



УДК 66.081:577.15:577.32:543.42

Закономерности адсорбционной иммобилизации инулиназы на волокнистых полиэлектролитах АК-22, АК-22-1, К-1, К-4, К-5

© 2020 Холявка М.Г.¹, Дубовицкая А.Н.¹, Сакибаев Ф.А.¹, Шкутина И.В.², Мироненко Н.В.¹, Селеменев В.Ф.¹, Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет, Воронеж

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 14.04.2020 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2020.20/2957

Инулиназы (КФ 3.2.1.7 и 3.2.1.80) представляют собой гидролитические ферменты, которые разрушают β -1,2-фруктановые связи. Эти биокатализаторы широко используются в промышленном производстве фруктозы, фруктозных сиропов и фруктоолигосахаридов. Однако применение свободных форм ферментов имеет ряд недостатков: низкая термостабильность, сложность разделения макромолекул биокатализатора и конечного продукта, невозможность повторного использования. Указанные проблемы могут быть решены путем иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях. В связи с вышеизложенным, целью работы было изучение закономерностей адсорбционной иммобилизации инулиназы на волокнистых полиэлектролитах.

Проведена адсорбционная иммобилизация инулиназы на волокнистых полиэлектролитах АК-22, АК-22-1, К-1, К-4 и К-5. Исследовано влияние продолжительности процесса сорбции на количество иммобилизованного белка и активность гетерогенного катализатора. Адсорбция становится максимальной через 4 часа при концентрации раствора инулиназы $1 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ и через 2 часа при концентрациях $5 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³. Самая высокая каталитическая способность иммобилизованного фермента соответствует наибольшему количеству сорбированного белка. Активность гетерогенного биокатализатора составляет от 44.5 до 71.2% от активности нативного фермента.

Установлено, что в начальный момент процесса иммобилизации идет активное образование ассоциатов белка, в результате чего его сорбция резко возрастает, и на кинетической кривой появляется максимум. Однако со временем происходит выделение фермента в фазу растворителя, и на кинетической кривой наблюдается спад. Процесс десорбции на этом этапе возможен из-за малой энергии взаимодействия между молекулами сорбата и сорбента и, следовательно, слабого закрепления молекул белка на полимере-носителе. Затем, с течением времени, адсорбция становится необратимой. Таким образом, с увеличением продолжительности реакции изменялась не только структура образующихся полиэлектролитных комплексов, но и их состав: в процессе перестройки комплексов происходит выделение части молекул белка в раствор. Ассоциаты макромолекул инулиназы (при ее концентрациях в растворе $1 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³), по-видимому, сорбируются только на поверхности носителя, что обеспечивает доступность активных центров фермента и, как следствие, высокую каталитическую активность иммобилизованного ферментного препарата.

С помощью метода инфракрасной спектроскопии было обнаружено, что иммобилизация инулиназы происходит вследствие реализации слабых водородных связей и электростатических взаимодействий между ферментом и носителем.

Ключевые слова: инулиназа, иммобилизация, адсорбция, гетерогенный катализатор, каталитическая активность.

Введение

В настоящее время возрастает интерес исследователей к промышленным процессам с использованием возобновляемого растительного сырья. Одним из наиболее перспективных субстратов для получения фруктозных сиропов являются экстракты инулинсодержащих растений. Сироп с высоким содержанием фруктозы – это подсластитель, используемый в пищевой промышленности в качестве заменителя сахара. Фруктоза обладает рядом полезных свойств, таких как высокая растворимость, влагостойкость, устойчивость к высушиванию. Фруктоза в полной мере удовлетворяет требованиям диетического питания, и, кроме того, фруктозные сиропы дешевле сахара [1]. Одним из методов получения фруктозы является гидролиз инулина. При этом данный процесс может осуществляться кислотным или ферментативным способом. Ферментативный гидролиз протекает при более мягких условиях и при этом не образуется побочных соединений, которые осложняют выделение и очистку конечного продукта [2].

Инулиназа – фермент, специфически гидролизующий β -1,2-фруктановые связи в инулине [3-5]. Инулиназы подразделяются на эндо- и экзоинулиназы в зависимости от способа воздействия на инулин. Эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7) гидролизуют внутренние связи молекулы инулина с образованием смеси инулоолигосахаридов с различной степенью полимеризации [6-9]. Экзоинулиназы (КФ 3.2.1.80) последовательно отщепляют концевые фруктозные звенья от молекулы инулина, а также способны к гидролизу сахарозы и раффинозы [1, 5, 8].

Использование свободных ферментов имеет ряд недостатков, так как при осуществлении промышленного процесса возникают трудности с их отделением от продуктов реакции. Кроме того, в нативном состоянии ферменты обладают относительно низкой стабильностью и, соответственно, требуется большое их количество. Эти недостатки можно устранить путем иммобилизации их макромолекул [10-12].

Установлено, что иммобилизация инулиназы на ионообменных полимерах ВИОН КН-1, АВ-16ГС и АМ 21А приводит к смещению температурного оптимума от 50 к 70°C с частичным сохранением каталитической способности при 85-95°C [13]. Кроме того, иммобилизация дает возможность многократно использовать гетерогенный биокатализатор [14]. Для α -амилазы была показана перспектива ее применения в реакции гидролиза крахмала в течение 10 циклов при иммобилизации на аминокарбоксильном ионообменнике АК-22-1 [15].

В настоящее время значительная часть промышленно применяемых иммобилизованных ферментов представляет собой молекулы, адсорбированные на твердых носителях [16-18]. На сегодняшний день из общей группы синтетических полимеров особый интерес представляют ионообменные материалы, обладающие комплексообразующими свойствами [19]. Среди полиамфолитов наиболее перспективными являются ионообменные волокна, содержащие в своей структуре как кислотные, так и основные функциональные группы [20]. Их достоинством является сочетание большого количества ионообменных групп в волокне с такими физико-химическими и механическими характеристиками, как регулируемые величины набухания в водных растворах, осмотическая стабильность, химическая стойкость в кислых, щелочных, окисляющих средах [21, 22].

В связи с вышесказанным, целью работы было исследование закономерностей адсорбционной иммобилизации инулиназы на волокнистых полиэлектролитах.

Экспериментальная часть

Объектом исследований служила инулиназа, выделенная из экстракта поверхностной культуры гриба *Aspergillus awamori* ВКМФ-2250 с 85-кратной степенью чистоты и 5% выходом [23]. На электрофореграммах фракций фермента отмечено наличие одной полосы, что свидетельствует о гомогенности полученных препаратов. Электрофорез на специфичность показал, что образцы проявляют инулиназную активность. Молекулярная масса полученного фермента составила 88 кДа [24].

В работе были использованы волокнистые полиэлектролиты в Н-форме марки ФИБАН: АК-22, АК-22-1, К-1, К-4, К-5. В табл. 1 представлены некоторые характеристики указанных ионообменных волокон [20, 25].

