et al.] // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 23. – P. 543–552.
266. Production of inulin fructotransferase (depolymerising) by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFAIII from inulin by the enzyme / A. Yokota [et al.] // *Journal of fermentation and bioengineering*. – 1991. – Vol. 72, № 4. – P. 258–261.
267. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations / Mazutti M. [et al.] // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2007. – V. 30, № 5. – P. 297–304.
268. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 / R J Rouwenhorst [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – Vol. 54, № 5 – P. 1131–1137.
269. Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis* / A.K. Gupta [et al.] // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* – 1994. – Vol. 59, № 4. – P. 377–385.
270. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose / T. Nakamura [et al.] // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1997. – Vol. 84, № 4. – P. 313–318.
271. Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum* / A.K. Gupta [et al.] // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 47, № 3. – P. 245–257.
272. Properties of the inulinase gene levH1 of *Lactobacillus casei* IAM 1045; cloning, mutational and biochemical characterization / S. Kuzuwa [et al.] // *Gene*. – 2012. – Vol. 495. – P. 154–162.
273. Protein measurement with folin-phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265– 275.

274. Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus* L.) / W. Van den Ende [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1996. – Vol. 98. – P. 455–466.
275. Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp.nov.KRF1T / B. Yuan [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2012. – Vol. 96. – P. 1517–1526.
276. Purification and characterization of an exoinulinase from *Aspergillus fumigatus* / P.K. Gill [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 2004. – Vol. 117, № 1. – P. 19–32.
277. Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase / T.B. Uhm [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1999. – Vol. 63, № 1. – P. 146–151.
278. Purification and characterization of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 / H. Chen [et al.] // *Food Chem.* – 2009. – Vol. 115. – P. 1206–1212.
279. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase / J. Sheng [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 144. – P. 111–121.
280. Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus* L. / J. De Roover [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1999. – Vol. 106. – P. 28–34.
281. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. / S.I. Kang [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 1998. – Vol. 20. – P. 983–986.
282. Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene / S. Moriyama [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2002. – Vol. 66, № 9. – P. 1887–1896.
283. Purification and properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C11-1 / K. Haraguchi [et al.] // *Agric. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 52. – P. 291–292.
284. Purification and properties of inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85 / W. Wei [et al.] // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* – 1997. – Vol. 37, № 6. – P. 443–448.

285. Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* / T.B. Uhm [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – Vol. 926. – P. 119–126.
286. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori* / M. Arand [et al.] // Biochem. J. – 2002. – Vol. 362, № 1 – P. 131–135.
287. Quistgaard E.M. Sequence and structural analysis of the Asp-box motif and Asp-box  $\beta$ -propellers; a widespread propeller-type characteristic of the Vps10 domain family and several glycoside hydrolase families / E.M. Quistgaard, S.S. Thirup // BMC Structural Biology. – 2009. – (<http://www.biomedcentral.com/1472-6807/9/46>)
288. Rawat H.K. Production and properties of inulinase from *Penicillium* sp. NFCC 2768 grown on inulin-rich vegetal infusions / H.K. Rawat, S.C. Jain, N. Kango // Biocatalysis and Biotransformation. – 2015b. – Vol. 33, № 1. – P. 61–68.
289. Rawat H.K. Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulinrich substrates and their use in generation of fructose and fructooligosaccharides / H.K. Rawat, M.A. Ganaie, N. Kango // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2015. – Vol. 107, № 3. – P. 799–811.
290. Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications / A. Pandey [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1999. – Vol. 81, № 1. – P. 35–52.
291. Rehm J. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus* / J. Rehm, L. Willmitzer, A.G. Heyer // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180. – P. 1305–1310.
292. Silva F.R. Adsorption of inulinases in ion-exchange columns / F.R. Silva, C.C. Santana // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2000. – Vol. 84. – P. 1063–1078.
293. Singh P. Production of inulinases: recent advances / P. Singh, P.K. Gill // Food Technology and Biotechnology. – 2006. – Vol. 44. – P. 151–162.
294. Singh P.K. Molecular modeling and docking of microbial inulinases towards perceptive enzyme–substrate interactions / P.K. Singh, P. Shukla // Indian J. Microbiol. – 2012. – Vol. 52. – P. 373–380.



295. Singh R.S. A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications / R.S. Singh K. Chauhana J.F.Kennedy // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 96. – P. 312–322.
296. Singh R.S. Inulinase production from a new inulinase producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4/ R.S. Singh, K. Chauhan // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2017. – Vol. 9. – P. 1–10.
297. Singh R.S. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup / R.S. Singh, R. Dhaliwal, M. Puri // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 17, № 5. – P. 733–738.
298. Singh R.S. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential / R.S. Singh, R.P. Singh // Food Technol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 48. – P. 435–450.
299. Singh R.S. Production of high fructose syrup from *Asparagus* inulin using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 / R.S. Singh, R. Dhaliwal, M. Puri // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 34, № 10. – P. 649–655.
300. Singh R.S. Response surface optimization of endoinulinase production from a cost effective substrate by *Bacillus safensis* AS-08 for hydrolysis of inulin / R.S. Singh, R.P. Singh // Biocatal. Agric. Biotechnol. – 2014. – Vol. 3. – P. 365–372.
301. Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis / L.M. Gao [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 77. – P. 825–832.
302. Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis / R. Catana [et al.] // Food Chem. – 2007. – Vol. 101. – P. 260–266.
303. Statistic analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding / A.J. Petrescu [et al.] // Glycobiology. – 2004. – Vol. 14. – P. 103–114.

304. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts / O. Barbosa [et al.] // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – Vol. 33. – P. 435–456.
305. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes* / L.I. Trubitsina [et al.] // *Biochimie.* – 2015. – Vol. 112. – P. 152–159.
306. Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding / M. Alvaro-Benito [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 13930–13941.
307. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications / W. Lammens [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2009. – Vol. 60. – P. 727–740.
308. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 / R.J. Rouwenhorst [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56, № 11. – P. 3337–3345.
309. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* / F.C. de Paula [et al.] // *Food Chem.* – 2008. – Vol. 111. – P. 691–695.
310. Sumat C.J. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract / C.J. Sumat, P.C. Jain, N. Kango // *Braz. J. Microbiol.* – 2012. – Vol. 43. – P. 1517.
311. Synthesis of fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* commercial inulinase immobilized in montmorillonite pretreated in pressurized propane and LPG / G. de Oliveira Kuhn [et al.] // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2013. – Vol. 169, № 3. – P. 750–760.
312. Taussig R. Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase / R. Taussig, M. Carlson // *Nucleic Acids Res.* – 1983. – Vol. 11. – P. 1943–1954.
313. Technical viability of the production, partial purification and characterisation of inulinase using pretreated agroindustrial residues / H. Treichel [et al.] // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2009. – Vol. 32, № 4. – P. 425–433.

314. The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports / J.M. Bolivar [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2009. – Vol. 44. – P. 139–144.
315. The importance of the non-active site and non-periodical structure located histidine residue respect to the structure and function of exo-inulinase / M.R. Arjomand [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2017. – Vol. 98. – P. 542–549.
316. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* L. during growth, storage and forcing / W. Van den Ende [et al.] // *New Phytol.* – 1996. – Vol. 132. – P. 555–563.
317. The polyacrylic acid/modified chitosan capsules with tunable release of small hydrophobic probe and drug / L.Ya. Zakharova [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* – 2015. – Vol. 471. – P. 93–100.
318. The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis / E. Ricca [et al.] // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 27, № 3. – P. 129–145.
319. The three-dimensional crystal structure of invertase ( $\beta$ -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases / F. Alberto [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 18903–18910.
320. The use of the *Kluyveromyces marxianus* inulinase gene promoter for protein production / J.W. Chapman [et al.] // Patent: WO 9413821-A1 23-JUN-1994, QUEST INT (NL) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA02437.1>)
321. Thermal inactivation, denaturation and aggregation of mitochondrial aspartate aminotransferase / N.V. Golub [et al.] // *Biophysical Chemistry.* – 2008. – Vol. 135. – P. 125–131.
322. Thermostable inulinases secreted by yeast and yeast-like strains from the Brazilian semiarid region / D.M. Lima [et al.] // *Int. J. Food Sci. Nutr.* – 2009. – Vol. 60. – P. 63–71.

323. Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing / N. Hu [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 95, № 5. – P. 1359–1368.
324. Three acidic residues are at the active site of a  $\beta$ -propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68 / T. Pons [et al.] // *Proteins.* – 2004. – Vol. 54. – P. 424–432.
325. Three-dimensional structure of *Saccharomyces invertase*: role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity / M.A. Sainz-Polo [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2013. – Vol. 288. – P. 9755–9766.
326. Towards the development of a membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis / E.G. Diaz [et al.] // *J. Membr. Sci.* – 2006. – Vol. 273, № 1-2. – P. 152–158.
327. Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology / J. Gao [et al.] // *Biotechnol. Biofuels.* – 2015. – Vol. 8. – P. 115.
328. Trends in inulinase production – a review/ K. Vijayaraghavan [et al.] // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 67–77.
329. Trott O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading / O. Trott, A.J. Olson // *Journal of Computational Chemistry.* – 2010. – Vol. 31. – P. 455–461.
330. Uchiyama T. Production and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II / T. Uchiyama, S. Niwa, K. Tanaka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol. 315. – P. 412–420.
331. Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 / N. Lertwattanasakul [et al.] // *AMB Express.* – 2011. – Vol. 1. – P. 20.

