

УДК 577.325:577.151

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛЫ ИНУЛИНАЗЫ С МАТРИЦЕЙ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИОНИТОВ

¹Холявка М.Г., ¹Ковалева Т.А., ¹Артюхов В.Г., ¹Карпов С.И.,
¹Середин П.В., ²Богачев М.И.

¹ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»,
Воронеж, e-mail: holyavka@rambler.ru;

²ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», Санкт-Петербург

Установлено, что катиониты ВИОН КН-1, КУ-2, КУ-2-8чС, PUROLITE и аниониты ВИОН АН-1, ЭДЭ-10П, АВ-16-ГС, АВ-17-2П, АН-12П, АМ 21А, ИМАС-НР могут применяться в качестве носителей для иммобилизации инулиназы. Выявлено, что для препарата инулиназы, выделенного из *Helianthus tuberosus*, оптимальным оказался катионит КУ-2, сорбция на котором позволила сохранить около 80% первоначальной активности энзима. Показано, что адсорбция инулиназы на катионитах КУ-2 и КУ-2-8чС происходит преимущественно за счет электростатических связей положительно заряженных аминокислотных остатков фермента с сульфогруппой катионита, а также за счет образования водородных связей. Продемонстрировано, что связывание энзима с матрицами анионитов марок ЭДЭ-10П и АН-12П осуществляется в основном за счет электростатических связей отрицательно заряженных аминокислотных остатков инулиназы со вторичными и третичными аминогруппами носителей. Установлено, что при адсорбции инулиназы из *Helianthus tuberosus* на всех исследуемых ионитах происходит уменьшение количества нерегулярных участков в белковой глобуле, причем какой-либо корреляции между процентом сохранения активности иммобилизованного препарата по сравнению со свободным и структурными перестройками спиралей, слоев и неупорядоченных участков не наблюдается. Выдвинуто предположение о том, что механизмы взаимодействия инулиназы с матрицей катионитов и анионитов принципиально отличаются друг от друга: в процессе адсорбции принимают участие разные участки белковой глобулы, что обуславливает отличающиеся по своей природе конформационные перестройки в молекуле энзима.

Ключевые слова: инулиназа, иммобилизация, катиониты, аниониты, ИК-спектроскопия

THE RESEARCH OF INTERACTION MECHANISM FOR INULINASE MOLECULE WITH THE MATRIX OF SYNTHETIC IONITES

¹Holyavka M.G., ¹Kovaleva T.A., ¹Artyukhov V.G., ¹Karpov S.I.,
¹Seredin P.V., ²Bogachev M.I.

¹Voronezh State University, Voronezh, e-mail: holyavka@rambler.ru;

²St. Petersburg Electrotechnical University, St. Petersburg

It is established that the cationic exchangers VION KN-1, KU-2, KU-2-8chS, PUROLITE and anion exchangers VION AN-1, EDE-10P, AV-16-GS, AV-17-2P, AN-12P, AM 21A, IMAC-HP can be applied as carriers to inulinase immobilization. It is revealed that for the inulinase preparation from *Helianthus tuberosus* cationic exchanger KU-2 appeared optimal and sorption on it allowed for keeping of about 80% of initial enzyme activity. It is shown that inulinase adsorption on cationic exchangers KU-2 and KU-2-8chS occurs mainly due to electrostatic communications of positively charged amino acids of enzyme with sulfonate group of cationic exchanger as well as due to hydrogen communications formation. It is shown that enzyme linking with the anionic exchanger matrixes of EDE-10P and AN-12P is carried out generally by means of electrostatic communications of inulinase negatively charged amino acids with secondary and tertiary amino groups of carriers. It is confirmed that at the inulinase adsorption from *Helianthus tuberosus* for all studied ionites there is a reduction of quantity of irregular sites in protein, and thus no correlation between the activity preservation for the immobilized preparation and the free enzyme and restructurings of helixs, strands and irregular sites can be observed. It is assumed that the interaction mechanism for the inulinase with a matrix of cationic and anion exchangers essentially differ from each other: different sites of protein participate in the adsorption resulting in conformational reorganizations differing by the nature in an enzyme molecule.

Keywords: inulinase, immobilization, cationic exchangers, anion exchangers, IR-spectroscopy

Особое значение в настоящее время приобретают исследования процесса иммобилизации инулиназы (КФ 3.2.1.7), которая может применяться в производстве углеводов продуктов диетического назначения. Ферменты, связанные с носителями за счет химических или физических взаимодействий, имеют ряд существенных технологических преимуществ по сравнению с их растворимыми предшественниками:

1) иммобилизованные энзимы представляют собой гетерогенные катализаторы, которые легко отделить от реакционной среды, что позволяет остановить реакцию, использовать катализатор повторно, а также получить продукт, не загрязненный ферментом;

2) гетерогенные катализаторы позволяют проводить процесс непрерывно (например, в проточных реакторах) и регулиро-

вать скорость катализируемой реакции (или выход продукта) скоростью потока;

3) иммобилизация позволяет направленно изменять свойства фермента: его специфичность, особенно в отношении макромолекулярных субстратов; зависимость активности от pH среды; стабильность к денатурирующим воздействиям.

