

На правах рукописи

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized Cyrillic letters followed by a horizontal line.

Холявка Марина Геннадьевна

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

03.01.02. – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Воронеж – 2018

Работа выполнена на кафедре биофизики и биотехнологии в Воронежском государственном университете

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Артюхов Валерий Григорьевич

Официальные оппоненты: **Ефременко Елена Николаевна**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
химический факультет, кафедра химической энзимологии, профессор

Зуев Юрий Федорович
доктор химических наук, профессор, ФГБУН
Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра Российской академии наук, лаборатория биофизической химии наносистем, заведующий

Леонтьевский Алексей Аркадьевич
доктор биологических наук, ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, лаборатория микробной энзимологии, заведующий

Ведущая организация: ФИЦ «Фундаментальные биотехнологии» РАН (г. Москва)

Защита состоится 26 июня 2018 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018 Воронеж, Университетская пл., д. 1, медико-биологический факультет, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан

«___» _____ 2018 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (лизозим), 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 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 5×10^{-4} М), действии УФ-облучения в дозах 151-6040 Дж/м², 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 – 14, 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 энзим на 70-80 % диссоциирован на субъединицы. В диапазоне концентраций 5×10^{-6} – 5×10^{-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 рН, температуры, концентрации субстрата).

3. Изучена роль следующих процессов в проявлении функциональной активности инулиназы: а) формирование димеров с измененной пространственной структурой (при 45 и 55 °С / значениях рН 4,5, 5,0-6,5 / УФ-облучении в дозах до 453 Дж/м² для дрожжевой и растительной инулиназы и до 4530 Дж/м² для грибного энзима), 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/м²), 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),

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.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе дана характеристика структурно-функциональных свойств инулиназ из различных продуцентов, обсуждается механизм гидролиза инулиназами полифруктанов.

Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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, а также коммерческий препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия).

В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP biomedical. В качестве носителей для иммобилизации фермента применяли ионообменные смолы: АВ-17-2П (с активными группами $-N^+(CH_3)_3$), КУ-2 (с активными группами $-SO_3H$), КУ-2-8, КУ-2-8чС, АВ-16-ГС, АМ 21А, ЭДЭ-10П, АН-12П, ИМАС-НР111, PUROLITE A100 и ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90, а также хитозан.

2.2. Методы исследования

Каталитическую активность инулиназы измеряли спектрофотометрически резорциновым методом. Содержание белка в пробах определяли методом Лоури. Подготовку к работе ионообменных

смола и волокон и сорбционную иммобилизацию осуществляли по стандартным методикам (А.Ф. Жуков и др., 2001; Полянский Н.Г., 1976).

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. Визуализацию молекул инулиназы осуществляли методом атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO. Регистрацию ИК-спектров неориентированных порошкообразных образцов проводили с помощью спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия).

Размеры инулиназы и ее субъединиц в экспериментах по исследованию закономерностей образования надмолекулярных комплексов и влиянию УФ-облучения на указанные объекты 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°C . Концентрация белка составляла 1,0-1,5 мг/мл в 0,1 М ацетатном буфере с pH 4,7. Образец предварительно пропускали через фильтр Millipore с диаметром пор 0,45 мкм.

Подготовка структур инулиназ для молекулярного докинга выполнялась по стандартной для Autodock Vina схеме: из входного файла PDB были удалены координаты атомов молекул растворителя, буфера и лигандов. 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.

Аппроксимацию экспериментальных данных к теоретическим кривым мы осуществляли, используя различные сочетания модель:метод. Типы применяемых нами моделей: 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. Типы выбранных нами методов: CG – метод сопряженных градиентов (ConjugateGradient); PA – метод главных осей (PrincipalAxis); LM – алгоритм Левенберга-Марквардта (LevenbergMarquardt); N – метод Ньютона (Newton); QN – семейство квазиньютоновских методов (QuasiNewton); NM – семейство методов глобальной минимизации (NMinimize); IP – метод внутренних точек (InteriorPoint).

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 изучения надмолекулярной организации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 и получения доказательства предположения о существовании ее в дрожжевой клетке в форме димера нами был разработан комплексный подход, заключающийся в сочетании атомно-силовой микроскопии с методами инфракрасной спектроскопии, гель-хроматографии и электрофореза. Аналогичные серии экспериментов 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.

Размеры и молекулярные массы инулиназ различного происхождения представлены в табл. 1. 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.

