



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723.2:577.325

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11567

Адсорбционная иммобилизация инулиназы из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus*: сравнительный аспект

Марина Геннадьевна Холявка^{1,2✉},
Максим Сергеевич Кондратьев^{1,3}, Валерий Григорьевич Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, holyavka@rambler.ru✉

²Севастопольский государственный университет, Севастополь

³Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Пущино, Россия

Аннотация. Методами компьютерного моделирования выполнен виртуальный скрининг лигандов для иммобилизации грибной инулиназы из *Aspergillus ficuum* и дрожжевой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*. Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназ с использованием методов последовательного (каскадного) докинга. Визуализированы вероятные сайты связывания полимерных матриц с молекулами фермента из различных продуцентов при адсорбционной иммобилизации. Установлено, что образование комплекса инулиназы с заряженными матрицами носителей происходит в основном за счет водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. 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.

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) силы взаимодействия дрожжевой инулиназы с поверхностью смолы КУ-2 в целом выше, а число водородных связей и количество аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия, больше, чем у грибного фермента; 2) силы взаимодействия и число аминокислот, участвующих в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях, 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 грибной инулиназы, у которой 21 аминокислотный остаток входит в состав сайтов связывания со всеми исследуемыми нами носителями, у дрожжевого фермента такой остаток только один.

Ключевые слова: адсорбция, иммобилизация, инулиназа, молекулярный докинг

Благодарности: работа выполнена при поддержке программы Приоритет-2030 Севастопольского государственного университета, стратегический проект № 3.

Для цитирования: Холявка М.Г., Кондратьев М.Г., Артюхов В.Г. Адсорбционная иммобилизация инулиназы из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus*: сравнительный аспект // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 4. С. 578-591. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11567>



Original article

Adsorption immobilization of inulinase from *Aspergillus ficuum* and *Kluyveromyces marxianus*: a comparative aspect

Marina G. Holyavka^{1,2✉}, Maxim S. Kondratyev^{1,3}, Valery G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, holyavka@rambler.ru✉

²Sevastopol State University, Sevastopol

³Institute of Cell Biophysics RAS – a separate subdivision of the Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS”, Pushchino, Russia

Abstract. Virtual screening of ligands for the immobilization of fungal inulinase from *Aspergillus ficuum* and yeast inulinase from *Kluyveromyces marxianus* was performed using computer simulation methods. An algorithm has been developed to reveal the molecular mechanism of adsorption immobilization of inulinases using sequential (cascade) docking methods. The probable binding sites of polymeric matrices with enzyme molecules from various producers were visualized during adsorption immobilization. It has been established that the complexation of inulinase with charged carrier matrices occurs mainly due to hydrogen bonds and van der Waals interactions. It has been shown that during the sorption of inulinases from *Aspergillus ficuum* and *Kluyveromyces marxianus* on the matrices KU-2, AV-17-2P, VION KN-1, VION AN-1, KOPAN-90 and chitosan, the following similarities are revealed: 1) when both types of inulinases interact with the KU-2 matrix, hydrogen bonds are formed only between the carrier sulfo groups and the protein molecule; 2) only van der Waals interactions and the absence of hydrogen bonds are revealed between the matrix of the anion exchange resin AV-17-2P and enzymes; 3) chitosan forms the largest number of hydrogen bonds with both inulinases among the carriers studied by us.

Distinctive features of inulinases from *Aspergillus ficuum* and *Kluyveromyces marxianus* during sorption on KU-2, AV-17-2P, VION KN-1, VION AN-1, and KOPAN-90 matrices were revealed: 1) binding affinity of yeast inulinase to the surface of KU-2 resin generally higher, and the number of hydrogen bonds and the number of amino acid residues that form van der Waals interactions, is greater than that of the fungal enzyme; 2) the binding affinities and the number of amino acids involved in van der Waals interactions for inulinase from *Kluyveromyces marxianus* during sorption on the anion exchange resin AV-17-2P also exceed their values for the enzyme from *Aspergillus ficuum*; 3) in contrast to fungal inulinase, in which 21 amino acid residues are part of the binding sites with all the carriers we studied, the yeast enzyme has only one such residue.

Keywords: adsorption, immobilization, inulinase, molecular docking.

Acknowledgments: this work was supported by the Priority-2030 program of the Sevastopol State University, strategic project No. 3.

