



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 541.1

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12507

Сравнительная оценка термостабильности свободной и иммобилизованной инулиназы на сверхсшитых полимерах

Ирина Викторовна Шкутина¹✉, Наталья Владимировна Мироненко², Владимир Федорович Селеменев², Маргарита Кузьминична Давыдова¹, Людмила Николаевна Коломиец³

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия, irn55@mail.ru✉

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

Аннотация. В настоящей работе показана возможность применения гетерогенного биокатализатора в реакциях каталитического превращения инулинсодержащего сырья. Связывание ферментов с носителями различной природы обуславливает потенциальные возможности для использования иммобилизованных ферментов в качестве специфических, регенерируемых, устойчивых к денатурирующим факторам среды биокатализаторов. В данной работе в качестве носителей для адсорбционной иммобилизации инулиназы использовались стиролдивинилбензолные сверхсшитые макропористые сорбенты: катионообменники на основе стирола и дивинилбензола – С100Н (сильнокислотный), С104 (слабокислотный) и анионообменники – А100 (низкоосновный), А500R (высокоосновный).

Установлено, что количество фермента, связанного с носителями, а также активность иммобилизованной инулиназы зависят от концентрации ионов водорода. Показано, что величина сорбционного параметра достигает максимального значения при рН 4.7-5.0. Наибольшее количество сорбированного белка отмечено для катионообменников С100Н (0.95 ммоль/г) и С104 (0.88 ммоль/г). Активность полученных гетерогенных биокатализаторов при данном значении кислотности среды составляет 64.8-83.5% от активности свободной инулиназы.

Проведено исследование влияния температуры (в диапазоне 40-70°C) на инактивацию свободной и связанной инулиназы при оптимальном значении рН среды. Рассчитаны кинетические параметры процесса инактивации. Выявлено, что в рассматриваемом температурном интервале константы инактивации и энергия активации иммобилизованной инулиназы ниже по сравнению с нативным энзимом. Наблюдаемые закономерности позволяют рекомендовать гетерогенный биокатализатор для дальнейшего изучения и практического использования.

Ключевые слова: инулиназа, иммобилизация, каталитическая активность, термическая инактивация, константа инактивации, энергия активации.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект FZGU-2023-0009.

Для цитирования: Шкутина И.В., Мироненко Н.В., Селеменев В.Ф., Давыдова М.К., Коломиец Л.Н. Сравнительная оценка термостабильности свободной и иммобилизованной инулиназы на сверхсшитых полимерах // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 5. С. 672-681. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12507>

Original article

Comparative assessment of the thermostability of free and immobilised inulinase on hypercrosslinked polymers

Irina V. Shkutina¹✉, Natalia V. Mironenko², Vladimir F. Selemenev², Margarita K. Davydova¹, Ludmila N. Kolomiets³

© Шкутина И. В., Мироненко Н. В., Селеменев В. Ф., Давыдова М. К., Коломиец Л. Н., 2024



¹St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation, irn55@mail.ru[✉]

²Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

³Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. This study demonstrates the possibility of using heterogeneous biocatalysts in catalytic transformation reactions of inulin-containing raw materials. Binding of enzymes to carriers of different nature determines the potential for the use of immobilised enzymes as specific, regenerable, and resistant to denaturing environmental factors biocatalysts. In this study, we used styrene-divinylbenzene hypercrosslinked macroporous sorbents as carriers for the adsorption immobilisation of inulinase: cation exchangers C100H (strongly acidic) and C104 (weakly acidic) based on styrene and divinylbenzene and anion exchangers A100 (low-basic) and A500R (highly basic).

It was determined that the amount of enzyme bound to the carriers as well as the activity of immobilised inulinase depend on the concentration of hydrogen ions. It was shown that the value of the sorption parameter reaches its maximum value at pH 4.7-5.0. We observed the highest amount of sorbed protein using cation exchangers C100H (0.95 mmol/g) and C104 (0.88 mmol/g). The activity of the obtained heterogeneous biocatalysts at this level of the medium pH is 64.8-83.5% of the activity of free inulinase.