На объемном изображении поверхности молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, полученном с помощью атомно-силовой микроскопии, отчетливо видно, что данный белок имеет димерную структуру (рис. 1). Инулиназа из *Aspergillus niger* также является гетеродимером (рис. 2). Инулиназа I из *Helianthus tuberosus* образует димеры (причем на изображении встречаются в равной степени как димеры, так и мономеры) (рис. 3), а инулиназы II и III существуют в мономерной форме.

Из табл. 2 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. Можно с высокой степенью вероятности предположить, что процессы ассоциации-диссоциации инулиназы и родственных ей ферментов играют важную роль в регуляции метаболизма растений и микроорганизмов, использующих в качестве запасных питательных веществ инулин, различные фруктаны и фруктоолигосахариды.

Таблица 1

Размеры (нм) и молекулярная масса (кДа) инулиназ

Продуцент	Нативная молекула			Субъединица					
	R, нм*	нм**	кДа	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	1,0±0,1	2,9±0,3	8±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	1,7±0,4	2,2±0,1	37±4
<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	1,0±0,2	1,8±0,1	22±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						

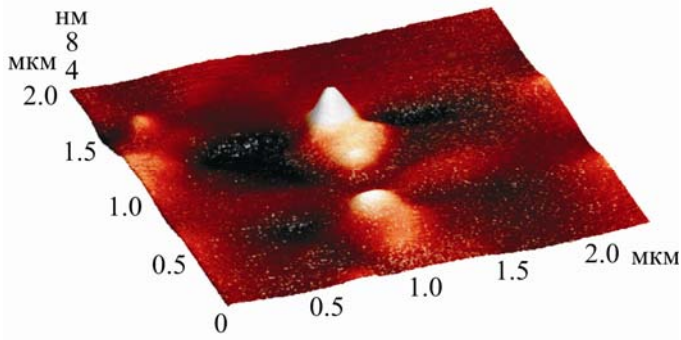
* Радиус молекулы, определенный методом динамического светорассеяния на приборе Photocor complex (ООО «Фотокор», Россия); ** высота молекулы, определенная методом атомно-силовой микроскопии на приборе SOLVER R47PRO («НТ-МДТ», Россия)

11

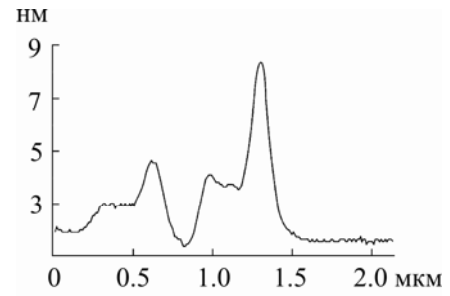
Таблица 2

Активность инулиназы и ее субъединиц

Продуцент	Нативная молекула		Субъединица			
	Молекулярная масса, кДа	Удельная активность, ед/мг	№ 1		№ 2	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	63±2	22,1±3,2	Молекулярная масса, кДа	Удельная активность, ед/мг	Молекулярная масса, кДа	Удельная активность, ед/мг
<i>Aspergillus niger</i>	102±4	34,7±2,7	55±3	20,2±3,8	8±3	15,8±3,5
<i>Helianthus tuberosus</i> Инулиназа I	65±3	19,5±3,9	62±3	29,8±4,1	37±4	25,2±5,4
			46±3	17,4±5,7	22±3	13,9±4,2

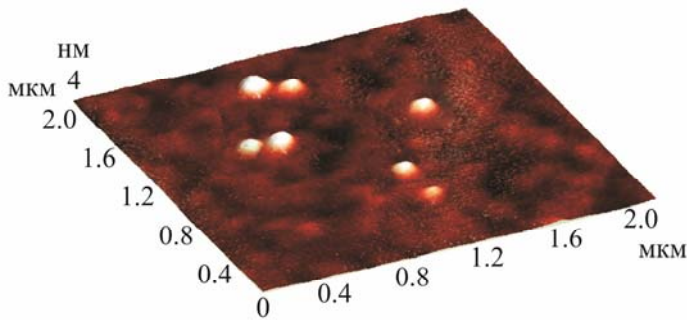


А

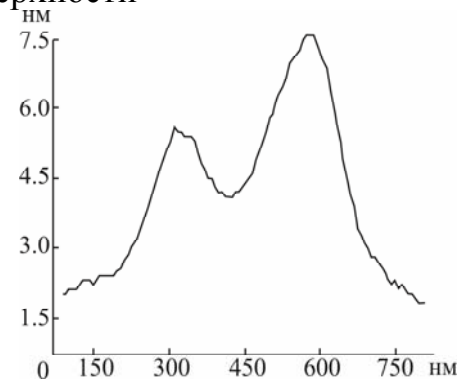


Б

Рис. 1. Изображение поверхности молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 (размер кадра 2,2×2,2 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