Большое внимание исследователи уделяют проблемам подбора и модификации носителей, разработке методов иммобилизации, изучению кинетических аспектов катализа гетерогенными ферментными препаратами. Актуальным вопросом является исследование механизма образования комплекса инулиназа-носитель.

Y. Makino et al. (2005) осуществили адсорбцию инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 на анионите Streamline DEAE [1].

A.K. Gupta et al. (1990) показали, что инулиназа из *Fusarium oxysporum*, включенная в полиакриламидный гель, сохраняет более 45% исходной активности при температуре 45°C и pH 6,2 (оптимумы нативного энзима соответственно 37°C и pH 6,0) [2].

S.J. Kalil et al. (2005) изучали адсорбцию инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на катионообменной смоле Streamline S.P., В.А. Абемян и Л.С. Манукян (1992) – на матрице полисахаридных носителей, которые изготавливали на основе крахмала, инулина, а также смеси этих полимеров с β -циклодекстрином. J. Allais et al. (1987) осуществили иммобилизацию инулиназы на хитине с помощью глутарового альдегида и получили биокатализатор для производства этанола из инулинсодержащего сырья [3–5].

Инулиназу из *Arthrobacter species* успешно сорбировали на анионообменных смолах. Аналогичную операцию провели для рекомбинантных белков из *Escherichia coli*/pMSiftOptR и *Escherichia coli*/pMSiftOptWT. При иммобилизации инулиназы из *Escherichia coli*/pMSiftOptR на Duolite A561, Duolite A568, Amberlite IRA67 и Amberlite IRA 94S выявлялся следующий процент сохранения активности: 4,5; 20,6; 1,7 и 19,8% соответственно. При сорбции фермента из *Escherichia coli*/pMSiftOptWT – 4,2; 19,3; 1,6 и 19,0% [6, 7].

Были попытки включить инулиназы из *Escherichia coli*/pMSiftOptRM и *Arthrobacter ureafaciens* ATCC 21124 в альгинатный гидрогель. F.R. Silva и C.C. Santana (2000) осуществили адсорбцию инулиназы (из препарата Fructozyme) в ионообменной колонке, используя два типа носителей – катионит и анионит. Иммобилизованная на желатине инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* var.

bulgaricus применялась для гидролиза сахарозы с целью получения фруктозных сиропов [8–10].

J. Manso et al. (2008) создали биосенсор на основе иммобилизованных фруктозодегидрогеназы и инулиназы на золотых наночастицах цистеина для определения содержания инулина в пище. Минимальная концентрация инулина, определяемая биосенсором – $6,6 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Сенсор проявлял высокую селективность по отношению к другим углеводам [11].

Изучение путей стабилизации инулиназы методом иммобилизации, а также выявление условий получения и применения гетерогенных биокатализаторов и биосенсоров на ее основе дадут возможность расширить наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов и усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы, так как реализация перспектив применения ферментов в различных областях науки и техники связана с получением именно иммобилизованных на нерастворимых носителях энзимов.

В связи с вышесказанным целью работы было исследование механизма взаимодействия молекулы инулиназы с матрицей ряда синтетических ионитов и выяснение типа связей между названными системами.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлась инулиназа, выделенная из клубней *Helianthus tuberosus* на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета. Методика выделения и очистки этого фермента, определения активности и содержания белка, подготовки носителей и иммобилизации инулиназы подробно описаны в [12].

К соединениям, применяемым в качестве носителей белков, предъявляются высокие требования: с одной стороны, молекула фермента должна находиться в комфортных условиях, не претерпевая при этом никаких структурно-функциональных изменений, с другой – она должна быть прикреплена к матрице необратимо. Иммобилизованные ферменты, используемые в пищевой и фармацевтической промышленности, кроме вышеперечисленных параметров, должны отвечать жестким санитарно-гигиеническим нормам. Поэтому в качестве носителей для иммобилизации инулиназы мы применяли катиониты ВИОН КН-1, КУ-2, КУ-2-8чС, PUROLITE и аниониты ВИОН АН-1, ЭДЭ-10П, АВ-16-ГС, АВ-17-2П, АН-12П, АМ 21А, ИМАС-НР. Необходимо отметить, что некоторые из них были отходами производства, проработавшими в условиях осветления сахара-рафинада, циклах очистки воды или при получении аминокислот, и не могли быть полностью регенерированы и далее использоваться в промышленной технологии.