We also studied the effect of temperature (in the range of 40-70 °C) on the inactivation of free and bound inulinase at the optimum pH of the medium. The kinetic parameters of the inactivation process were calculated. We determined that in the considered temperature range, the inactivation constants and activation energy of immobilised inulinase are lower compared to the native enzyme. The observed regularities suggest further study and practical use of the heterogeneous biocatalyst.

Keywords: inulinase, immobilisation, catalytic activity, thermal inactivation, inactivation constant, activation energy.

Acknowledgments: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state order to higher education institutions in the sphere of scientific research for 2023-2025, project FZGU-2023-0009.

For citation: Shkutina I.V., Mironenko N.V., Selemenev V.F., Davydova M.K., Kolomiets L.N. Comparative assessment of the thermostability of free and immobilised inulinase on hypercrosslinked polymers. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(5): 672-681. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12507>

Введение

Одной из актуальных и востребованных задач в настоящее время является создание пищевых продуктов нового поколения с высокоэффективными функциональными свойствами. Приоритетное значение в этом направлении принадлежит доступному растительному сырью, в т.ч., растениям с сахароснижающим эффектом, разработка и внедрение на их основе технологии получения пищевых продуктов диабетического и профилактического назначения. Инулинсодержащее растительное сырье считается одним из перспективных возобновляемых источников получения глюкозофруктозного сиропа с высоким содержанием фруктозы. Основными преимуществами процесса превращения инулина во фруктозу с помощью инулиназы (2,1-β-D-фруктан-

фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7), по сравнению с классическим кислотным гидролизом, являются использование реакционной среды с более высоким значением pH и более низкой температуры [1-5].

Актуальность данной технологии обусловлена широким применением фруктозы в пищевой и фармацевтической промышленности. Существенным преимуществом данного моносахарида является то, что он почти в два раза слаще сахара, имея при этом в два раза меньший гликемический индекс, не вызывает аллергических реакций, хорошо усваивается без участия инсулина [6,7].

Необходимыми производственными параметрами ферментативного гидролиза являются оптимальная степень конверсии субстрата и обеспечение бактерицидных условий реакционной смеси, которые выполняются при температуре 50-

55°C [8,9]. Однако повышение температуры может оказать существенное влияние на конформационные изменения структуры белка, результатом которых является инактивация энзима.

Использование полимерных, нерастворимых в воде сорбентов для адсорбционной иммобилизации ферментов считается одним из эффективных способов регуляции чувствительности ферментов к изменению физико-химических свойств среды. В работах [10-19] описываются разные по структуре носители и различные примеры модификации инулиназы (ковалентной иммобилизации, включения в структуру полимерных гелей, сорбции на носителях и др.), проводится сравнение устойчивости к денатурирующим факторам среды модифицированных препаратов с нативным ферментом. Однако, следует отметить, что в промышленности преимущественно применяются гетерогенные биокатализаторы на основе биомакромолекул, адсорбированных на твердых сорбентах [20,21].

В данной работе проведено исследование влияния температуры на процессы инактивации свободного и иммобилизованного на сверхсшитых ионообменниках фермента с целью выбора более оптимального носителя для биокаталитического гидролиза инулинсодержащего сырья.

Экспериментальная часть

Объектом исследования в работе являлась инулиназа *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich), в качестве субстрата использовали инулин (Spofa). Сорбентами выступали стиролдивинилбензолные ионообменники (Purolite), имеющие удельную поверхность до 1500 м²/г и развитую систему макропор [22]: сильнокислотный катионообменник С100Н с сульфогруппами –SO₃H; слабокислотный катионообменник С104, содержащий карбоксильные группы –COOH; высокоосновный анионообменник А-500R с четвертичными аммониевыми основаниями –

N⁺(CH₃)₃; слабоосновный анионообменник А100, содержащий преимущественно третичные аминогруппы =N⁺(CH₃)₂. Кондиционирование сорбентов проводили по методике, указанной в [23].

Иммобилизацию инулиназы осуществляли в статических условиях (t=20±3°C), приводя в контакт навеску сорбента массой 1.0000±0.0002 г и раствор фермента на основе ацетатного буфера с концентрацией 2.0·10⁻² ммоль/дм³. Диапазон величин рН составил от 3.2 до 6.0. Время, необходимое для установления равновесия, – 240 мин.