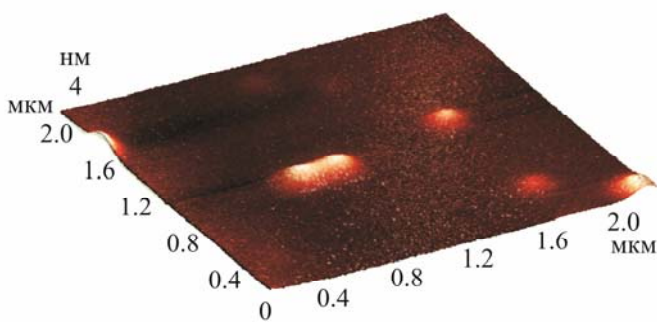


А

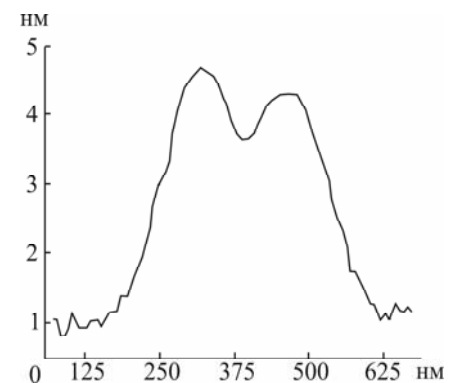


Б

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



А



Б

Рис. 3. Изображение поверхности молекулы инулиназы I из *Helianthus tuberosus* (размер кадра 2×2 мкм): А – трехмерное изображение, Б – сечение рельефа поверхности

3.2. Исследование закономерностей образования надмолекулярных комплексов инулиназой из *Kluveromyces marxianus*

Методом динамического светорассеяния были получены значения радиусов частиц, находящихся в растворах инулиназы из *Kluveromyces marxianus* в диапазоне концентраций 10^{-7} – 5×10^{-4} моль/л. С помощью кластерного анализа эти значения были разделены на 8 групп: 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 (9,2-21,5 нм), пятая (23,7-48,7 нм) и последующие – более крупным агрегатам.

Процентное содержание частиц 1 группы в растворе увеличивается от 5,2 % при 5×10^{-4} моль/л до порядка 70 % при 1×10^{-7} моль/л. Содержание частиц 2 группы наиболее высоко при концентрациях фермента 1×10^{-6} и 5×10^{-7} моль/л: ~ 66 и 81 % соответственно. Количество димеров фермента, варьирует от 37 до 78 % в диапазоне концентраций 5×10^{-6} – 5×10^{-4} моль/л, при этом число тетрамерных форм не превышает 39 %. В диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-6} моль/л димерные и тетрамерные формы не были зарегистрированы.

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 5×10^{-6} – 5×10^{-4} моль/л преобладают димерные (максимум до ~80 %) и тетрамерные формы фермента (максимум до ~40 %).

Глава 4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНУЛИНАЗ

На рис. 4, 5 отражены предлагаемые нами схемы отдельных этапов ответной реакции инулиназ из *Kluveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* на воздействие различных температур. При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении температуры (50 и 48 °С соответственно) молекулы энзима 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 °С 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 °С для растительной инулиназы и при 70, 64 и 62 °С – для дрожжевой.

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 %	
50	Оптимум	100 %	↑ Преобладание димерной формы фермента ↓
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. 4. 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 % 54 % 75 % 92 % 96 %	Процессы ассоциации-диссоциации молекул фермента не зарегистрированы при концентрациях инулиназы 1, 5 и 10 мг/мл
48		100 %	
50 58 60	Снижение активности ↓	92 % 48 % 43 %	Интенсивная агрегация частиц: при концентрации инулиназы 10 мг/мл при концентрации инулиназы 5 мг/мл при концентрации инулиназы 1 мг/мл

Рис. 5. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы I из *Helianthus tuberosus* на температурные воздействия

На рис. 6 представлена схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluveromyces marxianus* на воздействие различных значений pH среды. При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении pH 4,7 молекулы энзима находятся преимущественно в димерной форме. При повышении или понижении pH относительно значения 4,7 происходит частичная или полная (pH 3,0 и pH 6,5 и выше) потеря функциональной способности инулиназы. При pH среды в диапазоне 5,0-6,5 единиц происходит модификация третичной структуры белка, которая при pH 13,0 приводит к обратимому формированию неактивных тетрамеров молекул фермента. При pH 4,5 мы регистрировали появление димеров с измененной пространственной структурой, сохраняющих более 80 % каталитической способности. При pH 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 pH 3,0 происходила практически полная (но обратимая) диссоциация молекулы инулиназы на субъединицы, которые не проявляли функциональной активности.