Регистрацию ИК-спектров осуществляли с помощью спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия). Статистическая обработка полученных результатов проводилась при уровне значимости 5% с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследования
и их обсуждение**

Для создания гетерогенных ферментных препаратов промышленного назначения целесообразнее применять не гомогенные, а частично очищенные фракции, поэтому мы использовали инулиназу из *Helianthus tuberosus* со степенью очистки 14,0.

Каталитическая активность фермента определяется степенью мобильности белковой молекулы. Даже при небольших изменениях конформации полипептидной цепи у энзимов способность к катализу резко из-

меняется. Адсорбционное присоединение фермента к носителю приводит к ослаблению функциональных свойств катализатора по сравнению с нативным белком. Уменьшение активности иммобилизованных препаратов также может быть обусловлено экранированием доступа молекул субстрата к активному центру фермента.

Для препарата инулиназы, выделенного из *Helianthus tuberosus*, оптимальным оказался катионит КУ-2, сорбция на котором позволила сохранить около 80% первоначальной активности энзима (рис. 1).

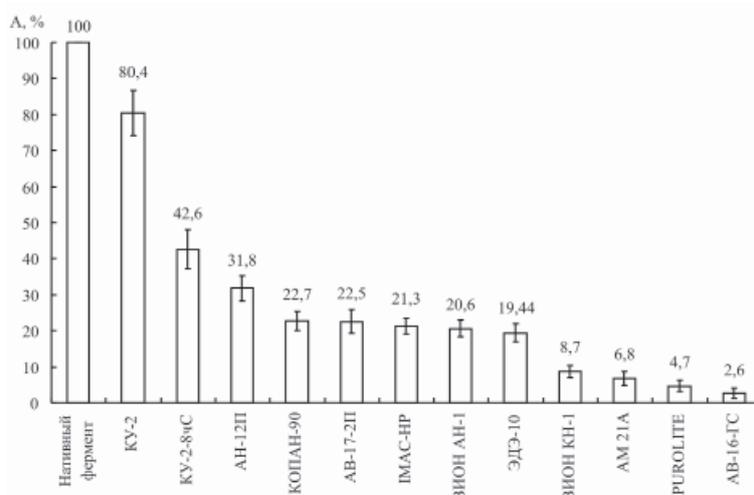


Рис. 1. Процент сохранения активности иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus*

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

Мы попытаемся выявить структурные перестройки, происходящие в ходе процесса адсорбции как в молекуле фермента, так и в матрице носителей. Для начала рассмотрим сульфостирольный катионит КУ-2, который относится к сульфокатионитам полимеризационного типа, получаемым сульфированием гранульного сополимера стирола с дивинилбензолом. Катионит имеет гелевую структуру, содержит только один вид функциональных групп – сульфогруппу $-SO_3H$. Очень интенсивным в спектре водородной формы катионита КУ-2 является поглощение в области $1250-1125\text{ см}^{-1}$, обусловленное валентными колебаниями функциональной группы $-SO_3H$ (рис. 2). Наблюдается и ряд других полос поглощения: $3500-3300\text{ см}^{-1}$ обусловлены валентными колебаниями группы $-OH$ в $-SO_3H$ и $-OH$ в H_2O ; $2930-2850\text{ см}^{-1}$ – асимме-

тричными и симметричными колебаниями групп $>CH-$ и $-CH_2-$; $1640-1615\text{ см}^{-1}$ – колебаниями бензольного кольца с различным типом замещения и деформационными колебаниями $-OH$ гидратной воды; $1605-1500\text{ см}^{-1}$ – валентными колебаниями связи $C=C$ бензольного кольца; $1460-1420\text{ см}^{-1}$ – деформационными колебаниями групп $>CH-$ и $-CH_2-$; $1350-1330\text{ см}^{-1}$ – валентными колебаниями $S=O$ в $-SO_3H$; $1220-1120$ и $1050-1000\text{ см}^{-1}$ – валентными колебаниями сульфогруппы; $907-900\text{ см}^{-1}$ – асимметричными колебаниями связи $S=O$ в $-SO_3H$; $830, 780\text{ см}^{-1}$ – внеплоскостными деформационными колебаниями CH дизамещенного бензольного кольца; $625, 570\text{ см}^{-1}$ – колебаниями $C-S$ сульфогруппы, связанной с бензольным кольцом (*n*- и *o*-замещение) [15].