For citation: Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Artyukhov V.G. Adsorption immobilization of inulinase from *Aspergillus ficuum* and *Kluyveromyces marxianus*: a comparative aspect. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(4): 578-591 (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11567>

Введение

Иммобилизованные ферменты, связанные с нерастворимыми полимерными носителями за счет физических взаимодействий или химических связей, имеют существенные технологические преимущества по сравнению с их предшественниками в растворе: 1) возможность отделить препарат от реакционной среды, получить продукт, не загрязненный энзимом, 2) остановить реакцию в любой момент времени, 3) использовать катализатор повторно, 4) проводить процесс

непрерывно (например, в проточных реакторах), 5) регулировать скорость катализируемой реакции (или выход продукта) [1, 2], 6) перспектива изменять свойства фермента: его специфичность (особенно в отношении макромолекулярных субстратов), зависимость активности от pH среды [3, 4], 7) стабильность к денатурирующим воздействиям и долговечность препарата, увеличение времени его полужизни [5-8], 8) упрощение и удешевление производственных циклов [9-11].

В некоторых случаях образование комплекса фермент-носитель может осу-

ществляться параллельно с очисткой энзима от ряда примесей и таким образом компенсировать затраты, связанные с этапом иммобилизации [12, 13]. Многоточечное связывание с нерастворимым полимерным носителем [14], особенно в случае олигомерных белков [15], может повысить жесткость пространственной организации фермента и, таким образом, увеличить его стабильность [16-19]. Показано, что изменение жесткости определенных участков молекулы белка и контролируемые модификации его структурной организации, возникающие в результате процесса иммобилизации, в некоторых случаях значительно улучшают активность, селективность или специфичность фермента [20]. Следовательно, изучение гетерогенных биокатализаторов (иммобилизованных ферментов и их систем) способствует расширению теоретических знаний о путях регулирования структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств энзимов.

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

Адсорбция аминокислот и белков ионообменными полимерами является сложным процессом, который может протекать как по ионообменному механизму, так и с помощью иных типов взаимодействий (диполь-дипольные, гидрофобные взаимодействия и образование водородных связей) [21-23]. Несмотря на множество практических разработок в области иммобилизации карбогидраз, молекулярные механизмы отдельных стадий этого процесса до конца не изучены. Имеются лишь данные ИК-спектроскопии и электронной микроскопии комплексов фермент-носитель, которые не позволяют составить полную картину о типах, числе и длине связей и взаимодействиях между

иммобилизованным ферментным препаратом и матрицей носителя. Отсутствуют исчерпывающие экспериментальные данные об отдельных этапах процесса сорбции карбогидраз на нерастворимых полимерах.

Инулиназы – группа ферментов, которые участвуют в углеводном метаболизме высших растений и некоторых микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. Существуют экзо- (КФ 3.2.1.80) и эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7). Эндоинулиназы расщепляют молекулу инулина вдали от концевых остатков фруктозы, продуктами гидролиза являются олигосахариды. Экзоинулиназы отщепляют концевые остатки фруктозы от молекул инулина, сахарозы и раффинозы [24, 25]. Оба типа инулиназ могут быть использованы в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, в частности, фруктозы и инулоолигосахаридов – неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения.

Молекулярные массы инулиназ колеблются в широких пределах: фермент из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* – 63 кДа [26, 27], из *Aspergillus ficuum* – 64 кДа [28, 29]. В литературе встречаются противоречивые данные относительно надмолекулярной организации инулиназ. Это характерно не только для ферментов, полученных из различных видов одного рода (в качестве примера могут послужить роды *Kluyveromyces*, *Aspergillus* и *Arthrobacter*), но даже для энзимов, выделенных из штаммов одного и того же вида микроорганизма. Одни авторы утверждают, что инулиназа представлена только в мономерной форме, другие показывают наличие четвертичной



структуры в виде димера или даже тетрамера. Инулиназы из микробных продуцентов являются гликопротеинами и содержат в своем составе от 20 до 40 % углеводов [27].

Большинство микроорганизмов синтезируют фермент с температурным оптимумом, находящимся в пределах 45-55°C. Температуры, применяемые в производственных циклах, не всегда совпадают с максимумами активности ферментов, часто приходится использовать более низкие значения, при которых энзим является стабильным в течение длительного времени, поэтому целесообразно выбирать те инулиназы, оптимум функционирования которых превышает предполагаемую температуру в биореакторе. Наиболее перспективными для промышленного применения являются такие термофильные микроорганизмы-продуценты, как *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia guilliermondii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces species*, *Arthrobacter species*, *Arthrobacter ilicis*, *Cladosporium cladosporioides*, которые продуцируют инулиназы с оптимумом функционирования 60°C [30].