pH	Каталитическая активность		Процесс
	↑	↓	
13,0	Снижение активности ↑	0	Образование тетрамеров, которые после 30 мин инкубации постепенно диссоциируют
6,5		0	Модификация третичной структуры белка
6,0		~ 7 %	
5,0	~ 87 %		
4,7	Оптимум	100 %	Преобладание димерной формы фермента
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. 6. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluveromyces marxianus* на воздействие высоких и низких значений pH среды

На рис. 7 и 8 приведены схемы процессов ассоциации-диссоциации молекул инулиназ при различных условиях их термической и УФ-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	2 часа	1
	61	5 мин	5, 10
	63	20 мин	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. 7. Схема процессов ассоциации-диссоциации молекул инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* при различных условиях ее термической инактивации

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 ²	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 ²
755 Дж/м ²	Образование тетрамеров ↓	не происходит
4530 Дж/м ²	Снижение функциональной активности	6040 Дж/м ²

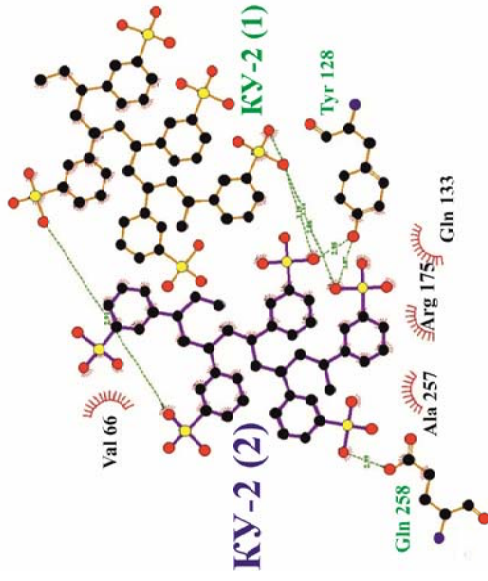
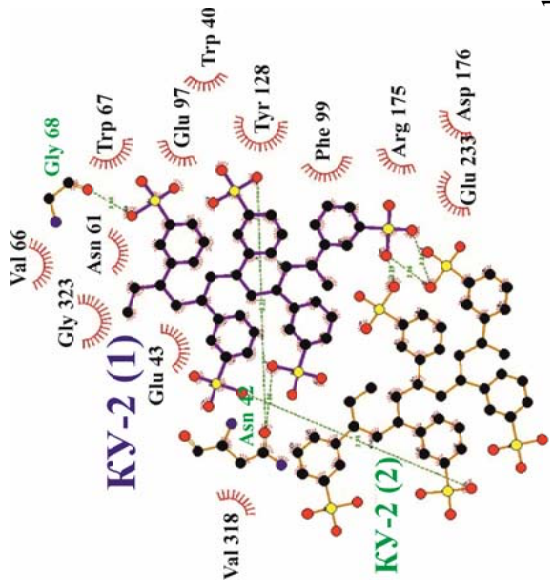
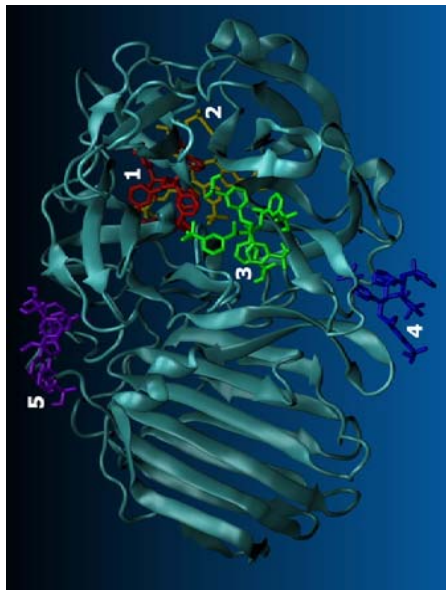
Рис. 8. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие УФ-облучения: роль процессов миграции возбужденных состояний, фотомодификации третичной структуры белка, образования димеров и тетрамеров в фотоинактивации фермента

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

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 (рис. 9) и ИК-спектроскопии. В табл. 3 приведены результаты сравнительного анализа сайтов связывания инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* с матрицами носителей различных типов.