Количество сорбированного белка определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu UV-2401) по разности его содержания в растворе до и после сорбции (S=0.01). В ходе эксперимента было установлено, что количество десорбированного фермента в буферный раствор не превышало 1.8%.

Каталитическую активность исследовали методом спектрофотометрии (реакция Селиванова [24]) в термостатируемых условиях при постоянном перемешивании.

Для расчета активности инулиназы использовали формулу:

$$A = \frac{a}{180bt} \quad (1)$$

где А – каталитическая активность, Е/мг; а – количество фруктозы, мкмоль; b – количество фермента в реакционной смеси, мг/см³ гидролизата; t – время гидролиза, мин; 180 – молекулярная масса фруктозы.

Исследование термоинактивации фермента (в нативном и иммобилизованном состояниях) проводили в 0.1 М ацетатном буферном растворе (рН= 4.7, t=40-70°C) по следующей методике: смешивали растворы, содержащие одинаковые объемы ацетатного буфера, и раствора инулиназы, затем добавляли десятикратное количество иммобилизованного препарата. В выше приведенных условиях проводили инкубацию, затем через определенные проме-

жутки времени определяли остаточную активность образцов (раствор сравнения – 5·10⁻⁴ М инулин).

Обсуждение результатов

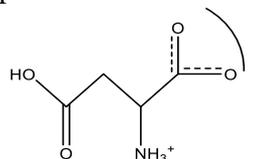
В процессе иммобилизации следует учитывать особенности фермента как адсорбата, которые были отмечены, в частности, и для инулиназы: наличие на поверхности молекулы фермента различных по способности к адсорбционным взаимодействиям участков; возможность формирования в растворах ассоциатов, отличающихся по конфигурации и выступающих в роли автономных субъединиц в сорбционных процессах [25].

Известно, что кислотность среды, в которой протекает взаимодействие фермента с носителем, оказывает влияние на механизм связывания, поскольку содержание протонов в растворе определяет заряды функциональных групп сорбента, белка и субстрата, а, следовательно, и кинетику диффузионных процессов с их участием.

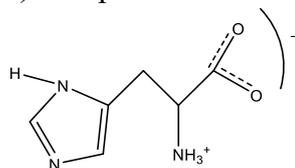
Активный центр инулиназы содержит карбоксильные группы глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, а также группу имидазола в составе гистидина. Аспарагиновая кислота способна существовать в форме нескольких ионов с $pK_{(1)}=1.88$, $pK_{(2)}=9.60$, $pK_{(R)}=3.65$. Изoeлектрическая точка pI (при которой содержание цвиттер-иона максимально) для аспарагиновой кислоты находится при $pH=2.98$ (схема, рис.1). Гистидин ($pK_{(1)}=1.70$, $pK_{(2)}=9.10$, $pK_{(R)}=6.04$,

схема, рис.2) относится к ароматическим α -аминокислотам со слабо выраженными основными свойствами, обусловленными присутствием в молекуле остатка имидазола.

Схема. Структурные формулы биполярных ионов:



а) аспарагиновой кислоты;



б) гистидина.

Максимальная величина сорбционного параметра при поглощении инулиназы наблюдается в области изоэлектрической точки белка при pH от 4.7 до 5.2 (рис.3), при котором сводится к минимуму электростатическое отталкивание между молекулами. При этом большее количество белка адсорбируется на катионообменниках С100Н (0.95 ммоль/г) и С104 (0.88 ммоль/г), в то время как для анионообменников А100, А500R данная зависимость выражена слабее.

Сорбционное поглощение инулиназы матрицей сверхсшитых сорбентов сопровождается образованием супрамолекулярных комплексов с возникновением связей различной природы [26]. Следует отметить, что количество иммобилизо-

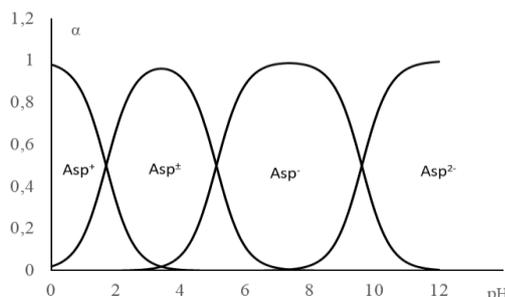


Рис. 1. Диаграмма ионных форм аспарагиновой кислоты.