Так как ряд полос поглощения ионита КУ-2 перекрывается с полосами поглощения препарата инулиназы из *Helianthus tuberosus*, то для того чтобы оценить изменения, происходящие в структуре носителя, мы анализировали не ИК-спектр ионита с иммобилизованным ферментом, а диф-

ференциальный спектр, полученный путем вычитания значений коэффициента поглощения α для инулиназы из значений α для

носителя с иммобилизованным на нем энзимом (рис. 3). Аналогичной обработке мы подвергли ИК-спектры других ионитов.

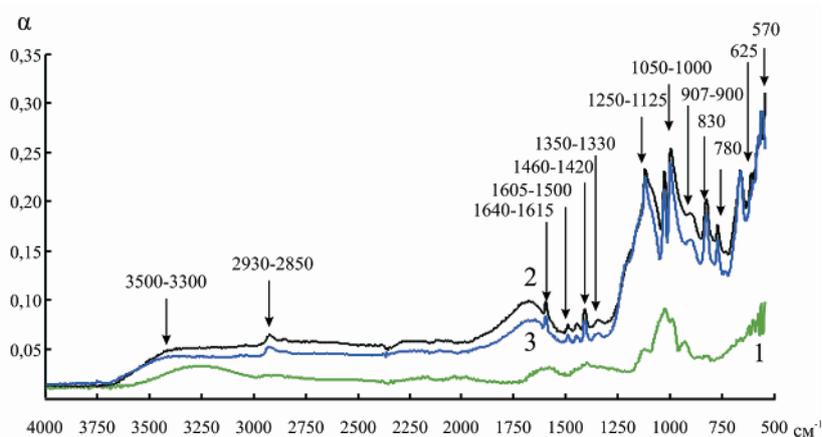


Рис. 2. ИК-спектр инулиназы из *Helianthus tuberosus* в свободном состоянии (1) и при иммобилизации на КУ-2 (3): 2 – спектр катионита КУ-2. Здесь и на рис. 3 – α – коэффициент поглощения инулиназы

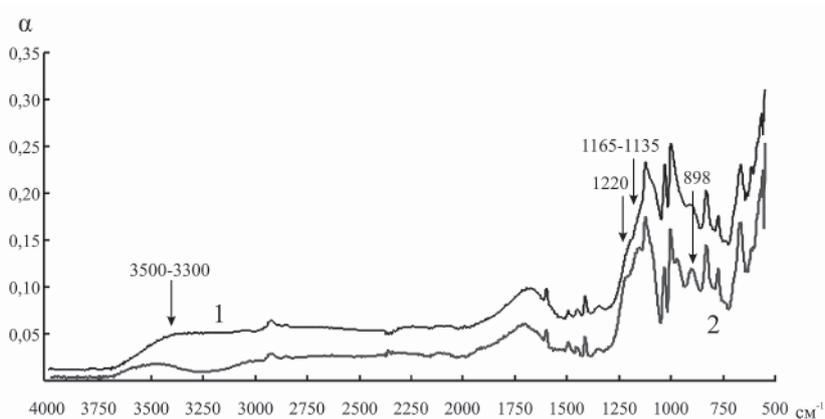


Рис. 3. ИК-спектр катионита КУ-2 до (1) и после (2) иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus*

На полученном таким образом спектре мы наблюдали наличие новых пиков (по сравнению с ИК спектром КУ-2): 1165–1135 и 898 cm^{-1} , указывающих на то, что некоторое количество сульфогрупп находится в недиссоциированном состоянии [15]. Насыщение сульфокатионитов ионами аминокислот должно приводить к вырождению колебаний группы $-\text{SO}_3\text{H}$ и расщеплению максимума в области 1220 cm^{-1} , что мы и видим на ИК-спектре. Происходит изменение формы и интенсивности пика в области 3500–3300 cm^{-1} , что, вероятно, указывает на образование небольшого количества водородных связей между поверхностными аминокислотами молекулы инулиназы и матрицей носителя.

Можно с высокой долей вероятности утверждать, что адсорбция инулиназы на

КУ-2 происходит за счет электростатических связей положительно заряженных аминокислотных остатков фермента с сульфогруппой катионита, а также за счет образования водородных связей.

Аналогичные изменения происходят в ИК-спектре КУ-2-8чС (рис. 4), поэтому очевидно, что связывание инулиназы с матрицей носителя происходит по тому же механизму, что и для КУ-2.