Инулиназы, выделенные из различных продуцентов, отличаются по рН-оптимуму. Грибные и дрожжевые ферменты проявляют максимальную активность в более кислой среде (рН 4.0-5.5), бактериальные – в менее кислой (рН 5.5-7.0). Кислотоустойчивость бактериальных инулиназ значительно ниже дрожжевых и грибных. Энзимы бактерий устойчивы в диапазоне рН 4.5-7.5, грибные – в диапазоне рН 3.0-8.0, дрожжевые – при рН 3.0-6.5. Известно, что рН сильно влияет на соотношение моно- и олигосахаридов в растворе: при более кислой среде (рН 4.0) содержание фруктозы и инулобиозы увеличивается, тогда как при рН 6.0 – заметно снижается. Для промышленных процессов более целесообразно выбирать те инулиназы, у

которых оптимум функционирования находится в интервале рН 4.0-5.0, совпадающим с зоной наибольшей стабильности фруктозы. Изoeлектрические точки большинства инулиназ находятся в диапазоне рН 3.8-5.4, поэтому их можно отнести к кислым белкам [30].

Дополнение экспериментальных эмпирических подходов по подбору удачных комбинаций фермент-носитель в условиях различного микроокружения современными методами компьютерного и математического моделирования позволяет не только экономить материальные ресурсы на апробацию иммобилизационных агентов и выявлять механизмы процесса иммобилизации, но и создавать принципиально новые комплексы препаратов на основе использования направленного конструирования носителей с заданными свойствами [31]. Для получения иммобилизованного биообъекта, востребованного на современном рынке, необходимы: 1) детальный анализ структурно-функциональных особенностей широкого круга молекул [32], 2) понимание фундаментальных механизмов, управляющих конформационными перестройками в биополимерах [33], 3) выявление наиболее вероятных путей образования комплексов различной природы и протекания химических реакций [34]. Для этого необходимо уметь активно манипулировать теоретическими подходами – современными методами квантовой химии: методами молекулярной динамики в полноатомном приближении, гибкого молекулярного докинга, методами прогнозирования спектров биологической активности и высокопроизводительным виртуальным скринингом соединений [35].

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

ных механизмов получения и применения гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы расширяет наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов, что позволит усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы [27].

В связи с этим нашей задачей было выявление особенностей адсорбции инулиназы из различных продуцентов – *Aspergillus ficuum* (грибы) и *Kluyveromyces marxianus* (дрожжи) и сайтов связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой энзима: расчет значений силы взаимодействия фермента по отношению к носителям для иммобилизации, определение числа, типов и длин связей и взаимодействий между молекулой инулиназы и носителем на каждой стадии сорбции белковой глобулы.

Экспериментальная часть

Объектами исследования были инулиназы из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) и *Kluyveromyces marxianus*, структура которой была получена путем реконструкции методами высокопроизводительного компьютерного моделирования на основе молекулы инвертазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 4EQV) [36].

В качестве тестируемых лигандов (носителей для иммобилизации) применяли хитозан, ионообменные смолы АВ-17-2П, КУ-2 и ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90, краткая характеристика которых представлена в табл. 1. Все эти лиганды были нами апробированы как носители для иммобилизации инулиназ, т.е. все они образуют некие связи или взаимодействия с ее молекулами, и этот факт доказан экспериментально [37-39]. Кроме того, т.к. инулиназа – перспективный фермент для промышленности, все лиганды являются нетоксичными и уже применяются либо в пищевой промышленности, либо в медицине и/или ветеринарии.