Таблица 1 Характеристика носителей для иммобилизации инулиназы
Table 1. Characteristics of the carriers used to immobilise inulinase

Марка сорбента (Н-форма)	Функциональные группы	Статическая обменная емкость, ммоль/г	
		По кислотным группам	По основным группам
АК-22		≤1.0	2.1
АК-22-1		≤1.0	2.25
К-1		3.0	отсутств.
К-4		4.7	отсутств.
К-5		5.5	0.5

Растворы инулиназы необходимых концентраций готовили дозированием навесок фермента, взвешенных на аналитических весах с точностью $1 \cdot 10^{-4}$ г, в 0.1 М ацетатный буферный раствор с рН 4.7. Сорбция инулиназы на полимерах осуществлялась в статических условиях при комнатной температуре. Для этого навески ионообменника, высушенные до воздушно-сухого состояния, в количестве 0.5 г помещали в колбы и заливали 50 см^3 раствора инулиназы определенной концентрации. После достижения равновесия сорбенты отделяли от раствора и высушивали до воздушно-сухого состояния.

Содержание белка в растворах инулиназы определяли по методу Лоури [26, 27]. Для иммобилизованной инулиназы использовали модифицированный метод Ло-

ури. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между матрицей носителя и молекулой фермента. Для этого обрабатывали иммобилизованный препарат раствором К,Na-гартрата, приготовленным на 1 М NaOH при 50°C в течение 10 мин [28].

Измерение каталитической активности инулиназы осуществляли спектрофотометрически при помощи реакции Селиванова на фруктозу [29]. В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP Biomedicals. Активность инулиназы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{a}{b \cdot 180 \cdot t},$$

где A – каталитическая активность инулиназы, ед/мг; a – количество фруктозы, мкг; b – количество фермента (свободного или иммобилизованного) в реакционной смеси, мг/см³ гидролизата; t – время гидролиза, мин; 180 – молекулярная масса фруктозы.

За единицу инулиназной активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль фруктозы за 1 мин.

Количество сорбированной инулиназы (Q) определяли по формуле:

$$Q = \frac{(C_1 - C_2) \cdot V}{g},$$

где V – объем раствора, C_1 – концентрация исходного раствора, C_2 – концентрация равновесного раствора, g – навеска воздушно-сухого ионообменника.

Подготовку препаратов для ИК-спектроскопии осуществляли следующим образом: образцы сорбентов после контакта с растворами инулиназы (иммобилизации) отфильтровывали и высушивали до постоянной массы. Высушенные образцы растирали в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния. Затем навеску ионообменника в количестве 1.5 мг тщательно перемешивали в агатовой ступке в течение 10 мин с 150 мг подготовленного KBr. Далее отвешивали 100 мг смеси и переносили в пресс-форму. Время запрессования – 30 мин, рабочее давление – 150 кг/см². ИК-спектры регистрировали в области 4000-400 см⁻¹ на спектрометре Инфралюм ФТ-02 [30].

Обсуждение результатов

На первом этапе работы было исследовано влияние продолжительности процесса сорбции на количество иммобилизованного белка и каталитическую активность препаратов инулиназы.

На рис. 1-3 видно, что максимальная степень сорбции белка для рассматриваемых полимеров достигается за разные промежутки времени. При концентрации раствора инулиназы $1 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ максимальная адсорбция наблюдается за 4 часа, а для концентраций $5 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³ – за 2 часа. Далее происходит уменьшение количества иммобилизованной инулиназы, и в среднем за 6 часов устанавливается равновесие. Количество сорбированного белка составляет от 5.63 до 9.62 мг/г носителя (от $6.40 \cdot 10^{-8}$ до $10.93 \cdot 10^{-8}$ моль/г носителя) (табл. 2).

Наблюдаемый ход кинетических кривых можно объяснить следующим образом: в начальный момент времени идет активное образование ассоциатов белка, в результате чего его сорбция резко возрастает, и на кинетической кривой появляется максимум. В ряде случаев такие закономерности наблюдаются при адсорбции биомакромолекул [31, 32]. Однако со временем происходит выделение фермента в фазу растворителя, и на кинетической кривой наблюдается спад. Процесс десорбции на этом этапе возможен из-за малой энергии водородных связей и электростатических

взаимодействий между молекулами сорбата и сорбента и, следовательно, слабого закрепления молекул белка на полимере-носителе. Затем, с течением времени, адсорбция становится необратимой [31, 32].

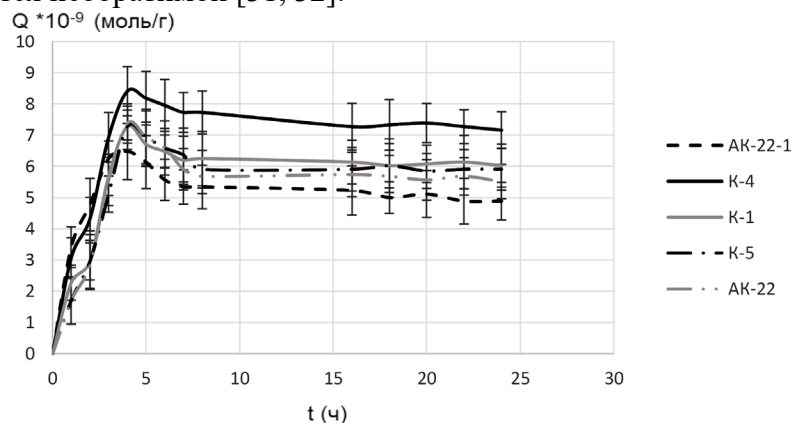


Рис. 1. Кинетические кривые сорбции инулиназы на волокнистых полиэлектролитах при концентрации исходного раствора инулиназы $1 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³

Fig. 1. Kinetic curves of the inulinase sorption on fibrous polyelectrolytes with a concentration of the initial inulinase solution of $1 \cdot 10^{-7}$ mmol/l

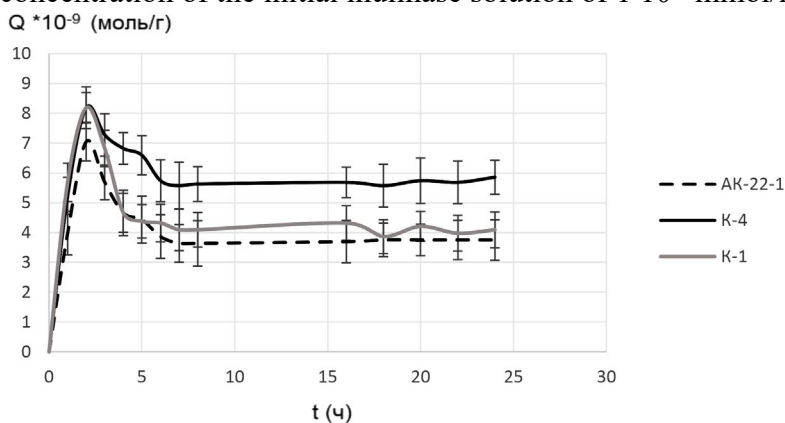


Рис. 2. Кинетические кривые сорбции инулиназы на волокнистых полиэлектролитах при концентрации исходного раствора инулиназы $5 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³