Элементарные ячейки анионитов марок ЭДЭ-10П и АН-12П содержат в основном вторичные и третичные аминогруппы, которые характеризуются поглощением электромагнитного излучения в области 3400–3200 и 1650–1600 cm^{-1} . После иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus* на ЭДЭ-10П на ИК-спектре носителя уменьшается интенсивность полосы 3400–3200 cm^{-1} ,

а полоса $1650-1600\text{ см}^{-1}$ совсем исчезает, что, вероятно, связано с тем, что ко вторичным и третичным аминогруппам ионита присоединяются отрицательно заряженные аминокислотные остатки молекулы фермента. После адсорбции ферментного препарата из *Helianthus tuberosus* на ма-

трице АН-12П на ИК-спектре носителя также уменьшается интенсивность полосы $3400-3200\text{ см}^{-1}$, а полоса $1650-1600\text{ см}^{-1}$ в некоторой степени меняет свою форму, что указывает на сходный с ЭДЭ-10П механизм взаимодействия ионита с молекулой инулиназы (рис. 5 и 6).

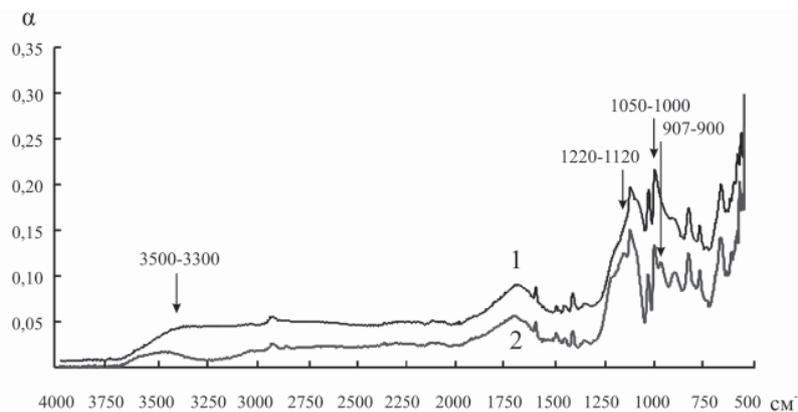


Рис. 4. ИК-спектр катионита КУ-2-8ЧС до (1) и после (2) иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus*

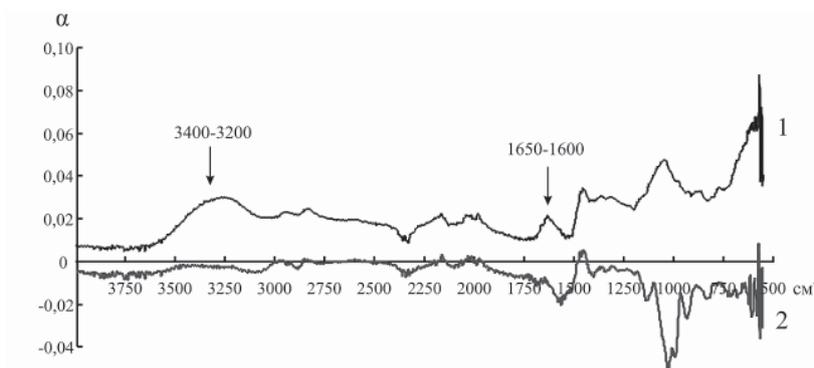


Рис. 5. ИК-спектр анионита ЭДЭ-10П до (1) и после (2) иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus*

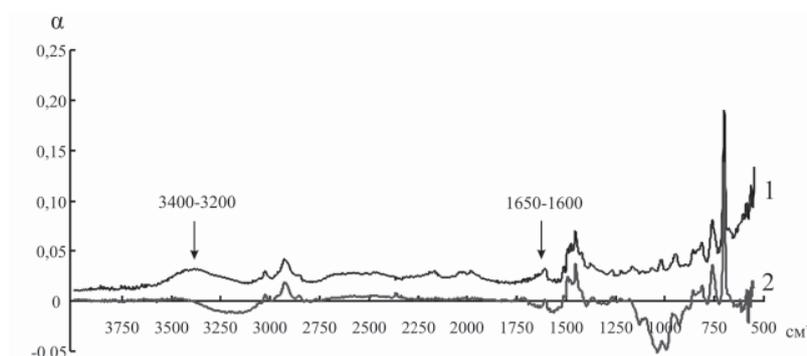


Рис. 6. ИК-спектр анионита АН-12П до (1) и после (2) иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus*

Сорбция анионов аминокислот сопровождается появлением в ИК-спектрах ионита значительно большего количества абсорб-

ционных полос в области $3700-3200\text{ см}^{-1}$. При иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus* на КУ-2 подобного

эффекта мы не наблюдали (рис. 7), однако пик в данной области после связывания носителя с ферментом был более выражен. В рассматриваемом случае взаимодействие растворителя возможно как вблизи

ионной пары $-N^+(CH_3)_3-OOC$ (максимум при $3660-3500$ и при $3460-3330$ cm^{-1}), так и с концевыми полярными группами ($-NH_2$, $-COOH$) аминокислот при $3290-3213$ cm^{-1} .