332. Utilization of inulin-containing waste in industrial fermentations to produce biofuels and bio-based chemicals / S.R. Hughes [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 33. – P. 78
333. Van den Ende W. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing / W. Van den Ende, A. Van Laere // J. Plant Physiol. – 1996. – Vol. 149. – P. 43–50.
334. Van den Ende W. In vitro synthesis of fructofuranosyl-only oligosaccharides from inulin and fructose by purified chicory root fructan: fructan fructosyl transferase / W. Van den Ende, J. De Roover, A. Van Laere // Physiol. Plant. – 1996. – Vol. 97. – P. 346–352.
335. Vandamme E.J. Microbial inulinase: fermentation process, properties and applications / E.J. Vandamme, D.G. Derycke // Adv. Appl. Microbiol. – 1983. – Vol. 29. – P. 139–176.
336. Virtual screening using molecular simulations / T. Yang [et al.] // Proteins. – 2011. – Vol. 79. – P. 1940–1951.
337. Vullo D.L. Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby) / D.L. Vullo, C.E. Coto, F. Sinerizz // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57, № 8. – P. 2392–2394.
338. Wang J.H. Cloning of endo-inulinase gene from *Aspergillus niger* ENDOINU 9891 and its expression in *Pichia methanolica* / J.H. Wang, D. Teng, Y. Yao. – 2002. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN64131.1>)
339. Wang Y.J., Zhang L.H., Ye S.H., Yuan X.D. // Food Science & Bioengineering – 2001 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAK43726.1>)
340. Wenling W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85 / W. Wenling, W.W.L. Huiying, W. Shiyuan. – Process Biochem. – 1999. – Vol. 34. – P. 643–646.
341. Wildman S.A. Approaches to virtual screening and screening library selection / S.A. Wildman // Current Pharmaceutical Design. – 2013. – Vol. 19. – P. 4787–4796.

342. Workman W.E. Enzymatic hydrolysis of inulin to fructose by glutaraldehyde fixed yeast cells / W.E. Workman, D.F. Day // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1984. – Vol. 28, № 8. – P. 905–910.
343. Workman W.E. Purification and properties of the  $\beta$ -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis* / W.E. Workman, D.F. Day // *FEBS Letters*. – 1983. – Vol. 160. – P. 16–20.
344. Xiao R. Purification and characteristics of two exo-inulinase from *Chrysosporium pannorum* / R. Xiao, M. Tanida, S. Takao // *J. Ferment. Technol.* – 1989. – Vol. 67. – P. 331–334.
345. X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from *Arabidopsis thaliana* / M. Verhaest [et al.] // *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* – 2006. – Vol. 62. – P. 1555–1563.
346. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus* / M. Verhaest [et al.] // *The Plant Journal*. – 2005. – Vol. 41. – P. 400–411.
347. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* / M.L. Cazetta [et al.] // *Journal of Food Engineering*. – 2005. – Vol. 66. – P. 301–305.
348. Yedahalli S.S. Expression of exo-inulinase gene from *Aspergillus niger* 12 in *E. coli* strain Rosetta-Gami B(DE3) and its characterization / S.S. Yedahalli, L. Rehmann, A. Bassi // *Biotechnol. Prog.* – 2016. – Vol. 32, № 3. – P. 629–637.
349. Yewale T. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis / T. Yewale, R.S. Singhal, A.A. Vaidya // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 2. – P. 96–101.
350. Yokota A. Purification and properties of an inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. H65-7 / A. Yokota, K. Enomoto, F. Tomita // *Journal of fermentation and bioengineering*. – 1991. – Vol. 72, № 4. – P. 262–265.

351. Zittan L. Enzymatic hydrolysis of inulin – an alternative way to fructose production / L. Zittan // *Starche*. – 1981. – Vol. 33, № 11. – P. 373–377.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Профессору кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, д.б.н. Т.А. Ковалевой за инициирование, ценные консультации в области работы с иммобилизованными ферментными системами.

Заведующей кафедрой биохимии и биотехнологии ВГУИТ, проф., д.б.н. О.С. Корнеевой и сотрудникам кафедры за любезно предоставленный штамм дрожжей *Kluuveromyces marxianus* Y-303.

Заведующему кафедрой аналитической химии ВГУ, проф., д.х.н., В.Ф. Селеменеву и сотрудникам кафедры за любезно предоставленные ионообменные смолы и волокна.

Заведующему лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем Института биофизики клетки РАН, к.ф-м.н., М.С. Кондратьеву за проведение работ, связанных с молекулярным докингем.

Доценту кафедры генетики ИФМиБ КФУ, к.б.н., А.Р. Каюмову за проведение исследований цито- и генотоксичности гомогенных и гетерогенных препаратов инулиназы.

Старшему научному сотруднику совместной лаборатории «Физики наногетероструктур и полупроводниковых материалов», д.ф-м.н. П.В. Середину и доценту кафедры физики твердого тела и наноструктур ВГУ, ведущему инженеру ЦКПНО ВГУ, к.ф-м.н. А.Н. Лукину за регистрацию ИК-спектров инулиназы.

Ведущему инженеру Центра коллективного пользования научным оборудованием ВГУ М.В. Гречкиной за получение и анализ АСМ-изображений инулиназы.

Заведующему кафедрой «Физика» СевГУ, проф., д.ф.-м.н., М.П. Евстигнееву за помощь в разработке математической модели процесса гидролиза инулина ферментным препаратом инулиназы.