Fig. 2. Kinetic curves of the inulinase sorption on fibrous polyelectrolytes with a concentration of the initial inulinase solution of $5 \cdot 10^{-7}$ mmol/l

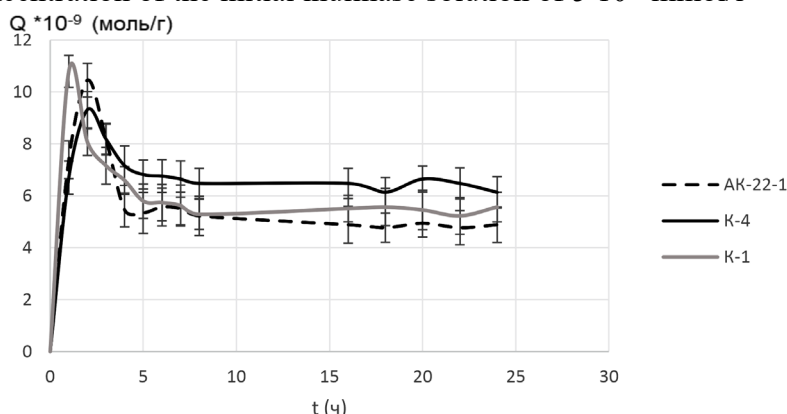


Рис. 3. Кинетические кривые сорбции инулиназы на волокнистых полиэлектролитах при концентрации исходного раствора инулиназы $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³

Fig. 3. Kinetic curves of the inulinase sorption on fibrous polyelectrolytes with a concentration of the initial inulinase solution of $1 \cdot 10^{-6}$ mmol/l

Таблица 2. Характеристика препаратов иммобилизованной инулиназы
Table 2. Characteristics of the immobilised inulinase preparations

Марка ионита	Концентрация раствора инулиназы, моль/л								
	10^{-7} , моль/дм ³			$5 \cdot 10^{-7}$, моль/дм ³			10^{-6} , моль/дм ³		
	q, мг/г/ t, ч	q·10 ⁻⁸ , моль/г/ t, ч	A, %	q, мг/г/ t, ч	q·10 ⁻⁸ , моль/г/ t, ч	A, %	q, мг/г/ t, ч	q·10 ⁻⁸ , моль/г/ t, ч	A, %
АК-22-1	5.63/4	6.40/4	54.8	6.21/2	7.06/2	57.1	9.20/2	10.45	61.0
К-4	7.41/4	8.42/4	65.8	7.45/2	8.47/2	71.2	8.44/2	9.59	67.5
К-1	6.52/4	7.41/4	60.0	7.60/2	8.64/2	62.5	9.62/1	10.93	58.0
К-6	6.53/4	7.42/4	45.7	6.57/2	7.47/2	52.0	7.35/2	8.35	47.3
АК-22	6.50/4	7.39/4	47.8	6.73/2	7.65/2	49.3	7.61/2	8.65	44.5

Подобные эффекты уже наблюдались нашими коллегами. Проведенный ими анализ кинетических кривых процесса иммобилизации инулиназы и глюкоамилазы показал, что в начальный момент времени контакта сорбента с раствором фермента происходит достаточно резкое увеличение количества белка в фазе носителя, что можно охарактеризовать как ионообменное поглощение энзима. Однако со временем на кинетических кривых отмечается уменьшение количества сорбированного белка. Процесс десорбции на данном этапе, вероятно, связан с возрастающей долей необменно сорбированной гидролазы, и, как следствие, слабым закреплением сорбата на поверхности сорбента и выделением некоторого количества белка в раствор [33].

Сложность фермента как адсорбата связана с неоднородностью его свойств: олигомерностью, присутствием на поверхности неодинаковых контактных участков, возможностью многоточечного связывания макромолекулы с носителем. Поэтому при контакте белка с ионообменными материалами необходимо учитывать не только электростатические, но и возможные ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия между ними [28].

Образованию прочных связей, вероятно, предшествует неспецифическая адсорбция. Специфические взаимодействия возникают не одновременно. Сначала образуются различные состояния с одно- и двухточечными центрами связывания, а за ними следует появление взаимодействий по некоторой контактной линии и, наконец, по определенной контактной плоскости, при этом иммобилизация становится кинетически необратимой [34, 35].

Кроме того, определённый вклад в ход кинетических кривых сорбции инулиназы могут вносить процессы, связанные с набуханием полиэлектролита. Известно, что полимерные цепи ионообменников в отсутствие растворителя «свернуты» в клубок, так как в этом случае имеет место наиболее «упорядоченная» конформация структуры [36, 37]. При внедрении растворителя в сорбенте наблюдается разворачивание полимерных цепей, что соответствует росту неупорядоченных фрагментов, и увеличение энтропии в системе [38].

Среди специалистов по ионному обмену существует мнение, что в процессах сорбции-десорбции растворов в фазу и из фазы ионообменников может в определенных условиях проявляться колебательный характер. На возможность колебательного характера процессов сорбции, например, аминокислот на ионообменниках и сопровождаемых их эффектов набухания, указывают экспериментальные наблюдения в работах [39, 40].

Колебания содержания воды в фазе полимера около стационарного состояния можно объяснить потерей устойчивости этого состояния при определенных кинетических режимах системы. Потеря устойчивости стационарного состояния является частным случаем бифуркации, т.е. изменения при определенном (бифуркационном)

значении какого-либо параметра гетерогенной системы. В пространстве параметров в окрестности этой бифуркации может существовать область, где система обладает, по крайней мере, тремя стационарными состояниями, из которых два устойчивы, а одно - неустойчиво [41].

Таким образом, с увеличением продолжительности реакции изменялась не только структура образующихся полиэлектролитных комплексов (ПЭК), но и их состав: в процессе перестройки ПЭК происходило выделение части макромолекул белка в раствор.

Каталитическая активность является одним из основных свойств полученных гетерогенных биокатализаторов [42, 43]. Зависимости активности от времени проведения процесса иммобилизации, приведенные на рис. 4-6, показывают, что с увеличением количества иммобилизованного фермента наблюдается возрастание каталитической активности гетерогенного катализатора. Из рис. 1-6 видно, что максимальному количеству сорбированного белка соответствует максимальная каталитическая активность иммобилизованного фермента. Величина активности гетерогенного биокатализатора составляет от 44.5 до 71.2% от каталитической активности нативного фермента в зависимости от типа носителя.