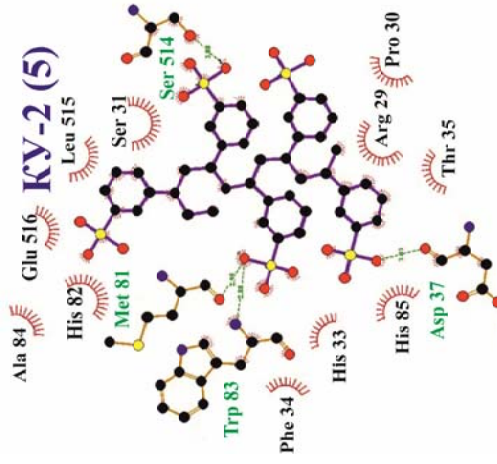
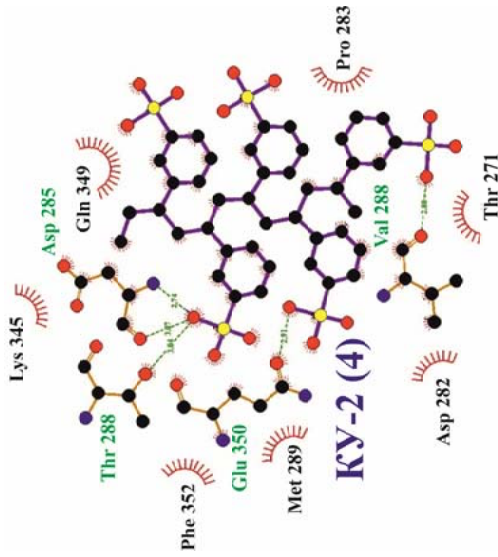
Обобщая полученные нами материалы, можно заключить, что при сорбции инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 и хитозана наблюдаются следующие сходства:

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 *Kluyveromyces marxianus* входят в состав контактных групп при их сорбции на носителях, которые существенно отличаются друг от друга по структуре и заряду.



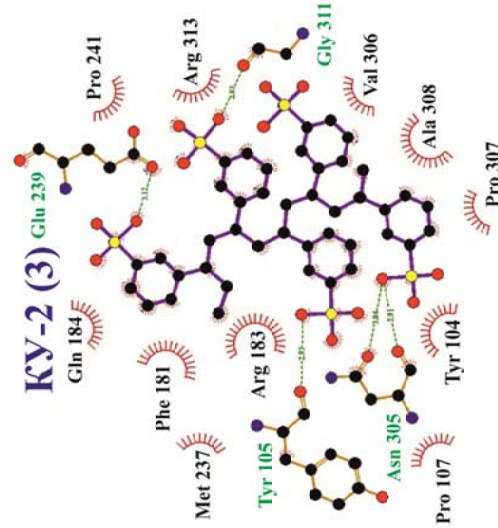
1

2



4

5



3

18

Рис. 9. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы из *Kluveromyces marxianus* и матрицей KY-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи), 1-5 – номера сайтов связывания фермента

Таблица 3

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

инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>
КУ-2, катионит, смола	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-7,3; -8,0; -7,8; -6,8; -6,2	-8,5; -8,8; -7,6; -7,9; -8,4
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
20/46	23/52
АВ-17-2П, анионит, смола	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-6,8; -7,1; -5,2; -5,2; -5,5	-8,0; -6,9; -6,4; -6,1; -6,2
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
0/81	0/68
ВИОН КН-1, катионит, волокно	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-5,8; -5,5; -5,9; -5,2; -5,6	-5,6; -6,0; -5,8; -5,6; -5,5
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
21/41	25/43
ВИОН АН-1, анионит, волокно	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-6,5; -6,4; -7,2; -5,3; -5,4	-7,8; -7,3; -7,4; -6,5; -5,5
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
8/64	5/76
Хитозан	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-7,0; -6,8; -6,3; -6,3; -7,7	-7,8; -6,5; -6,4; -6,5; -6,6
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
44/31	45/23
КОПАН-90, амфолит, волокно	
Аффинности связывания от первого до пятого сайтов взаимодействия, ккал/моль	
-5,9; -5,6; -5,8; -5,0; -5,2	-5,8; -5,8; -5,7; -6,0; -5,2
Количество водородных связей/ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
27/52	29/50

Однако 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 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 *Kluyveromyces 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 *Kluyveromyces 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).

При адсорбционной иммобилизации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на синтетических ионитах более 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. 10). Для препарата инулиназы, выделенного из *Helianthus tuberosus*, оптимальным оказался катионит КУ-2, сорбция на котором позволила сохранить 80,4 % первоначальной активности энзима.