Fig. 1. Diagram of ionic forms of aspartic acid.

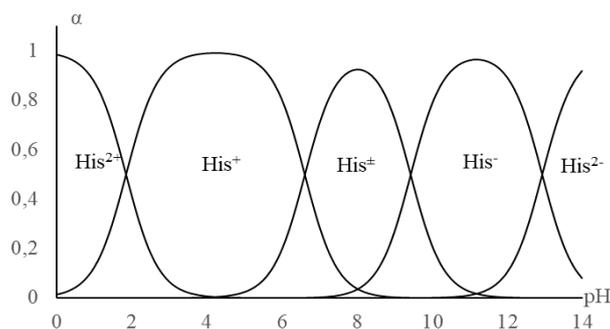


Рис. 2. Диаграмма ионных форм гистидина.
 Fig. 2. Diagram of ionic forms of histidine.

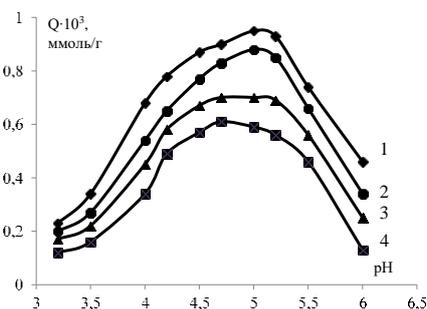


Рис. 3. Зависимость количества сорбированной инулиназы (Q, ммоль/г) на С100Н (1), С104 (2), А500R (2), А100 (3) от рН равновесного раствора.
 Fig. 3. Dependence of the amount of sorbed inulinase (Q, mmol/g) on С100Н (1), С104 (2), А500R (2), А100 (3) on the рН of the equilibrium solution.

ванного фермента значительно превышает число сорбционных центров сорбата, что обусловлено формированием ассоциатов (ди-, тримеров) в его фазе. Дифильные рецепторы, в молекулах которых сочетаются полярные или заряженные участки с гидрофобным остатком, который защищает их от гидратации и усиливает электростатическое притяжение, способствуют множественному распознаванию и формированию в матрице носителя структурированных фаз.

При иммобилизации для каждого значения рН контролировалась величина каталитической активности гетерогенного биокатализатора (рис. 4). При рН 4.7 активность препаратов инулиназы, иммобилизованной на С100Н, составляет 83.5%, на А500R – 78.4%, С104 – 71.8%, А100 – 64.8 % от активности нативной инулиназы (2500 Е/г). Разрыв гликозидных связей в молекуле субстрата осуществляется благодаря электрофильно-

нуклеофильной атаке системой карбоксил-имидазол инулиназы. Значительную роль при этом играет фактор гидратации/дегидратации функциональных групп фермента. [27].

Несмотря на то, что доступность активного центра фермента для инулина после его иммобилизации на ионообменниках значительно снижается и происходит уменьшение максимальной скорости реакции гидролиза инулина и каталитической активности полученных биокатализаторов, их существенным преимуществом (в сравнении со свободной инулиназой) является возможность повторного применения, что приводит к увеличению количества полученного продукта.

Термостабильность фермента – важнейший фактор, определяющий его практическое применение в промышленном производстве, поскольку в условиях высоких температур значительно возрастает скорость реакции, понижается вязкость

раствора и возможность его бактериального загрязнения.

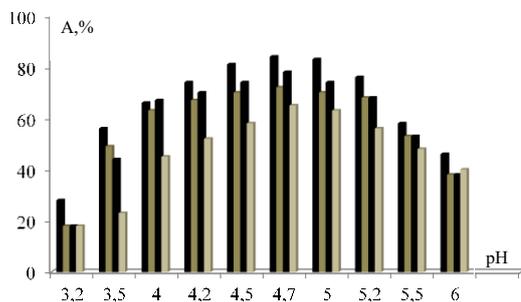


Рис.4. Зависимость каталитической активности (А%, в процентах от активности нативной инулиназы) иммобилизованной на С100Н (1), С104 (2), А500R (3), А100 (4) инулиназы от рН равновесного раствора.