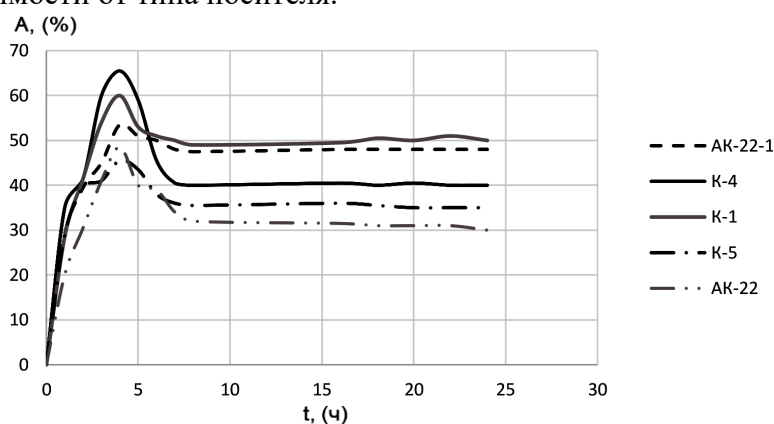


Рис. 4. Зависимость каталитической активности инулиназы (A, %) от времени проведения процесса иммобилизации при концентрации исходного раствора инулиназы $1 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³

Fig. 4. Dependence of the catalytic activity of the inulinase (A, %) on the duration of the immobilisation with a concentration of the initial inulinase solution of $1 \cdot 10^{-7}$ mmol/l

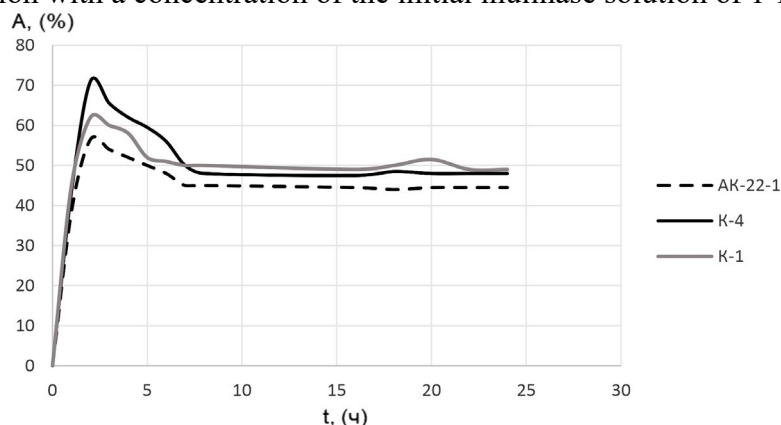


Рис. 5. Зависимость каталитической активности инулиназы (A, %) от времени проведения процесса иммобилизации при концентрации исходного раствора инулиназы $5 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³

Fig. 5. Dependence of the catalytic activity of the inulinase (A, %) on the duration of the immobilisation with a concentration of the initial inulinase solution of $5 \cdot 10^{-7}$ mmol/l

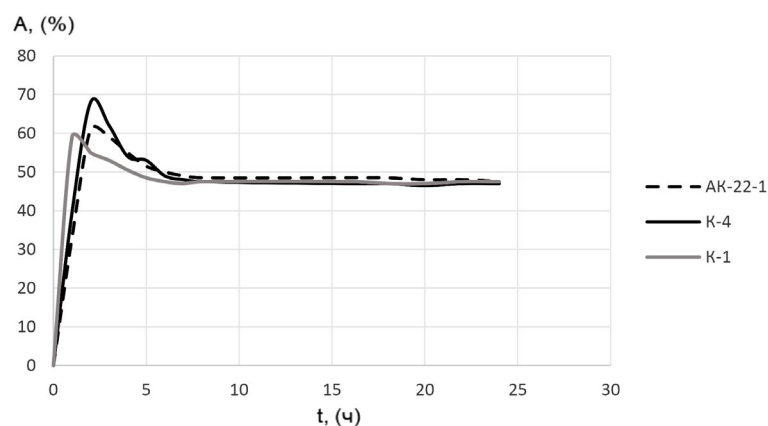


Рис. 6. Зависимость каталитической активности инулиназы (A, %) от времени проведения процесса иммобилизации при концентрации исходного раствора инулиназы $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³

Fig. 6. Dependence of the catalytic activity of the inulinase (A, %) on the duration of the immobilisation at the concentration of the initial inulinase solution of $1 \cdot 10^{-6}$ mmol/l

По-видимому, ассоциаты макромолекул инулиназы (при ее концентрациях в растворе $1 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) сорбируются только на поверхности носителя, что обеспечивает доступность активных центров фермента, а, следовательно, и высокую каталитическую активность иммобилизованного препарата.

Для выяснения механизма взаимодействия инулиназы с носителями были получены кривые сорбции (табл. 3, рис. 7), которые имеют перегиб, что свидетельствует о сложном механизме связывания фермента с ионообменниками и объясняется неоднородностью свойств белка как сорбата [44]. Таким образом, вероятно, образование максимума на кривой сорбции можно объяснить ассоциацией в растворе сорбируемых молекул инулиназы. Помимо взаимодействия сорбент-сорбат, результатом которого является формирование мономолекулярного слоя фермента, происходит резкое возрастание количества сорбированного белка в результате сорбат-сорбатного взаимодействия. Подобное взаимодействие приводит к формированию на поверхности сорбента полимолекулярных слоев. При этом белки образуют строго определенные ассоциаты: ди-, три- и тетрамеры, которые могут выступать в качестве отдельных кинетических единиц в процессах сорбции, приводя к образованию «многослойности» на поверхности сорбента [45, 46].

Таблица 3. Зависимость количества сорбированного белка (Q) от концентрации раствора инулиназы (через 4 часа)

Конц-я, $C \cdot 10^{-6}$ моль/дм ³	AK-22-1		K-4		K-1		K-5		AK-22	
	q, мг/г/ t, ч	$q \cdot 10^{-8}$, моль/г/ t, ч	q, мг/г/ t, ч	$q \cdot 10^{-8}$, моль/г/ t, ч	q, мг/г/ t, ч	$q \cdot 10^{-8}$, моль/г/ t, ч	q, мг/г/ t, ч	$q \cdot 10^{-8}$, моль/г/ t, ч	q, мг/г/ t, ч	$q \cdot 10^{-8}$, моль/г/ t, ч
	0.05	4.1	4.66	3.82	4.34	4.53	5.15	4.71	5.35	3.9
0.10	5.63	6.40	7.41	8.42	6.52	7.41	6.53	7.42	6.5	7.39
0.25	5.11	5.81	6.83	7.76	4.84	5.50	5.22	5.93	5.85	6.65
0.50	4.3	4.89	6.01	6.83	4.13	4.69	3.92	4.45	4.84	5.50
0.75	4.05	4.60	6.24	7.09	5.21	5.92	4.55	5.17	5.27	5.99
1.00	4.81	5.47	6.42	7.30	5.64	6.41	5.11	5.81	5.92	6.73

Из табл. 2, 3 и рис. 1-6 видно, что количество иммобилизованного белка примерно одинаково на всех использованных в работе носителях. Несколько большая

степень сорбции и наибольшая каталитическая активность наблюдается на ионообменнике К-4. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что количество иммобилизованного белка практически не зависит от структуры используемых нами полимеров-носителей, а определяется в основном строением и свойствами молекул самого фермента, которые обуславливают сложный процесс сорбции [44-47].