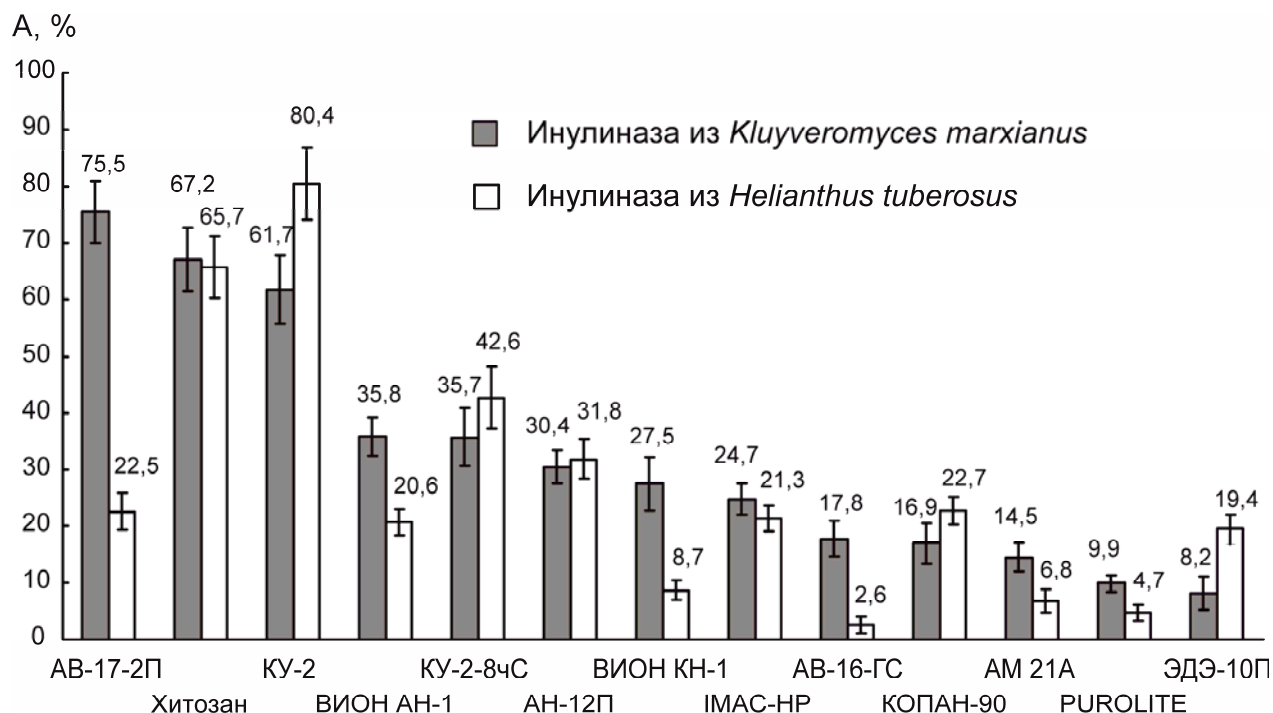


Рис. 10. Процент сохранения активности (А) иммобилизованной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

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

Оптимумы функционирования иммобилизованных дрожжевой и растительной инулиназы представлены в табл. 4.

Из полученных расчетов по аппроксимации зависимости каталитической активности инулиназы от концентрации субстрата $A(S)$ 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.

Таблица 4

Оптимумы функционирования препаратов инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

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

Для свободной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и фермента, 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 – $V_{max} = 0,30 \pm 0,04$, $pK_m = 3,49 \pm 0,69$, $pK_i = 3,62 \pm 0,80$ ($R^2 = 0,921$).

Для свободных и иммобилизованных инулиназ из *Helianthus tuberosus* лучшая аппроксимация экспериментальных данных наблюдается при использовании простой модели Михаэлиса (табл. 5).

В табл. 6, 7 представлены результаты аппроксимации экспериментально измеренных зависимостей активности $A(pH)$ и $A(t)$ дрожжевой и растительной инулиназы, свободных и иммобилизованных на нескольких носителях.