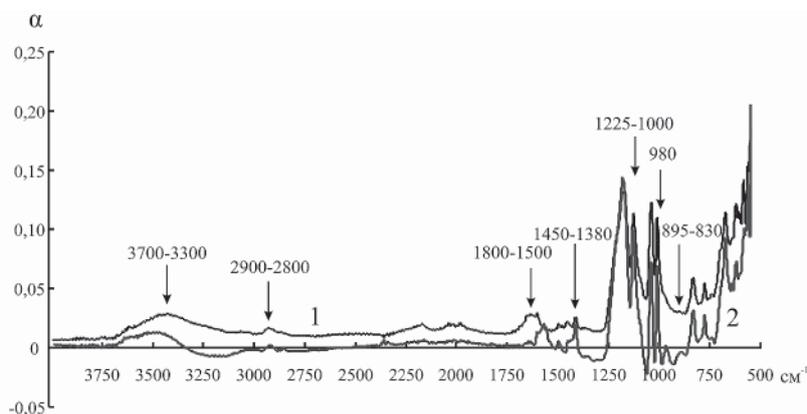


Рис. 7. ИК-спектр катионита КУ-2 до (1) и после (2) иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus*

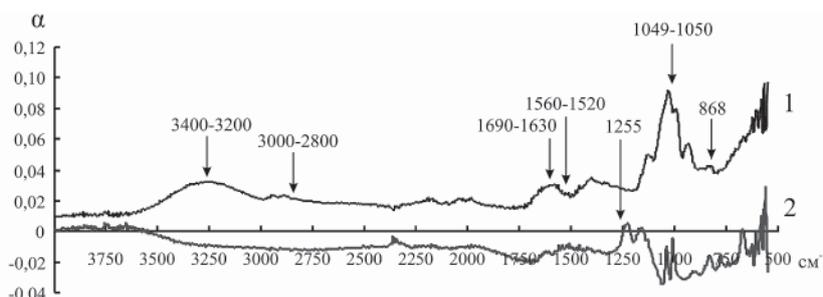


Рис. 8. ИК-спектр инулиназы из *Helianthus tuberosus* до (1) и после (2) иммобилизации на катионите КУ-2

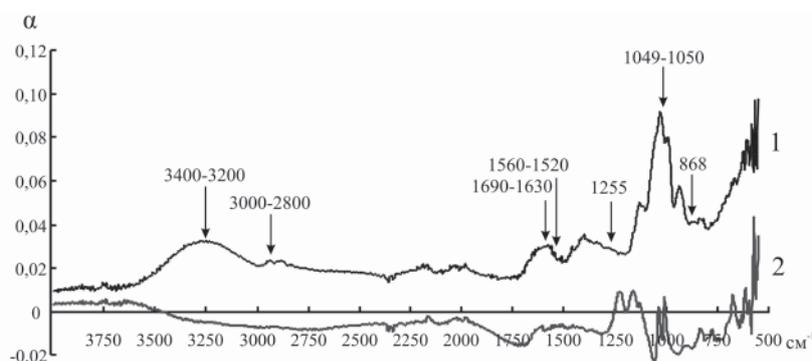


Рис. 9. ИК-спектр инулиназы из *Helianthus tuberosus* до (1) и после (2) иммобилизации на катионите КУ-2-8чС

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 дифференциальный спектр, полученный путем вычитания значений коэффициента поглощения α для ионита

из значений α для носителя с иммобилизованным на нем белком. При иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus* на КУ-2, КУ-2-8чС, ЭДЭ-10, АН-12П мы наблюдали изменение формы и снижение интенсивности пиков в областях $3000-2800$, 1049 и 868 cm^{-1} , соответствующих зоне поглощения алифатических аминокислот-

ных остатков. Модификации аналогичного рода происходят и в полосах амид I ($1690\text{--}1630\text{ см}^{-1}$) и амид II ($1560\text{--}1520\text{ см}^{-1}$), что может указывать на формирование более плотно упакованного гидрофобного

ядра по сравнению с нативной формой фермента, что, вероятно, и является основной причиной снижения каталитической активности препарата после иммобилизации (рис. 8–11).