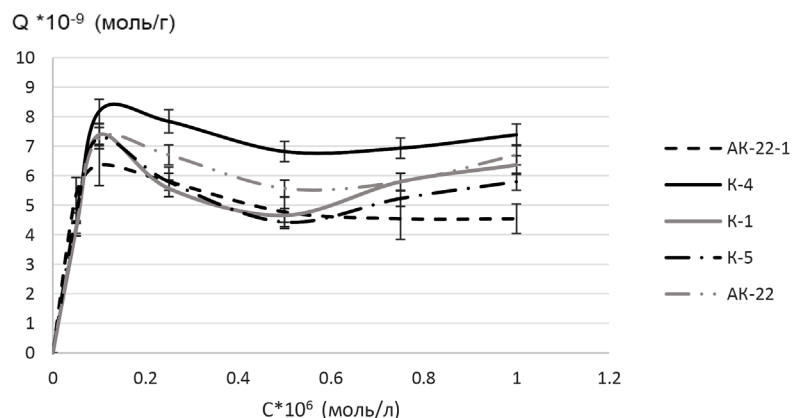


Рис. 7. Кривые сорбции инулиназы волокнистыми полиэлектролитами ($t=4$ часа)
Fig. 7. Absorption curves of the inulinase by fibrous polyelectrolytes ($t=4$ hours)

Интерпретация ИК-спектрограмм инулиназы, свободных волокнистых полиэлектролитов, а также ионообменников после иммобилизации фермента использовалась для выяснения механизма связывания инулиназы с носителями. В табл. 4 указаны основные аналитические частоты валентных и деформационных колебаний фермента инулиназы и волокнистого полиэлектролита К-4. ИК-спектры представлены на рис. 8.

Таблица 4. Основные аналитические частоты (см^{-1}) валентных и деформационных колебаний фермента инулиназы и волокнистого полиэлектролита К-4
Table 4. Main analytical frequencies (cm^{-1}) of stretching and deformation vibrations of the inulinase enzyme and the fibrous polyelectrolyte К-4

Свободная инулиназа	Свободный К-4	Инулиназа, иммобилизованная на К-4	Отнесение [48-51]
1	2	3	4
3376	-	3386	симметричные валентные колебания свободной $-\text{NH}_2$
3184, 3336	-	3457	симметричные валентные колебания связанной $-\text{NH}_2$
3482, 3626	-	3526, 3633	деформационные колебания связей $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$
1420-1200	1259	-	деформационные колебания свободной OH -группы
-	1700-1725	-	валентные колебания неионизированной COOH -группы
-	2556, 2668	-	валентные колебания OH -групп (димеры)
1649	-	1640-1650	полоса амид I (обусловлена валентными колебаниями группы $\text{C}=\text{O}$ пептидной связи)

1	2	3	4
1457, 1561	-	1559, 1567	полоса амид II (деформационные колебания связи N-H и C-N)
1329	-	1259, 1168	полоса амид III (плоские деформационные колебания NH-групп)
580-700	-	697	полоса амид V (неплоские деформационные колебания NH-групп)

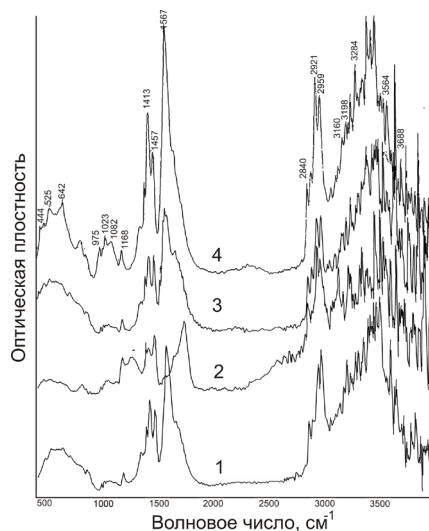


Рис. 8. ИК-спектры полиэлектrolита К-4, свободной инулиназы и их комплекса: 1 – свободная инулиназа; 2 – К-4; 3 – К-4 с иммобилизованной инулиназой ($1 \cdot 10^{-7}$ М); 4 – К-4 с иммобилизованной инулиназой ($1 \cdot 10^{-6}$ М)

Fig. 8. IR spectra of the polyelectrolyte K-4, free inulinase, and their mixture: 1 - free inulinase; 2 - K-4; 3 - K-4 with immobilised inulinase ($1 \cdot 10^{-7}$ M); 4 – K-4 with immobilised inulinase ($1 \cdot 10^{-6}$ M)

В спектре свободной инулиназы в области частот $3000-3700 \text{ см}^{-1}$ присутствуют полосы поглощения валентных колебаний групп $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$ и $-\text{OH}$. Полосы поглощения 3376 см^{-1} относятся к симметричным валентным колебаниям свободной, а 3184 и 3336 см^{-1} – связанной NH_2 -группы. Полосы 3261 , 3626 см^{-1} обусловлены валентными колебаниями свободной OH -группы. Полоса поглощения 1649 см^{-1} определяется валентными колебаниями групп $\text{C}=\text{O}$ (Амид I) [48, 49].

Деформационные колебания связи N-H в плоскости пептидной связи и колебания связи C-N представлены полосой поглощения Амид II (1561 , 1457 см^{-1}). В области $1420-1200 \text{ см}^{-1}$ проявляется поглощение, вызванное деформационными колебаниями OH -группы (1411 , 1378 см^{-1}) и валентными колебаниями C-O (1167 см^{-1}). На спектрограммах свободной инулиназы можно выделить также полосы поглощения Амид III (1329 см^{-1}) и Амид V ($580-700 \text{ см}^{-1}$), обусловленные соответственно плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп [48-50].

Спектр свободного волокнистого полиэлектrolита К-4 в Н-форме содержит большое количество полос поглощения, характерных как для собственно функциональных групп ионообменника, так и для всей полимерной матрицы [45-51]. Присутствуют полосы поглощения, обусловленные валентными и деформационными колебаниями связи $\text{C}=\text{O}$ в неионизированной карбоксильной группе. Область $1700-1725 \text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям неионизированной карбоксильной группы. Наличие неионизированных COOH -групп подтверждают полосы поглощения 2556 и

2668 cm^{-1} , соответствующие валентным колебаниям ОН-групп связанных в димеры карбоновых кислот. Полоса поглощения 1259 cm^{-1} обусловлена деформационными колебаниями связи О-Н в плоскости.