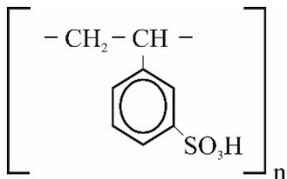
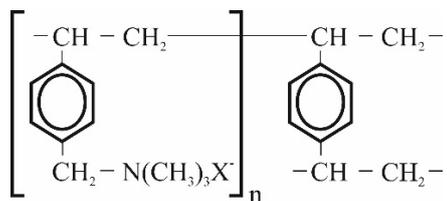
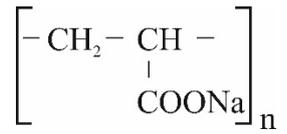
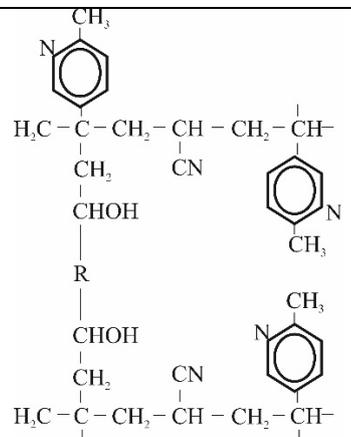
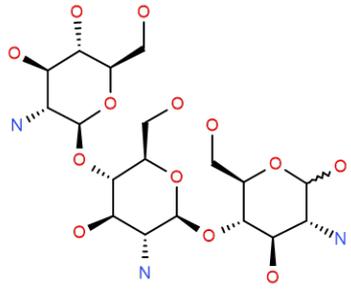
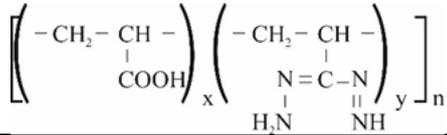
Подготовка структуры инулиназ для докинга выполнялась по стандартной для Autodock Vina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов.

Модели структур полимеров были нарисованы в молекулярном конструкторе HyperChem, последовательно оптимизированы сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в PM3. Для всех полимеров была выбрана длина цепочки в 5 звеньев. Каждый из лигандов в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей.

Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белка с помощью MGLTools, а также выбрана ячейка для расчета докинга, размеры которой составили 68×58×60Å. Центр молекулы белка находился в точке с координатами (x=37.044; y= -36.997; z= -5.365). Центр молекулы белка и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула инулиназы полностью была внутри расчетной области пространства. Эти же данные для мишени использовались нами и для последующих манипуляций с выбранным набором лигандов.

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

Таблица 1. Краткая характеристика тестируемых носителей для иммобилизации инулиназы
 Table 1. Brief characteristics of tested carriers for inulinases immobilization

Носитель	Тип носителя	Свойства носителя	Структура элементарного звена
КУ-2	катионит, смола	эффективный размер зерен – 0.35-0.55 мм; полная статическая обменная емкость – не менее 1.8. ммоль/см ³ (ГОСТ 20298-74)	
АВ-17-2П	анионит, смола	эффективный размер зерен – 0.4-0.7 мм; полная статическая обменная емкость – не менее 1 ммоль/см ³ (ГОСТ 20301-2022)	
ВИОН КН-1	катионит, волокно	полная статическая обменная емкость по 0.1 н НСl – не менее 3.5 мг-экв/г (по данным производителя)	
ВИОН АН-1	анионит, волокно	полная статическая обменная емкость по 0.1 н НСl – не менее 1.8 мг-экв/г (по данным производителя)	
Хитозан	катионный полисахарид	pK _a =6.5	
КОПАН-90	амфолит, волокно		

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

Связи и взаимодействия детектировались нами путем сравнительного анализа характера соседствующих атомных группировок, углов и длин межмолекулярных связей. Иллюстрации были отрисованы в соответствии с правилами, заложенными

в пакет LigPlot. Возможные взаимодействия лиганда с рецептором были оценены нами до моделирования на основании экспериментальных работ, виртуальные расчеты конкретизируют количественные величины расстояний и точную локализацию лиганда.

Обсуждение результатов

В предыдущих работах мы уже приводили состав потенциальных сайтов (скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков) на поверхности молекул инулиназ из различных продуцентов, которые могут участвовать в сорбции и/или образовании комплексов ферментов с рядом лигандов [40-42]. В данном исследовании мы стремились конкретизировать полученные ранее результаты, чтобы выявить особенности процесса адсорбции инулиназ из *Aspergillus ficuum* (грибы) и *Kluyveromyces marxianus* (дрожжи), как наиболее изученных и доступных для промышленного применения гликозидгидролаз, с определением числа, типов и длин связей и взаимодействий между молекулой фермента и носителем на каждой стадии сорбции белковой глобулы.

На рис. 1 и 2 представлены наиболее вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулами грибной инулиназы из *Aspergillus ficuum* и дрожжевой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, включающие в себя аминокислотные остатки, которые входят в состав контактных областей при сорбции фермента минимум на пяти из шести исследуемых нами носителей.