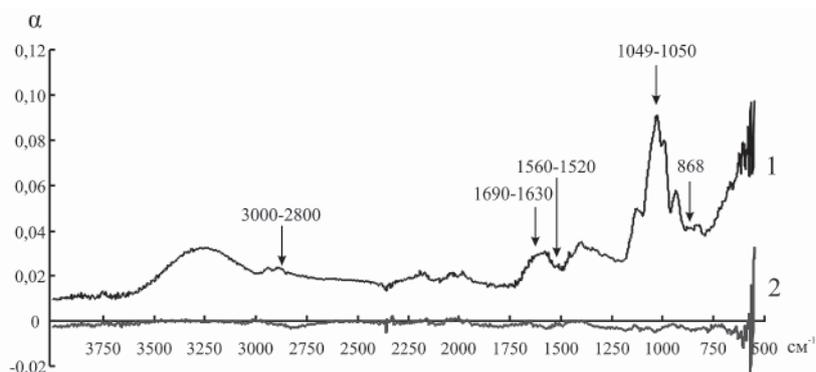


Рис. 10. ИК-спектр инулиназы из *Helianthus tuberosus* до (1) и после (2) иммобилизации на анионите ЭДЭ-10П

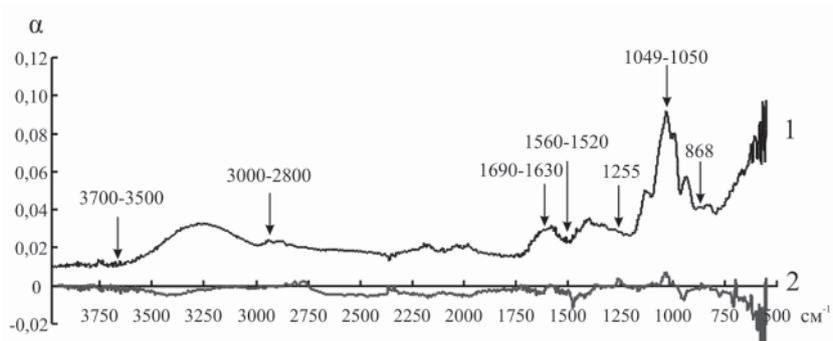


Рис. 11. ИК-спектр инулиназы из *Helianthus tuberosus* до (1) и после (2) иммобилизации на анионите АН-12П

При сорбции инулиназы из *Helianthus tuberosus* на КУ-2 и КУ-2-8чС (рис. 8 и 9) мы наблюдали исчезновение пика фермента в области $3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$, характеризующего колебания NH_2 -групп. Этот факт, по всей вероятности, связан с тем, что боковые аминокислотные группы лизина, аргинина и гистидина успешно взаимодействовали соответственно с сульфо- и карбоксильными группами катионитов и образовали многочисленные электростатические взаимодействия.

Изменения в полосах амид III (1255 см^{-1}) и амид IV (1050 см^{-1}) в модифицированных спектрах препарата инулиназы из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованного на КУ-2, КУ-2-8чС и АН-12П (рис. 8, 9, 11), вероятно, свидетельствуют о значительных структурных перестройках в молекуле фермента.

При иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus* на АН-12П (рис. 11) мы наблюдали снижение интенсивности и изменение формы 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.

Выше нами было показано, что связывание инулиназы с матрицами различных носителей происходит в основном за счет электростатических взаимодействий. Анализируя ИК-спектры свободных и иммобилизованных ферментов, мы попытались установить роль водородных связей в процессе адсорбции.

Полоса поглощения $3700\text{--}3500\text{ см}^{-1}$ соответствует свободной ОН-группе в парах вещества. Уменьшение этих значений указывает на взаимодействие ОН-группы, например, по типу водородной связи $\text{OH}\cdots\text{O}$. Чем прочнее водородная связь, тем ниже частота колебаний; может наблюдаться также расширение полосы [16, 17].

Смещения пиков свободной ОН-группы в область более низких значений частоты ко-

лебаний 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 фермента с матрицей 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 АН-12П (рис. 11), что может свидетельствовать о значительной роли водородной связи при формировании комплекса «фермент-носитель».

Далее мы исследовали степень изменения вторичной структуры для инулиназы из *Helianthus tuberosus* при их адсорбции на синтетических ионообменных смолах и в локалах (таблица).

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
α-спираль	25,5	28	46	45	40	43
β-слои	37	39	25	26	41	23
Неупорядоченная структура	37,5	33	29	29	19	34

При адсорбции инулиназы из *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 α-спиралей, β-слоев и неупорядоченных участков мы не обнаружили.

Выводы

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что механизмы взаимодействия инулиназы с матрицей катионо- и анионообменников принципиально отличаются друг от друга: в процессе адсорбции принимают участие разные участки белковой глобулы и в результате происходят различные конформационные перестройки в молекуле энзима. Можно заключить, что процесс адсорбции для каждого исследуемого носителя протекает по сложному индивидуальному механизму и трудно прогнозировать структурные изменения в молекуле фермента в зависимости от химической природы матрицы сорбента, с которым он взаимодействует.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (Соглашение о предоставлении гранта № 14.В37.21.2080 от 14.11.2012).