Fig.4. Dependence of the catalytic activity (А%, as a percentage of the activity of native inulinase) of inulinase immobilized on С100Н (1), С104 (2), А500R (3), А100 (4) on the рН of the equilibrium solution.

Для оценки термоинактивации был выбран препарат на основе инулиназы, иммобилизованной на катионообменнике С100Н, обладающий максимальным значением каталитической активности среди рассматриваемых гетерогенных биокатализаторов. На рис. 5-6 представлены кинетические кривые процесса инактивации фермента в свободной и иммобилизованной формах ($t=40-70^{\circ}\text{C}$, рН 4.7). Кинетика данного процесса удовлетворительно описывается уравнением первого порядка. Константа скорости инактивации является мерой, определяющей степень стабильности молекулы фермента, и может быть вычислена по формуле:

$$k = \frac{2,303}{\tau} \lg \frac{[A_0]}{[A]}, \quad (2)$$

где k – константа инактивации, мин^{-1} ; $[A_0]$ – исходная активность инулиназы, принятая за 100%; $[A]$ – активность фермента в момент времени τ , в % от исходной; τ – время, мин.

Используя рассчитанные константы инактивации, на основании теории абсолютных скоростей реакций [28,29] были

оценены значения энергии активации активного комплекса при различных темпе-

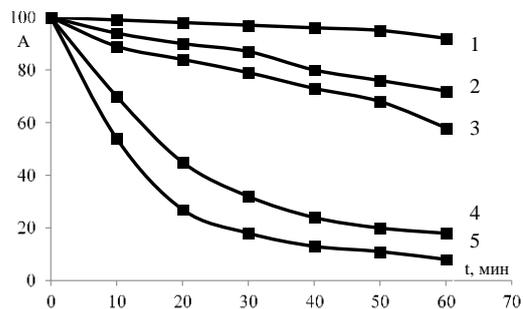


Рис.5. Кинетические кривые термоинактивации свободной инулиназы: 1 – 40; 2 – 50; 3 – 60; 4 – 65; 5 – 70, °С. А – активность (% от максимальной); t – время инкубации, мин.

Fig.5. Kinetic curves of thermal inactivation of free inulinase: 1 – 40; 2 – 50; 3 – 60; 4 – 65; 5 – 70, °С. А – activity (% of maximum); t – incubation time, min.

ратурах (табл.):

$$E_{\text{акт}} = 2.303 R t g \alpha, \quad (3)$$

Проведенные исследования показали, что во всем изученном интервале температур наблюдается необратимая термоинактивация инулиназы. Установлено, что в диапазоне температур $40-60^{\circ}\text{C}$ происходит постепенное уменьшение каталитической активности препаратов как свободного, так и иммобилизованного фермента, что связано, вероятно, с разрушением электростатических и водородных связей. Однако, при сопоставлении значений констант скорости термоинактивации нативного и иммобилизованного биокатализатора можно сделать вывод о положительном влиянии иммобилизации на стабильность инулиназы при температуре, отличной от оптимальной. Так, при 60°C константа инактивации после часа инкубации для иммобилизованного фермента в 2.5 раза ниже, чем для свободного энзима.

Очевидно, что повышение температуры приводит к существенным изменениям пространственной структуры белка, в связи с чем возрастает энергетический

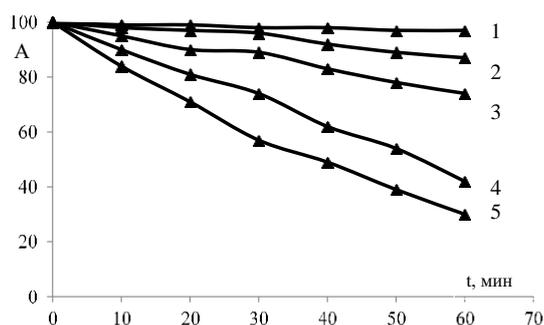


Рис. 6. Кинетические кривые термоинактивации иммобилизованной инулиназы: 1 – 40; 2 – 50; 3 – 60; 4 – 65; 4 – 70, °С. А – активность (% от максимальной); t – время инкубации, мин.
 Fig. 6. Kinetic curves of thermal inactivation of immobilized inulinase: 1 – 40; 2 – 50; 3 – 60; 4 – 65; 4 – 70, °С. А – activity (% of maximum); t – incubation time, min.