В табл. 2 приведены результаты сравнительного анализа сайтов связывания инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* с матрицами носителей различных типов. Отчетливо видно, что силы взаимодействия дрожжевой инулиназы с поверхностью смолы КУ-2 в целом выше, а число водородных связей и аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия,

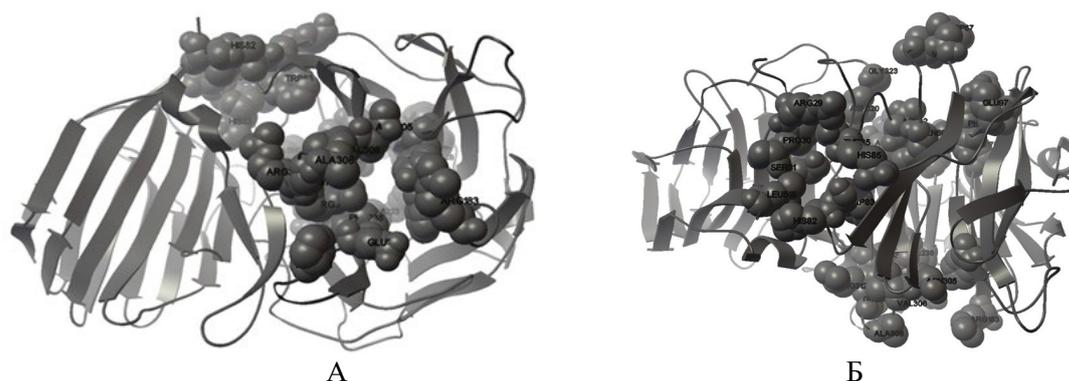


Рис. 1. Вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* (атомы аминокислотных остатков, входящих в их состав, обозначены шарами): Б – повернутая на 90 градусов вокруг горизонтальной оси форма А
Fig 1. Probable binding sites of polymer matrices for immobilization with the inulinase molecule from *Aspergillus ficuum* (the atoms of the amino acid residues included in their composition are indicated by balls): Б – form А rotated 90 degrees around the horizontal axis

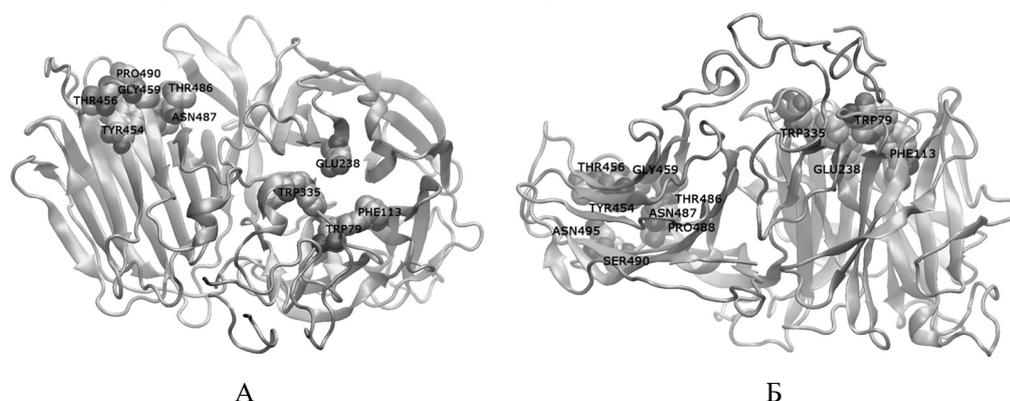


Рис. 2. Вероятные сайты связывания полимерных матриц для иммобилизации с молекулой инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (атомы аминокислотных остатков, входящих в их состав, обозначены шарами): Б – повернутая на 90 градусов вокруг горизонтальной оси форма А
Fig 2. Probable binding sites of polymer matrices for immobilization with the inulinase molecule from *Kluyveromyces marxianus* (the atoms of the amino acid residues included in their composition are indicated by balls): Б – form А rotated 90 degrees around the horizontal axis

больше, чем у грибного фермента. Силы взаимодействия и число аминокислот, участвующих в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях, для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* при сорбции на анионите АВ-17-2П также превышают их значения для энзима из *Aspergillus ficuum*. При этом оба фермента не образуют водородных связей с матрицей носителя.

Силы взаимодействия, число водородных связей и аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия, у обеих инулиназ с матрицей волокон ВИОН КН-1 и КОПАН-90 существенно образом не отличаются друг от

друга, тогда как значения сил взаимодействия дрожжевой инулиназы с поверхностью ВИОН АН-1 и число аминокислот, участвующих в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях, выше, а количество водородных связей при этом ниже, чем у грибного энзима. Существенных отличий в значениях сил взаимодействия и числе водородных связей для обеих инулиназ при сорбции на хитозане мы не обнаружили, однако, расчеты показали, что у молекулы грибного энзима количество аминокислотных остатков, которые образуют ван-дер-ваальсовы взаимодействия с поверхностью носителя, выше, чем у дрожжевого фермента.