Список литературы

1. Абеян В.А. Иммобилизация микробной инулиназы на различных носителях / В.А. Абеян, Л.С. Манукян // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28, № 3. – С. 356–361.
2. Бруцкус Т.К. Иониты. Каталог / Т.К. Бруцкус, Е.В. Замборовская, И.В. Самборский. – Черкассы, 1975. – 36 с.
3. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов / В.А. Углянская [и др.]. – Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета, 1989. – 208 с.
4. Лурье А.А. Сорбенты и хроматографические носители. – М.: Химия, 1972. – 320 с.
5. Отто М. Современные методы аналитической химии: в 2 т. Т.1. – М.: Техносфера, 2003. – 416 с.
6. 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.
7. Холявка М.Г. Исследование структурно-функциональных свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Воронеж: ВГУ, 2010. 24 с.
8. 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.
9. Allais J. Continuous production of ethanol with *Zygomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice / J. Allais, E. Torres // Biotechnol. and Bioeng. – 1987. – Vol. 29, № 6. – P. 778–782.
10. Bienszyme 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.
11. 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.
12. Kalil S.J. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase

from *Kluyveromyces marxianus* / S.J. Kalil, F. Maugeri, M.I. Rodrigues // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40. – P. 581–586.

13. Letca D. Production of di-D-Fructofuranose 1,2':2,3' Dianhydride (DFA III) using Recombinant Inulase II: dissertation / D. Letca. – Bukarest, 2004. – 175 c. – URL: http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=970064837&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=970064837.pdf (дата обращения: 1.12.2012).

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

References

1. Abelyan V.A. Immobilization of microbic inulinase on various carriers / V.A. Abelyan, H.P. Manukyan // Applied biochemistry and microbiology. 1992. T. 28, n. 3. pp. 356–361.

2. Bratskus T.K. Ionites. Catalog / T.K. Bratskus, E.V. Zambrovskaya, I.V. Samborsky. Cherkassy, 1975. 36 p.

3. Infrared spectroscopy of ion-exchange materials / V.A. Uglyansky [et al.]. Voronezh: Publishing house of the Voronezh state university, 1989. 208 p.

4. Lurye A.A. Sorbents and chromatography carriers. M.: Chemistry, 1972. 320 p.

5. Otto M. Modern methods of analytical chemistry: in 2 t. T. 1. M: Techno sphere, 2003. 416 p.

6. Slivkin A.I. Physical, chemical and biological methods of quality assessment for medicines / A.I. Slivkin, V.F. Seleznev, E.A. Sukhoverkhova. Voronezh: Publishing house of the Voronezh state university, 1999. 368 p.

7. Holyavka M.G. Research of structurally functional properties of homogeneous and heterogeneous biocatalysts on a basis of inulinase: author's abstract of dissertation on Cand.Biol.Sci. Voronezh: VGU, 2010. 24 p.

8. 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, no. 4. pp. 539–545.

9. Allais J. Continuous production of ethanol with *Zyomonas mobilis* growing on Jerusalem artichoke juice / J. Allais, E. Torres // Biotechnol. and Bioeng. 1987. Vol. 29, no. 6. pp. 778–782.

10. Bienzyme amperometric biosensor using gold nanoparticle-modified electrodes for the determination of inulin in foods / J. Manso [et al.] // Anal. Biochem. 2008. Vol. 375, no. 2. pp. 345–353.

11. Immobilization of recombinant inulase II from a genetically modified *Escherichia coli* strain / D. Letca [et al.] // Roum. Biotechnol. Lett. 2004. Vol. 9, no. 5. pp. 1879–1886.

12. Kalil S.J. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* / S.J. Kalil, F. Maugeri, M.I. Rodrigues // Process Biochemistry. 2005. Vol. 40. pp. 581–586.

13. Letca D. Production of di-D-Fructofuranose 1,2':2,3' Dianhydride (DFA III) using Recombinant Inulase II: dissertation / D. Letca. Bukarest, 2004. 175 c. URL: http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=970064837&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=970064837.pdf (дата обращения: 1.12.2012)

14. 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, no. 1. pp. 199–206.

15. Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum* / A.K. Gupta [et al.] // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1990. Vol. 47, no. 3. pp. 245–257.

16. Silva F.R. Adsorption of inulinases in ion-exchange columns / F.R. Silva, C.C. Santana // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. Vol. 84. pp. 1063–1078.

17. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* / F.C. de Paula [et al.] // Food Chem. 2008. Vol. 111. pp. 691–695.

Рецензенты:

Епринцев А.Т., д.б.н., профессор, зав. каф. биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета, г. Воронеж;

Попова Т.Н., д.б.н., профессор, зав. каф. медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 19.02.2013.