Таблица 5

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности $A(\lg S)$ инулиназы из *Helianthus tuberosus*

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/АВ-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/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/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

Таблица 6

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности $A(pH)$ инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*

Образец	a	pK_1	pK_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

Таблица 7

Параметры, полученные из аппроксимации экспериментально измеренной каталитической активности $A(t)$ инулина из

Kluveromyces marxianus и *Helianthus tuberosus*

Образец	E_a , кДж/моль	α	ΔH , кДж/моль	ΔS , кДж/(моль • К)	R^2	Модель: метод
Препараты дрожевой инулиназы						
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/АВ-17-2П	31,7 ± 6,4	11,0 ± 2,3	228,0 ± 56,0	0,655 ± 0,160	0,997	ul:QN
Инулиназа/АВ-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/АМ 21А	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:NМ
	49,8 ± 9,0	17,7 ± 3,4	153,0 ± 29,0	0,450 ± 0,082	0,993	ul:N
Препараты растительной инулиназы						
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:NМ
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:NМ
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:NМ
	90,2 ± 21,0	36,5 ± 8,2	204,0 ± 15,0	0,640 ± 0,045	0,991	ul:QN
Инулиназа/АВ-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:NМ

Установлено, что при облучении ($\lambda = 240-390$ нм) инулиназы, иммобилизованной на матрице пищевого и высокомолекулярного хитозанов, во всем диапазоне выбранных нами доз (от 151 до 6040 Дж/м²) не происходит статистически значимых изменений активности фермента по сравнению с необлученными образцами. При иммобилизации энзима на среднемoleкулярном хитозане варьирования значений активности препарата не происходит в интервале доз 151-3020 Дж/м², при дозах 4530 и 6040 Дж/м² каталитическая способность иммобилизованной инулиназы увеличивается, вероятно, за счет десорбции фермента в раствор с матрицы носителя.

Выявлено, что адсорбированная на ионообменных материалах ВИОН КН-1, АВ-16-ГС, АМ 21А инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* и иммобилизованная на матрицах КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П инулиназа из *Helianthus tuberosus* не снижают своей каталитической активности при 10-кратном использовании препарата в реакторе периодического действия и в течение года хранения. Кроме того, иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их для использования в качестве катализаторов для пищевой промышленности.

Нами была предложена модель (формула) учета кинетики реакции для иммобилизованной инулиназы в системах реакторов колоночного типа, позволяющая предсказать время полного гидролиза субстрата t_N :

$$t_N = N \frac{K_{mLI} + [L_N]}{k_{LI} [I_0]},$$

где в растворе присутствуют инулин в концентрации $[L_N]$ и степень полимеризации $N \gg 1$ и инулиназа в концентрации $[I_0]$, катализирующая гидролиз инулина; константа Михаэлиса для гидролиза инулина инулиназой 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).

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.

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.

Продемонстрировано, 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.

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-2-8чС 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 5×10^{-6} – 5×10^{-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 рН 4,7 молекулы энзима из *Kluyveromyces marxianus* находятся преимущественно в димерной форме. При рН 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^2 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 $4530\text{-}6040 \text{ Дж/м}^2$ 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 *Kluyveromyces 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 *Kluyveromyces 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 *Kluyveromyces 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 ($20\text{-}95 \text{ }^\circ\text{C}$), pH ($3,0\text{-}8,5$), концентрации инулина (до $1,2 \text{ мМ}$), 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 *Kluveromyces 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Перечень статей:

1. Ковалева Т.А. Исследование структурных особенностей инулиназ из различных продуцентов методом ИК-спектrophотометрии / Т.А. Ковалева, М.Г. Холявка // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – №1. – С. 3-7.
2. Ковалева Т.А. Характеристика инулиназ. Пути регулирования и стабилизации их активности / Т.А. Ковалева, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов // Биотехнология. – 2012. – № 1. – С. 43-63.
3. Анализ ферментативной активности и ИК-спектров инулиназы, иммобилизованной на анионообменной смоле АВ-17-2П / Т.А. Ковалева, М.Г. Холявка [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – № 11. – С. 39-42.
4. Создание гетерогенного ферментного препарата на основе иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus* / М.Г. Холявка [и др.] // Биотехнология. – 2012. – № 6. – С. 31-41.
5. Артюхов В.Г. Физико-химические и кинетические свойства инулиназ / В.Г. Артюхов, М.Г. Холявка, Т.А. Ковалева // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова – 2013. – № 2. – С. 67-77.
6. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности / М.Г. Холявка [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 7. – С. 29-36.
7. Холявка М.Г. Исследование структурной организации инулиназы из *Aspergillus awamori* ВКМФ 2250 / М.Г. Холявка, Т.А. Ковалева, В.Г. Артюхов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 7. – С. 37-41.
8. Разработка методики выделения и очистки инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* и анализ ее физико-химических и кинетических свойств / М.Г. Холявка [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 9. – С. 43-52.
9. Артюхов В.Г. Структурно-функциональные свойства инулиназ. Пути регулирования их активности / В.Г. Артюхов, М.Г. Холявка, Т.А. Ковалева // Биофизика. – 2013. – Т. 58, № 4. – С. 635-644.