Обобщая приведенные выше материалы, можно заключить, что при сорбции инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* на матрицах КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КО-ПАН-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

Таблица 2. Сравнительный анализ сайтов связывания инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* с матрицами носителей различных типов

Table 2. Comparative analysis of binding sites for inulinases from *Aspergillus ficuum* and *Kluyveromyces marxianus* with different types of carrier matrices

инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>
КУ-2, катионит, смола	
Сила взаимодействия от первого до пятого сайтов связывания, ккал/моль	
-7.3	-8.5
-8.0	-8.8
-7.8	-7.6
-6.8	-7.9
-6.2	-8.4
Количество водородных связей/Количество аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия	
20/46	23/52
АВ-17-2П, анионит, смола	
Сила взаимодействия от первого до пятого сайтов связывания, ккал/моль	
-6.8	-8.0
-7.1	-6.9
-5.2	-6.4
-5.2	-6.1
-5.5	-6.2
Количество водородных связей/Количество аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия	
0/81	0/68
ВИОН КН-1, катионит, волокно	
Сила взаимодействия от первого до пятого сайтов связывания, ккал/моль	
-5.8	-5.6
-5.5	-6.0
-5.9	-5.8
-5.2	-5.6
-5.6	-5.5
Количество водородных связей/Количество аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия	
21/41	25/43
ВИОН АН-1, анионит, волокно	
Сила взаимодействия от первого до пятого сайтов связывания, ккал/моль	
-6.5	-7.8
-6.4	-7.3
-7.2	-7.4
-5.3	-6.5
-5.4	-5.5
Количество водородных связей/Количество аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия	
8/64	5/76
Хитозан	
Сила взаимодействия от первого до пятого сайтов связывания, ккал/моль	
-7.0	-7.8
-6.8	-6.5



Таблица 2. (продолжение)	
-6.3	-6.4
-6.3	-6.5
-7.7	-6.6
Количество водородных связей/Количество аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия	
44/31	45/23
инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>
КОПАН-90, амфолит, волокно	
Сила взаимодействия от первого до пятого сайтов связывания, ккал/моль	
-5.9	-5.8
-5.6	-5.8
-5.8	-5.7
-5.0	-6.0
-5.2	-5.2
Количество водородных связей/Количество аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия	
27/52	29/50

образуют водородные связи с сульфогруппами других звеньев своей матрицы;

3. между матрицей анионита АВ-17-2П и ферментами мы выявляем 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. силы взаимодействия, число водородных связей и количество аминокислотных остатков, участвующих в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях, 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.

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 и 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. силы взаимодействия дрожжевой инулиназы с поверхностью смолы КУ-2 в целом выше, а число водородных связей и количество аминокислот, участвующих в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях, больше, чем у грибного фермента;

3. силы взаимодействия и число аминокислотных остатков, образующих ван-дер-ваальсовы взаимодействия, 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 аминокислот, принимающих участие в формировании 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 обнаруживаем 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).

Список литературы/References

1. Jafarizadeh-Malmiri H., Ghaz-Jahanian M.A., Berenjian A., Potential applications of chitosan nanoparticles as novel supports in enzyme immobilization, *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 2012; 8: 203-219. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.203.219>

Заключение

Рамки инженерной энзимологии гораздо шире, чем создание катализаторов нового типа. Фундаментальная задача данной отрасли состоит в том, чтобы разработать теоретические 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, сохраняют свое значение в обозримом будущем.

Методами компьютерного моделирования нами был выполнен виртуальный скрининг перспективных лигандов для адсорбции инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus*. Изученный нами набор носителей представлял собой поликатиониты и полианиониты. На основе сравнительного анализа величин полной энергии и локализации мест связывания лигандов, а также литературных данных, были высказаны соображения об особенностях взаимодействия предлагаемых нами матриц для иммобилизации молекул грибного и дрожжевого ферментов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

2. Ansari S.A., Husain Q., Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review, *Biotechnol. Adv.*, 2012; 30: 512-523. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>