Таблица. Кинетические параметры инактивации свободного и иммобилизованного биокатализаторов

Table. Kinetic parameters of inactivation of free and immobilized biocatalysts

Температура, °С	Инулиназа	А, %	$k \cdot 10^{-3}$, мин ⁻¹	$\Delta E_{\text{акт}}$, кДж/моль
40	Свободная	92	1.76	1665
	Иммобилизованная	97	0.84	147.8
50	Свободная	72	4.73	190.4
	Иммобилизованная	87	2.08	156.7
60	Свободная	58	9.15	221.3
	Иммобилизованная	74	3.85	183.5
65	Свободная	18	25.82	325.9
	Иммобилизованная	42	8.74	198.4
70	Свободная	8	42.34	413.8
	Иммобилизованная	30	13.88	210.6

барьер реакции катализа, препятствующий образованию фермент-субстратного комплекса. Рассчитанное значение энергии активации для инулиназы для низкотемпературной области (табл.), вероятно, характеризует процесс диссоциации олигомерной структуры на субъединицы.

Значительное снижение активности фермента отмечено при температуре 70°C. Спустя 60 мин инкубации свободная инулиназа сохраняет только 8% от исходного значения активности, в то время как иммобилизованная – 30%. Причиной уменьшения активности может служить разворачивание полипептидной цепи в результате разрыва гидрофобных связей, отвечающих за стабильность белковой глобулы.

В области температур 65-70°C энергия активации фермента в свободном виде (414 кДж/моль) более чем в 2 раза больше энергии активации связанного фермента (211 кДж/моль). Подобные зависимости, происходящие в процессе инактивации, характерны для иммобилизованной инулиназы и других штаммов [30,31]. Можно полагать, что сорбционное поглощение фермента приводит к возрастанию устойчивости его третичной структуры, снижению вероятности конформационных изменений биомакромолекулы.

Заключение

Проведено исследование адсорбционного взаимодействия фермента инулиназы с полимерными ионообменниками различной природы (С100Н, С104,



A500R, A100), изучено влияние температуры на активность инулиназы в свободной и иммобилизованной формах.

Показано, что оптимальными условиями адсорбции является значение $pH=4.7-5.0$, содержание инулиназы в растворе – $2.0 \cdot 10^{-2}$ ммоль/дм³, позволяющие получить продукт – гетерогенный биокатализатор с каталитической активностью 64.8-83.5% (от активности фермента в

свободном состоянии) и большей устойчивостью к денатурирующим факторам среды.

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.