10. Особенности структуры инулиназ различного происхождения / М.Г. Холявка [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – № 1. – С. 17-24.
11. Исследование механизма взаимодействия инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с матрицей ионообменных смол и волокна / М.Г. Холявка [и др.] // Биофизика. – 2014. – Т. 59. № 2. – С. 274-281.
12. Закономерности процесса термической инактивации инулиназ из *Helianthus tuberosus* / М.Г. Холявка [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 21-26.
13. Исследование режимов работы гетерогенного биокатализатора на основе иммобилизованной инулиназы в реакторе непрерывного действия для получения фруктозы из экстрактов инулинсодержащих растений / М.Г. Холявка [и др.] // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2014. – № 3. – С. 86-91.
14. Исследование закономерностей процесса термической инактивации иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus* / М.Г. Холявка [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т. 15, № 2. – С. 251-256.
15. Холявка М.Г. Исследование надмолекулярной организации инулиназ из продуцентов рода *Aspergillus* с помощью некоторых численных и экспериментальных методов / М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, С.М. Макин // Биофизика. – 2015. – Т. 60, № 4. – С. 639-645.
16. Исследование УФ-индуцированных изменений структурно-функциональных свойств инулиназ / М.Г. Холявка [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55, № 4. – С. 436-441.
17. Development of heterogeneous preparation with inulinase for tubular reactor systems / M.G. Holyavka [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. - Vol. 129 – P. 1-5.
18. *In silico* design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase / M.G. Holyavka [et al.] // Computers in biology and medicine. – 2016. – Vol. 71. – P. 198-204.
19. Holyavka M.G. Structural and functional properties of inulinases: a review / M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov, T.A. Kovaleva // Biocatalysis and Biotransformation. – 2016. – V. 34, № 1. – P. 1-17.
20. Реконструкция пространственной структуры инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* для поиска путей регулирования ее каталитической активности / А.В. Абдуллатыпов, М.С. Кондратьев, М.Г. Холявка [и др.] // Биофизика – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 669-676.
21. Холявка М.Г. Взаимодействие молекул инулиназы с матрицей хитозана, УФ-индуцированные изменения функциональных свойств иммобилизованной инулиназы / М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, П.В. Середин // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 6. – С. 1109–1117.
22. Mechanisms of the adsorption immobilization of inulinase on ion-exchangers AV-17-2P and KU-2 matrices / M.G. Holyavka [et al.] // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2017. – № 3. – С. 86-90.

23. Молекулярный механизм адсорбционной иммобилизации инулиназы на полимерных матрицах / М.Г. Холявка [и др.] // Биофизика. – 2017. – Т. 62, № 1. – С. 9-16.

24. Холявка М.Г. Экспресс-метод анализа вторичных структур инулиназ из различных продуцентов / М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, С.М. Макин // Биофизика. – 2018. – Т. 63. № 1. – С. 16-20.

Материалы конференций:

25. In silico design and virtual screening of inulinase immobilization ligands with highest affinity / M.S. Kondratyev, M.G. Kholiyavka [и др.] // Journal of biomolecular structure and dynamics. – 2015. – Vol. 33, Supplement. – P. 128-129.

26. Иммобилизованные на полимерных матрицах препараты инулиназ для пищевой промышленности / М.Г. Холявка [и др.] // Acta Naturae. – 2016. – Спецвыпуск. – Т. 2. – С. 214.

27. Development of biocatalysts on the basis of immobilized inulinase preparations / S. Olshannikova, M. Holyavka [и др.] // Journal of Biotechnology – 2017. – V. 256S. – P. S64-S65.

Монография:

28. Холявка М.Г. Инулиназы в условиях различного микроокружения: биофизические, кинетические и структурно-функциональные свойства / М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2018. – 288с. Глава в коллективной зарубежной монографии:

29. Holyavka M.G. Characteristics of microbial inulinases: physical and chemical bases of their activity regulation / M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov, T.A. Kovaleva // Edited by V.K. Gupta, G. D. Sharma, M.G. Tuohy, R. Gaur // The handbook of microbial bioresources. – 2016. – Chapter 22. – P. 361-368.

Работы № 1–27 входят в перечень ВАК или МБД: № 9–11, 15–21, 23–25, 27 – в базу данных Scopus, № 10, 17–19, 25, 27 – в Web of Science.