3. Vaghari H., Jafarizadeh-Malmiri H., Mohammadlou M., Berenjian A., Anarjan N., Jafari



- N., Nasiri S., Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization, *Biotechnology Letters*, 2016; 38: 223-233. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1977-z>
4. Cipolatti E.P., Valério A., Henriques R.O., Moritz D.E., Ninow J.L., Freire D.M.G., Manoel E.A., Fernandez-Lafuente R., de Oliveira D., Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends, *RSC Advances*, 2016; 6: 104675-104692. <https://doi.org/10.1039/C6RA22047A>
5. Janecek S., Strategies for obtaining stable enzymes, *Process Biochem.*, 1993; 28: 435-445.
6. Guzik U., Hupert-Kocurek K., Wojcieszynska D., Immobilization as a strategy for improving enzyme properties – Application to oxidoreductases, *Molecules*, 2014; 19: 8995-9018. <https://doi.org/10.3390/molecules19078995>
7. Lei Z., Bi S., Yang H., Chitosan-tethered the silica particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization, *Food Chem.*, 2007; 104: 577-584. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.008>
8. Efremenko E.N., Tatarinova N.Yu., The effect of long-term preservation of bacterial cells immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel on their viability and biosynthesis of target metabolites, *Microbiology*, 2007; 76(3): 336-341. <https://doi.org/10.1134/S0026261707030113>
9. Liese A., Hilterhaus L., Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications, *Chemical Society Reviews*, 2013; 42: 6236-6249. [doi: 10.1039/c3cs35511j](https://doi.org/10.1039/c3cs35511j)
10. Efremenko E.N., Stepanov N.A., Nikolskaya A.B., Senko O.V., Spiricheva O.V., Varfolomeev S.D., Biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms in the production of bioethanol and biobutanol, *Catalysis in Industry*, 2011; 3(1): 41-46. <https://doi.org/10.1134/S207005041101003X>
11. Efremenko E.N., Stepanov N.A., Gudkov D.A., Sen'ko O.V., Lozinskij V.I., Varfolomeev S.D., Immobilizovannyye gribnyye biokatalizatory dlya polucheniya kompleksa cellyulaz, gidrolizuyushchego vozobnovlyаемое rastitel'noe syr'e, *Kataliz v promyshlennosti*, 2013; 1: 68-77.
12. Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R., Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts, *Biotechnol. Adv.*, 2015; 33: 435-456. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>
13. Garcia-Galan C., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R.C., Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, *Adv. Synth. Catal.*, 2011; 353: 2885-2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
14. Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007; 40: 1451-1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
15. Fernandez-Lafuente R., Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation, *Enzyme Microb. Technol.*, 2009; 45: 405-418. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009>
16. Balcao V.M., Vila M.M., Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015; 93: 25-41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.005>
17. Bolivar J.M., Mateo C., Rocha-Martin J., Cava F., Berenguer J., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports, *Enzyme Microb. Technol.*, 2009; 44: 139-144. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.10.004>
18. Min K., Yoo Y.J., Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014; 19: 553-567. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0173-7>
19. Efremenko E.N., Lozinsky V.I., Sergeeva V.S., Plieva F.M., Makhlis T.A., Kazankov G.M., Gladilin A.K., Varfolomeyev S.D., Addition of polybrene improves stability of organophosphate hydrolase immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel carrier, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2002; 51(2): 195-201. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(01\)00135-x](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(01)00135-x)
20. Rodrigues R.C., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., Fernández-Lafuente R., Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chem. Soc. Rev.*, 2013; 45: 6290-6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>
21. Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F., Kinetics of the sorption of amino acids by