Список литературы/References

1. Hafiz M.B., Iqbal M.N., State-of-the-art strategies and applied perspectives of enzyme biocatalysis in food sector - current status and future trends, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020; 60(12): 2052-2066. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1627284>
2. Baranova, A.G., Zajko G.M., Razrabotka tehnologii instantnyh produktov dlja pitaniya diabetikov, *News of universities. Food technology*, 2014; 2-3: 29-31. (In Russ.)
3. Rochf J.R., Catana R., Ferreira B.S., Cabral J.M.S., Fernandes P., Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis, *Food Chemistry*, 2006; 95: 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.020>
4. Xu Y., Zheng Z., Xu Q., Yong Q., Ouyang J., Efficient conversion of inulin to inulooligosaccharides through endoinulinase from *Aspergillus niger*, *J. Agric. Food Chem.*, 2016; 64(12): 2612-2618. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05908>
5. Chi Z.-M., Zhang T., Cao T.-Sh., Liu X.-Y., Cui W., Zhao Ch.-H., Biotechnological potential of inulin for bioprocesses, *Bioresour. Technol.*, 2011; 102(6): 4295-4303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.086>
6. Singh R.S., Singh R.P., Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential, *Food Technol. Biotechnol*, 2010; 48(4): 435-450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132253>
7. Singh R.S., Chauhan K., Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases, *Curr. Biotechnol.*, 2018; 7(3): 242-260. <https://doi.org/10.2174/2211550105666160512142330>
8. Ali S., Shahzadi H., Nutritional optimizations for improved exo-inulinase production from *Aspergillus oryzae* for high fructose syrup preparations, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2015; 4(5): 618-631.
9. Ricca E., Calabrò V., Curcio S., Iorio G., The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007; 27(3): 129-145. <https://doi.org/10.1080/07388550701503477>
10. Santa G.L., Bernardino S.M., Magalhães S., Mendes V., Marques M.P., Fonseca L.P., Fernandes P., From inulin to fructose syrups using sol-gel immobilized inulinase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011; 165: 2-12. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9228-9>
11. Ricca E., Calabrò V., Curcio S., Basso A., Gardossi L., Iorio G., Fructose production by inulinase covalently immobilized on sephabeads in batch and fluidized bed bioreactor, *Int. J. Mol. Sci.*, 2010; 11(3): 1180-1189. <https://doi.org/10.3390/ijms11031180>
12. Beran M., Pinkrová J., Urban M., Drahorád J., Immobilisation of endoinulinase on polyhydroxybutyratemicrofibres, *Czech. J. Food Sci.*, 2016; 34(6): 541-546. <https://doi.org/10.17221/72/2016-cjfs>
13. Holyavka M.G., Koroleva V.A., Makin S.M., Olshannikova S.S., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V.,



- Kayumov A.R., Artyukhov V.G., Mechanisms of the adsorption immobilization of inulinase on ion-exchangers AV-17-2P and KU-2 matrices, *Bulletin of Voronezh State University. Series «Chemistry. Biology. Pharmacy»*, 2017; 3: 86-90. (In Russ.)
14. Juliano Missau J., Scheid A.J., Falletto E.L., Jahn S., Marcio A, Mazutti M., Kuhn R., Immobilization of commercial inulinase on alginate-chitosan beads, *Sustainable Chemical Processes*. 2014; 2(1): 13-27. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-2-13>
15. Karimi M., Habibi-Rezaei M., Rezaei K., Moosavi-Movahedi A., Kokin J., Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* on octadecyl substituted nanoporous silica; Inulin hydrolysis in a continuous mode operation, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016; 7: 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.001>
16. Altunbaş C., Uygun M., Uygun D.A., Akgöl S., Denizli A., Immobilization of inulinase on concanavalin A-attached super macroporous cryogel for production of high-fructose syrup, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013; 170(8): 1909-1921. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0322-z>
17. Silva F.R., Santana C.C., Adsorption of inulinases in ion-exchange columns, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2000; 84: 1063-1078. <https://doi.org/10.1385/abab:84-86:1-9:1063>
18. de Oliveira G., Kuhn G., Rosa C.D., Silva M.F., Treichel H., de Oliveira D., Oliveira J.V., Synthesis of fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* commercial inulinase immobilized in montmorillonite pretreated in pressurized propane and LPG, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013; 169(3): 750-760. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0007-z>
19. Yewale T., Singhal R.S., Vaidya A.A., Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2013; 2: 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.01.001>
20. Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J., Fernandez-Lafuente R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007; 40(6): 1451-1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
21. Liese A., Hilterhaus L., Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications, *Chemical Society Reviews*, 2013; 42(15): 6236-6249. <https://doi.org/10.1039/c3cs35511j>
22. Cjurupa M.P., Blinnikova Z.K., Pavlova L.A., Pastuhov A.V., Davankov V.A., Sverhshhitomu polistirolu polveka: ot netrivial'noj idei do promyshlennoj, *Laboratory and production*, 2020; 11(1): 86-96. (In Russ.) <https://doi.org/10.32757/2619-0923.2020.1.11.86.96>
23. Selemenev V.F., Slavinskaja G.V., Hohlov V.Ju., Ivanov V.A., Gorshkov V.I., Timofeevskaja V.D. Praktikum po ionnomu obmenu. Voronezh, Voronezh University Publishing House, 2004, 160 p. (In Russ.)
24. Nakamura T., Nakatsu S., General properties of extracellular inulinase from *Penicillium*, *J. Agr. Chem. Loc. Jap.*, 1997; 1(12): 681-689.
25. Holjavka M.G., Dubovickaja A.N., Sakibaev F.A., Shkutina I.V., Mironenko N.V., Selemenev V.F., Artjuhov V.G., Zakonomernosti adsorbtsionnoj immobilizatsii inulinaz na voloknistykh polijelektrolitah AK-22, AK-22-1, K-1, K-4, K-5, *Sorbtsionnye i khromatograficheskiye protsessy*, 2020; 20(4): 523-538. (In Russ.) <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2020.20/2957>
26. Shkutina I.V., Mironenko N.V., Selemenev V.F., Application of super-cross-linked polymers as carriers of heterogeneous biocatalysts for inulin hydrolysis reaction, *ChemChemTech.*, 2022; 65(8): 48-54. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226508.6559>
27. Selemenev V.F., Shkutina I.V., Mironenko N.V., Belanova N.A., Sinjaeva L.A., Belanova A.A., Kolomic L.N., Ob osobennostyah stroenija aktivnogo centra i chetvertichnoj struktury inulinazy,