При иммобилизации инулиназы на волокнистом ионообменнике К-4 в ИК-спектрах сорбента происходят изменения: исчезают полосы поглощения 1700-1725 cm^{-1} , характерные для колебаний неионизированной СООН-группы. Только при концентрации раствора инулиназы $1 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ сохраняется небольшой пик 1715 cm^{-1} , который не наблюдается при более высоких концентрациях фермента. Исчезают полосы поглощения в области 2500-2700 cm^{-1} , относящиеся к колебаниям неионизированных СООН-групп в димерах. Появляется полоса поглощения Амид I (1649 cm^{-1}), обусловленная валентными колебаниями группы С=О пептидной связи. Полосы поглощения 1559 и 1567 cm^{-1} относятся к Амид II (деформационные колебания связи N-H и C-N). Возникают полосы Амид III (1259, 1168 cm^{-1}) и Амид V (697 cm^{-1}). Также на спектре присутствуют полосы поглощения в области 3000-3700 cm^{-1} : 3386, 3457, 3526, 3633 cm^{-1} , соответствующие валентным и деформационным колебаниям связей в группах -NH и -NH₂.

Проанализировав ИК-спектры, можно сделать вывод о том, что при иммобилизации инулиназы на волокнистом полиэлектролите К-4 происходит образование водородных связей и электростатических взаимодействий между функциональными группами фермента и карбоксильными группами сорбента. Это подтверждается исчезновением полос поглощения, характерных для неионизированных карбоксильных групп полимера-носителя, и появлением в спектрах полос Амид I, II, III, V. Данные полосы соответствуют валентным колебаниям групп С=О пептидной связи, деформационным колебаниям связей N-H и C-N.

Заключение

В результате проведения адсорбционной иммобилизации инулиназы из *Aspergillus awamori* ВКМФ-2250 на волокнистых полиэлектролитах: АК-22-1, АК-22, К-1, К-4, К-5, установлено, что количество иммобилизованного фермента составляет от 5.63 до 9.62 мг/г носителя (от $6.40 \cdot 10^{-8}$ до $10.93 \cdot 10^{-8}$ моль/г носителя).

В результате измерения каталитической активности свободной и иммобилизованной инулиназы выявлено, что с увеличением количества адсорбированного фермента наблюдается возрастание активности гетерогенного биокатализатора. При этом максимальному количеству сорбированного белка соответствует максимальная каталитическая активность иммобилизованной инулиназы. Величина активности гетерогенного биокатализатора составляет от 44.5 до 71.2% от активности нативного фермента в зависимости от типа носителя и концентрации инулиназы в иммобилизационной среде.

Наибольшей каталитической активностью обладает инулиназа, иммобилизованная на полиэлектролите К-4 (71.2% от активности нативного фермента при концентрации исходного раствора инулиназы $5 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³).

Методом ИК-спектроскопии был исследован характер сорбции фермента на матрице полимера-носителя К-4. Установлено, что иммобилизация инулиназы происходит за счет реализации слабых водородных связей и электростатических взаимодействий между функциональными группами фермента: NH₂-группами (лизин, аргинин) и карбоксильными группами полимера-носителя.

Результаты исследований получены при использовании материально-технической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета (ЦКПО ВГУ)

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044

Список литературы

1. Neeraj G., Ravi S., Somdukt R., Ravi S.K., Kumar V.V. // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018. Vol. 38. No 3. pp. 409-422.
2. Холявка М.Г., Ковалёва Т.А., Хрупина Е.А., Волкова С.А. и др. // *Биотехнология*. 2012. № 6. С. 31-41.
3. Абелян В.А., Манукян Л.С. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. № 6. С. 1028-1036.
4. Ковалева Т.А., Селеменев В.Ф., Шмырева Ж.В. // «Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов», материалы международного симпозиума. Воронеж. 1995. С. 68-72.
5. Шатилова Т.И., Соколова О.С., Белопухов С.Л., Семко В.Т. и др. // *Вестник Казанского технологического университета*. 2015. Т. 18. № 16. С. 301-303.
6. Flores A.C., Morlett J.A., Rodriguez R. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016. Vol. 56. pp. 1893-1902.
7. Kang S., Chang Y.J., Oh S.J., Kim S. // *Biotechnol. Lett.* 1998. Vol. 20. pp. 983-986.
8. Nakamura T., Ogata Y., Shitara A., Ohta K. // *J. Ferment. Bioeng.* 1995. Vol. 80. pp. 164-169.
9. Pessoni R.A., Tersarotto C.C., Mateus C.A., Zerlin J.K. // *SpringerPlus*. 2015. Vol. 4. 487.
10. Абелян В.А., Манукян Л.С. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1992. Т. 28. № 3. С. 356-361.
11. Тертычная Т.Н. Автореферат диссертации на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Воронеж. 1994. 24 с.
12. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Битюцкая Л.А. и др. // *Биофизика*. 2009. Т. 54. № 6. С. 1005-1011.
13. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2007. Т. 7. № 5. С. 804-810.
14. Артюхов В.Г., Холявка М.Г., Ковалева Т.А. // *Биофизика*. 2013. Т. 58. № 4. С. 635-644.
15. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2017. Т. 17. № 2. С. 285-290.
16. Березин И.В., Мартинек К. Введение в прикладную энзимологию. М. Изд-во Моск. Ун-та. 1982. 384 с.
17. Березин И.В., Антонов В.К., Мартинек К. Иммуобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы. М. Изд-во МГУ. 1976. Т. 2. 358 с.
18. Кулис Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс. Мокслас. 1981. 200 с.
19. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A. et al. // *Computers in Biology and Medicine*. 2016. Vol. 71. pp. 198-204.
20. Шункевич А.А. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2001. Т. 1. № 5. С. 754-763.
21. Поликарпов А.П., Шункевич А.А., Грачек В.И., Медяк Г.В. // *Российский химический журнал*. 2015. Т. 59. № 3. С. 102-111.
22. Солдатов В.С., Сосинович З.И., Ким Т.И. // *Журнал физ. хим.* 1996. Т. 70. № 7. С. 1332-1334.
23. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Богданова С.С. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009. Т. 148. № 7. С. 49-52.
24. Ковалева Т.А. Автореферат диссертации на соиск. учен. степ. докт. биол. наук. Воронеж. 1998. 48 с.
25. Солдатов В.С., Сергеев Г.И., Марцинкевич Р.В. // *Журнал прикладной химии*. 1988. Т. 61. № 1. С. 46-50.
26. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высшая школа. 1980. 272 с.
27. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М. Высшая школа. 1993. 496 с.
28. Холявка М.Г. Автореферат диссертации на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Воронеж. 2010. 24 с.

29. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. Л. Агропромиздат. 1987. 429 с.
30. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2011. № 1. С. 3-7.
31. Рудометова Н.В., Ефимова Т.Б., Глазунова Н.В. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1992. Т. 28. № 5. С. 694-697.
32. Скокова И.Ф., Юданова Т.Н., Вирник А.Д. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1997. Т. 33. № 1. С. 38-42.
33. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф. // *Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация*. 2004. № 1. С. 110-113.
34. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф., Меркулова Ю.Д. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2004. Т. 4. № 4. С. 422-427.
35. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Лунина В.В. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. Т. 9. № 2. С. 247-253.
36. Гантман А.И., Бутенко Т.Ю. // *Журн. физич. химии*. 1986. № 2. С. 460-463.
37. Селеменев В.Ф. дис. на соиск. степ. д-ра хим. наук. Воронеж. 1993. 568 с.
38. Рудакова Л.В., Селеменев В.Ф., Рудаков О.Б., Кудухова И.Г. и др. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2013. Т. 13. № 5. С. 676-686.
39. Карпов С.И., Матвеева М. В. Селеменев В.Ф. // *Журнал физической химии*. 2001. Т. 75. № 2. С. 266-271.
40. Карпов С.И., Селеменев В.Ф. Матвеева М. В. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2001. Т. 1. № 3. С. 380-385.
41. Кудухова И.Г., Рудакова Л.В., Никитина С.Ю., Рудаков О.Б. // *Научный вестник Воронежского государственного архитектурно-строительного университета. Серия: Физико-химические проблемы строительного материаловедения и высокие технологии*. 2011. № 3-4. С. 117-122.
42. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М. Мир. 1982. Т. 1. 392 с.
43. Тривен М. Имобилизованные ферменты. М. Мир. 1983. 213 с.
44. Полторак О.М., Пряхин А.Н., Чухрай Е.С. // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия*. 1982. Т. 23. № 6. С. 527-543.
45. Чухрай Е.С., Атякшева Л.Ф., Полторак О.М. // *Журнал физической химии*. 2002. Т. 76. № 12. С. 2251-2254.
46. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф. // *Журнал физической химии*. 2001. Т. 75. № 10. С. 1859-1861.
47. Иванов А.А., Филипчин Г.И., Кирковский В.В. // *Журнал прикладной спектроскопии*. 1989. Т. 51. № 1. С. 135-138.
48. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. М. Наука. 1965. 135 с.
49. Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии в органической химии. Учеб. пособие для вузов. М. Высш.шк. 1971. 264 с.
50. Семушин А.М., Яковлев В.А., Иванова Е.В. Инфракрасные спектры поглощения ионообменных материалов. Л. Химия. 1980. 96 с.
51. Угрянская В.А., Чикин Г.А., Селеменев В.Ф., Завьялова Т.А. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов. Воронеж. Изд-во ВГУ. 1989. 208 с.

Regularities of adsorption immobilisation of inulinase on fibrous polyelectrolytes AK-22, AK-22-1, K-1, K-4, K-5

© 2020 Holyavka M.G.¹, Dubovitskaya A.N.¹, Sakibaev F.A.¹, Shkutina I.V.², Mironenko N.V.¹, Selemenov V.F.¹, Artyukhov V.G.¹

¹Voronezh State University, Voronezh

²St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg

Inulinases (EC 3.2.1.7 and 3.2.1.80) are hydrolytic enzymes which break down β -1,2-fructose bonds. These biocatalysts are widely used in the industrial production of fructose, fructose syrups, and fructooligosaccharides. However, the application of the enzymes in free forms has several disadvantages: they have low thermal stability, it is difficult to separate the catalyst molecules and the final product, and they are cannot be reused. The indicated problems can be solved by immobilising the enzymes on insoluble carriers.

Therefore, the aim of our research was to study the patterns of the adsorption immobilisation of inulinase on fibrous polyelectrolytes.

The study of the adsorption immobilisation of inulinase was performed on fibrous polyelectrolytes AK-22, AK-22-1, K-1, K-4, K-5. We investigated the effect of the duration of the sorption process on the amount of immobilised protein and the activity of the heterogeneous catalyst. Adsorption reaches its maximum after 4 hours, when the concentration of the inulinase solution is $1 \cdot 10^{-7}$ mmol/l and after 2 hours, when the concentration is $5 \cdot 10^{-7}$ and $1 \cdot 10^{-6}$ mmol/l. The highest catalytic ability of the immobilised enzyme corresponds to the largest amount of absorbed protein. The activity of a heterogeneous biocatalyst is from 44.5 to 71.2 % of the activity of the native enzyme.

The study determined that at the initial moment of immobilisation, the active formation of protein associates takes place. As a result its sorption increases sharply, and a peak appears on the kinetic curve. However, over time, the enzyme is released into the solvent phase, and a decrease is observed on the kinetic curve. A desorption process at this stage is possible due to the low interaction energy between the sorbate and the sorbent molecules and, consequently, the weak binding of the protein molecules to the carrier polymer. Then, over time, the adsorption becomes irreversible. Thus, the structure of the formed polyelectrolyte complexes, as well as their composition changed with an increase in the duration of the reaction: during the restructuring of the complexes, some of the protein molecules are released into the solution. Associates of inulinase macromolecules (at the concentrations of $1 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, and $1 \cdot 10^{-6}$ mmol/l), are apparently sorbed only on the surface of the carrier, which ensures the availability of active centres of the enzyme and, as a consequence, high catalytic activity of the immobilised enzyme preparation.

IR spectroscopy demonstrated that inulinase immobilisation occurs due to the implementation of weak hydrogen bonds and electrostatic interactions of the enzyme and the carrier polymer.

Keywords: inulinase, immobilisation, adsorption, heterogeneous catalyst, catalytic activity.

References

1. Neeraj G., Ravi S., Somdutt R., Ravi S.K. e, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, Vol. 38, No 3, pp. 409-422. DOI: 10.1080/07388551.2017.1359146
2. Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A., Volkova S.A. et al., *Biotechnology in Russia*, 2012, No 6, pp. 31-41
3. Abelyan V.A., Manukyan L.S., *Biochemistry (Moscow)*, 1996, 61 (6), pp. 737-742.
4. Kovaleva T.A., Selemenev V.F., Shmyreva Zh.V., «Fiziko-khimicheskie osnovy funktsionirovaniya belkov i ikh kompleksov», materialy mezhdunarodnogo simpoziuma, Voronezh, 1995, pp. 68-72.
5. Shatilova T.I., Sokolova O.S., Belopukhov S.L., Semko V.T. et al., *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2015, Vol. 18, No 16, pp. 301-303.
6. Flores A.C., Morlett J.A., Rodriguez R., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, Vol. 56, pp. 1893-1902.
7. Kang S., Chang Y.J., Oh S.J., Kim S., *Biotechnol. Lett.*, 1998, Vol. 20, pp. 983-986.
8. Nakamura T., Ogata Y., Shitara A., Ohta K., *J. Ferment. Bioeng.*, 1995, Vol. 80, pp. 164-169.
9. Pessoni R.A., Tersarotto C.C., Mateus C.A., Zerlin J.K et al., *Springer Plus*, 2015, Vol. 4, pp. 487. DOI 10.1186/s40064-015-1298-7
10. Abelyan V.A., Manukyan L.S., *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1992, Vol. 28, No 3, pp. 356-361.
11. Tertychnaya T.N. Avtoreferat dissertatsii na soisk. step. kand. biol. nauk., Voronezh, 1994, 24 p.
12. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A. et al., *Biophysics*, 2009, Vol. 54, No 6, pp. 675-680. DOI: 10.1134/S0006350909060025
13. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Takha A.S., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2007, Vol. 7, No 5, pp. 804-810.
14. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A., *Biophysics*, 2013, Vol. 58, No 4, pp. 493-501. DOI: 10.1134/S0006350913040039
15. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Selemenev V.F., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2017, Vol. 17, No 2, pp. 285-290.
16. Berezin I.V., Martinek K. Vvedenie v prikladnuyu enzimologiyu, M., Izd-vo Mosk. Un-ta, 1982, 384 p.
17. Berezin I.V., Antonov V.K., Martinek K., Immobilizovannye fermenty. Sovremennoe sostoyanie i perspektivy. M., Izd-vo MGU, 1976, Vol. 2, 358 p.
18. Kulis Yu.Yu. Analiticheskie sistemy na osnove immobilizovannykh fermentov, Vil'nyus, Mokslas, 1981, 200 p.

19. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Konratyev M.S., Samchenko A.A. et al., *Computers in Biology and Medicine*, 2016, Vol. 71, pp. 198-204. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2016.02.015
20. Shunkevich A.A., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2001, Vol. 1, No 5, pp. 754-763.
21. Polikarpov A.P., Shunkevich A.A., Grachek V.I., Medyak G.V., *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 2015, Vol. 59, No 3, pp. 102-111.
22. Soldatov V.S., Sosinovich Z.I., Kim T.I., *Russian journal of physical chemistry a: focus on chemistry*, 1996, Vol. 70, No 7, pp. 1332-1334.
23. Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Bogdanova S.S., *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2009, Vol. 148, No 1, pp. 39-41.
24. Kovaleva T.A., Avtoreferat dissertatsii na soisk. step. dok. biol. nauk, Voronezh, 1998, 48 p.
25. Soldatov V.S., Sergeev G.I., Martsinkevich R.V., *Zhurnal prikladnoi khimii*, 1988, Vol. 61, No 1, pp. 46-50.
26. Kochetov G.A. *Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii*. M., Vysshayashkola, 1980, 272 p.
27. Filippovich Yu.B. *Osnovybiokhimii*, M., Vysshayashkola, 1993, 496 p.
28. Kholyavka M.G. Avtoreferat dissertatsii na soisk. step. kand. biol. nauk, Voronezh, 2010, 24 p.
29. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P. et al. *Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii*. L., Agropromizdat, 1987, 429 p.
30. Kovaleva T.A., Holyavka M.G., *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy khimii*, 2011, No 1, pp. 3-7.
31. Rudometova N.V., Efimova T.B., Glazunova N.V., *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1992, Vol. 28, No 5, pp. 694-697.
32. Skokova I.F., Yudanov T.N., Virnik A.D., *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1997, Vol. 33, No 1, pp. 38-42.
33. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Selemenev V.F., *Vestnik VGU. Seriya: Himiya, Biologiya, Farmaciya*, 2004, No 1, pp. 110-113.
34. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Selemenev V.F., Merkulova Yu.D., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2004, Vol. 4, No 4, pp. 422-427.
35. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Lunina V.V., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2009, Vol. 9, No 2, pp. 247-253.
36. Gantman A.I., Butenko T.Y., *Russian journal of physical chemistry a: focus on chemistry*, 1986, Vol. 60, No 2, pp. 460-463.
37. Selemenev V.F., dissertacija doktora him. nauk. Voronezh, 1993, 568 p.
38. Rudakova L.V., Selemenev V.F., Rudakov O.B., Kuduhova I.G. et al., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2013, Vol. 13, No 5, pp. 676-686.
39. Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F., *Russian journal of physical chemistry a: focus on chemistry*, 2001, Vol. 75, No 2, pp. 266-271.
40. Karpov S.I., Selemenev V.F. Matveeva M.V., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2001, Vol. 1, No 3, pp. 380-385
41. Kuduhova I.G., Rudakova L.V., Nikitina S.Ju., Rudakov O.B. // *Nauchnyj vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo arhitekturno-stroitel'nogo universiteta*. Seriya: Fiziko-himicheskie problem stroitel'nogo materialovedeniya i vysokie tehnologii. 2011. № 3-4. S. 117-122.
42. Dikson M., Uebb E. *Fermenty*. M., Mir, 1982, Vol. 1, 392 p.
43. Triven M. *Immobilizovannye fermenty*. M., Mir, 1983, 213 p.
44. Poltorak O.M., Pryakhin A.N., Chukhrai E.S., *Vestn. Mosk. Un-ta. Ser.2. Khimiya*, 1982, Vol. 23, No 6, pp. 527-543.
45. Chukhrai E.S., Atyaksheva L.F., Poltorak O.M., *Russian journal of physical chemistry A*, 2002, Vol. 76, No 12, pp. 2251-2254.
46. Shkutina I.V., Stoyanova O.F., Selemenev V.F., *Russian journal of physical chemistry A*, 2001, Vol. 75, No 10, pp. 1859-1861.
47. Ivanov A.A., Filipchin G.I., Kirkovskii V.V., *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*, 1989, Vol. 51, No 1, pp. 135-138.
48. Chirgadze Yu.N. *Infrakrasnye spektry i struktura polipeptidov i belkov*. M., Nauka, 1965, 135 p.
49. Kazitsyna L.A., Kupletskaya N.B. *Primenenie UF-, IK- i YaMR- spektroskopii v organicheskoi khimii*. Ucheb. posobiedlyavuzov. M., Vyssh.shk., 1971, 264 p.
50. Semushin A.M., Yakovlev V.A., Ivanova E.V. *Infrakrasny espektry pogloshcheniya ionoobmennyykh materialov*. L., Khimiya, 1980, 96 p.
51. Uglyanskaya V.A., Chikin G.A., Selemenev V.F., Zav'yalova T.A. *Infrakrasnyas pektroskopiy aionoobmennyykh materialov*. Voronezh, Izd-vo VGU, 1989, 208 p.

Холявка Марина Геннадьевна – д.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Дубовицкая Анастасия Николаевна – студент кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Сакибаев Фархат Адильжанович – аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Шкутина Ирина Викторовна – к.б.н., доцент кафедры общей и медицинской химии им. проф. В.В. Хорунжего, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

Мироненко Наталья Владимировна – к.х.н., ассистент кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Селеменев Владимир Федорович – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Артюхов Валерий Григорьевич – д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Holyavka Marina G. – Ph.D. (biology), associate prof., department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: holyavka@rambler.ru

Dubovickaya Anastasiya N. – student, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh

Sakibaev Farkhat A. – postgraduate student, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: farkhatlukum@gmail.com

Shkutina Irina V. – Ph.D. (biology), associate prof., general and medical chemistry department after prof. V.V. Khorunzhii, State Pediatric Medical University, St. Petersburg, e-mail: irn55@mail.ru

Mironenko Natalya V. – Ph.D. (chemistry), assistant, Department of analytical chemistry, Voronezh State University, Voronezh

Selemenov Vladimir V. – Ph.D. (chemistry), professor, Department of analytical chemistry, Voronezh State University, Voronezh

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