- KU-2-8 gel cationite, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2001; 75(2): 266-271.
22. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Selemenev V.F., Grigor'eva G.A., Adsorption immobilization of glucoamylase on amphoteric poly-electrolytes, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2001; 75(11): 1843-1845.
23. Krisilova E.V., Eliseeva T.V., Selemenev V.F., Krisilov A.V., Oros G.Y., The influence of side substituents in α -amino acids on their sorption by a cation-exchange membrane, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2009; 83(10): 1763-1767. <https://doi.org/10.1134/S0036024409100240>
24. Ohta K., Akimoto H., Matsuda S., To-shimitsu D., Nakamura T., Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998; 62(9): 1731-1738. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1731>
25. Basso A., Spizzo P., Ferrario V., Knapic L., Savko N., Braiuca P., Ebert C., Ricca E., Calabrò V., Gardossi L., Endo- and exo-inulinases: enzyme-substrate interaction and rational immobilization, *Biotechnol. Prog.*, 2010; 26(2): 397-405. <https://doi.org/10.1002/btpr.334>
26. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Khol-yavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Obraztsova T.B. Study of the oligomeric structure and some physicochemical properties of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* Y-303, *Biophysics*, 2009; 54(6): 675-680. <https://doi.org/10.1134/S0006350909060025>
27. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Structural and functional properties of inulinases. Ways to regulate their activity, *Biophysics*, 2013; 58(4): 493-501. <https://doi.org/10.1134/S0006350913040039>
28. Uhm T.B., Chung M.S., Lee S.H., Gourronc F., Housen I., Kim J.H., Van Beeumen J., Haye B., Vandenhoute J. Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 1999; 63(1): 146-151. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.146>
29. Ettalibi M., Baratti J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 1987; 26: 13-20. <https://doi.org/10.1007/BF00282143>
30. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A. Fiziko-himicheskie i kineticheskie svoystva inulinaz, *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova*, 2013; 2: 67-77.
31. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., *In silico* design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase, *Computers in Biology and Medicine*, 2016; 71: 198-204. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2016.02.015>
32. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Grechkina M.V., Ostankova I.V., Artyukhov V.G., Inulinases from various producers: the features of their permolecular organization, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014; 50(1): 10-16. <https://doi.org/10.1134/S0003683814010050>
33. Holyavka M., Artyukhov V., Kovaleva T., Structural and functional properties of inulinases: A review, *Biocatalysis and Biotransformation*, 2016; 34(1): 1-17. <https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1196486>
34. Holyavka M.G., Evstigneev M.P., Artyukhov V.G., Savin V.V., Development of heterogeneous preparation with inulinase fortubular reactor systems, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016; 129: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.006>
35. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Terentyev V.V., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., Artyukhov V.G., The Molecular Mechanism of Adsorption Immobilization of Inulinase on Polymer Matrices, *Biophysics*, 2017; 62 (1): 5-11. <https://doi.org/10.1134/S0006350917010109>
36. Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Khol-yavka M.G., Artyukhov V.G., Reconstruction of the spatial structure of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* to find regulatory pathways of its catalytic activity, *Biophysics*, 2016; 61(4): 565-571. <https://doi.org/10.1134/S0006350916040023>
37. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Khol-yavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Thermal inactivation of free and immobilized inulinase, *Applied biochemistry and microbiology*, 2010; 46(4): 385-389. <https://doi.org/10.1134/S0003683810040034>
38. Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Trushin M.V., Artyukhov V.G., Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018;



115: 829-834. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.107>

39. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Lukin A.N., Agapov B.L., Artyukhov V.G., Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019; 138: 681-692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.132>

40. Koroleva V.A., Sakibaev F.A., Shelomenceva T.N., Holyavka M.G., Artyuhov V.G. Izuchenie zakonornostej termicheskoy inaktivatsii svobodnogo i immobilizovannogo na matrice hitozana tripsina, *Vestnik VGU. Seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya»*, 2018; 3: 58-63.

41. Sakibaev F.A., Holyavka M.G., Makin S.M., Artyuhov V.G. An *in silico* search for the

sites of potential binding with charged and hydrophobic carriers in the molecules of endoinulinase from *Aspergillus ficuum* and exoinulinase from *Aspergillus awamori*, *Biophysics*, 2019; 64(3): 323-330. <https://doi.org/10.1134/S0006350919030199>

42. Sakibaev F.A., Makin S.M., Holyavka M.G., Artyuhov V.G. Zakonomernosti formirovaniya dimernykh kompleksov molekulami ekzo- i endoinulinaz. Izmenenie sostava potencial'nykh sajtov svyazyvaniya s zaryazhennymi i gidrofobnymi nositelyami dlya ih immobilizatsii, *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2021; 21 (6): 905-927.

Информация об авторах / Information about the authors

М.Г. Холявка – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь

М.С. Кондратьев – к.ф.-м.н., зав. лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем, Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

В.Г. Артюхов – д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

M.G. Holyavka – Doctor (biology), professor, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; Professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, e-mail: holyavka@rambler.ru

M.S. Kondratyev – Ph.D. (physical and mathematical sciences), Head of the Laboratory of Structure and Dynamics of Biomolecular Systems, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

V.G. Artyukhov – Doctor (biology), professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 27.05.2023; одобрена после рецензирования 21.08.2023; принята к публикации 06.09.2023.

The article was submitted 27.05.2023; approved after reviewing 21.08.2023; accepted for publication 06.09.2023.