Sorbtsionnye i khromatograficheskiyec protsessy, 2023; 23(5): 741-752. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2023.23/11692> (InRuss.)

28. Varfolomeev S.D Himicheskaja jenzimologija. Moscow, Academy Publ., 2005, 480 p. (In Russ.)

29. Bajramov V.M Osnovy himicheskoy kinetiki i kataliza. Moscow, Academy Publ., 2003. 256 p. (In Russ.)

30. Catana R., Eloy M., Rocha J.R., Ferreira B.S., Cabral J.M.S., Fernandes P., Stability evaluation of an immobilized enzyme

system for inulin hydrolysis, *Food Chem.*, 2007; 101: 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.042>

31. Garuba E., Onilude A., Immobilization of thermostable exo-inulinase from mutant thermophilic *Aspergillus tamarii*-U4 using kaolin clay and its application in inulin hydrolysis, *J Genet Eng Biotechnol.*, 2018; 16(2): 341-346. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.009>

Информация об авторах / Information about the authors

И.В. Шкутина – к.б.н.; доцент кафедры общей и медицинской химии им. проф. В.В.Хорунжего Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, г. Санкт-Петербург; Санкт-Петербург, Россия

Н.В. Мироненко – к.х.н.; доцент кафедры естественнонаучных дисциплин, доцент кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, Россия

В.Ф. Селеменев – д.х.н.; профессор кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, Россия

М.К. Давыдова – к.х.н.; доцент кафедры общей и медицинской химии им. проф. В.В.Хорунжего Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, Санкт-Петербург, Россия

Л.Н. Коломиец – к.х.н., старший научный сотрудник, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

I.V. Shkutina – PhD, assistant professor of General and Medical Chemistry Department named after prof. V.V. Khorunzhii, State Pediatric Medical University, St. Petersburg; Russia, e-mail: irn55@mail.ru

N.V. Mironenko – PhD, assistant professor of the Department of Natural Sciences, assistant professor of Analytical Chemistry Department of Chemistry Faculty, Voronezh State University, Voronezh; Russia, e-mail: natashamir@yandex.ru

V.F. Selemenev – doctor of science, professor of Analytical Chemistry Department of Chemistry Faculty, Voronezh State University, Voronezh, Russia; e-mail: common@chem.vsu.ru

M.K. Davydova – PhD, assistant professor of General and Medical Chemistry Department named after prof. V.V. Khorunzhii, State Pediatric Medical University, St. Petersburg; Russia, e-mail: mkd69@mail.ru

L.N. Kolomiets – researcher, Ph.D. Frumkin Institute of Physical and Electrochemistry, Moscow, Russia; e-mail: kolom_moscow@mail.ru

Статья поступила в редакцию 16.07.2024; одобрена после рецензирования 12.09.2024; принята к публикации 18.09.2024.

The article was submitted 16.07.2024; approved after reviewing 12.09.2024; accepted for publication 18.09.2024.