

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛ ИНУЛИНАЗЫ С МАТРИЦЕЙ ХИТОЗАНА, УФ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ

© 2016 г. М.Г. Холявка, В.Г. Аргюхов, П.В. Середин

Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская площадь, 1

E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.02.16 г.

Разработана методика иммобилизации инулиназы на хитозанах различной молекулярной массы. Установлено, что кислоторастворимые среднемолекулярный (200 кДа) и высокомолекулярный (350 кДа) хитозаны являются перспективными матрицами для адсорбции инулиназы. Выдвинуто предположение, что формирование комплекса инулиназа–матрица хитозана происходит в основном за счет гидрофобных взаимодействий, существенную роль играют также электростатические взаимодействия. Комплекс фермента с высокомолекулярным хитозаном более устойчив к действию УФ-света и температурным воздействиям, что позволяет рекомендовать его для использования в качестве катализатора в промышленных процессах получения фруктозы из инулинсодержащего растительного сырья.

*Ключевые слова:* инулиназа, иммобилизация, хитозан, УФ-свет.

Инулиназы (инулазы, 2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролазы, КФ 3.2.1.7) расщепляют инулин и фруктоолигосахариды до фруктозы, относятся к классу гидролаз, семейству гликозил-гидролаз (гликозидаз); действуют на гликозильные соединения, гидролизуют O-гликозильные связи. Изучение физико-химических и структурно-функциональных свойств инулиназ в условиях различного микроокружения имеет высокое теоретическое и прикладное значение. Эти ферменты участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей системы коммуникации, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки, роста и развития указанных организмов. Они также 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 [1–4].

Исследование определенных аспектов ферментативных реакций гидролиза полисахаридов в условиях регуляции скорости процесса с помощью различных физико-химических агентов позволяет выяснить особенности поведения гидролитических ферментов при производстве некоторых видов пищевой продукции и фарма-

цевтических препаратов. Изучение ферментативного катализа иммобилизованными энзимами необходимо для выявления механизмов действия мембраносвязанных ферментов, олигомерных белков и полиферментных систем, сконструированных по модульному принципу.

Разработка гетерогенных биокатализаторов с заданными свойствами имеет большое значение для создания новых материалов, предназначенных для применения в медицине, биотехнологии, экологии и других областях. Хитозан является одним из наиболее перспективных полимеров в биоинженерии из-за его высокой лабильности, способности образовывать гели, пленки, гранулы. Функциональные свойства этих катионных полиэлектролитов зависят от молекулярной массы, полидисперсности, степени деацетилирования и микроструктуры (распределения сомономеров по длине цепи). Полимерная матрица хитозана позволяет иммобилизовать ферменты как внутри сетки, так и на ее поверхности. Его производные характеризуются нетоксичностью, биоразлагаемостью, биосовместимостью и слабой иммуногенностью [5,6].

В настоящее время приоритетными направлениями в развитии исследований по созданию и изучению аналогов хитозана и хитина являются разработки производных гликанов с повышенной катионоактивностью, используемых

для иммобилизации биологически активных веществ. Относительно новым направлением является подготовка аналогов хитозана для создания наносистем, используемых далее в качестве носителей биопрепаратов медицинского и промышленного назначения [7].

Каталитическая активность ферментов определяется степенью мобильности белковой молекулы, даже при небольших изменениях конформации полипептидной цепи у энзимов способность к катализу резко изменяется. В связи с этим исследования изменений структурно-функциональных свойств ферментов под действием различных денатурирующих факторов (в том числе УФ-света) и стабилизирующих агентов (полимерные матрицы для иммобилизации) обладают высокой актуальностью.

Цель нашей работы состояла в выявлении механизма сорбции инулиназы на матрице хитозанов и изучении УФ-индуцированных изменений функциональных свойств иммобилизованной инулиназы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы Sigma-Aldrich (Германия), который мы подвергали дополнительной очистке [8].

В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP Biomedicals (США), выделенный из цикория (молекулярная масса порядка 5000 дальтон). В роли носителя для иммобилизации выступали матрицы хитозанов различной молекулярной массы и степени деацетилирования, синтезированные ЗАО «Биопрогресс» (Щелково, Московская обл., Россия): хитозан кислоторастворимый среднемолекулярный ХТЗ № 07 ( $M_r = 200$  кДа, степень деацетилирования – 82%), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ХТЗ № 12 ( $M_r = 350$  кДа, степень деацетилирования – 94,85%), хитозан пищевой ( $M_r < 100$  кДа) и сукцинат хитозана.

Иммобилизацию инулиназы осуществляли путем адсорбции: 5 г носителя оставляли на 12 ч при комнатной температуре в 50 мл рабочего буфера, к суспензии носителя добавляли 5 мл раствора фермента и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки со скоростью ~ 100 об/мин в течение 1,5 ч при 25°C. Центрифугировали 5 мин при 1500 g. Осадок промывали буфером до отсутствия в промывных водах белка, наличие которого контролировали на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) при  $\lambda = 280$  нм.

Количество белка в пробах определяли методом Лоури [9]. Каталитическую активность фермента измеряли спектрофотометрически резорциновым методом [10]. За единицу каталитической активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ фруктозы за 1 мин.

УФ-облучение растворов белков проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм в течение 1, 5, 10, 20, 30 и 40 мин. Доза облучения составляла соответственно 151, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета с помощью ИК-Фурье-спектрометра Vertex-70 (Bruker, Германия). Спектры снимались с неориентированных порошковых образцов.

Оценка достоверности полученных результатов, подчиняющихся закону нормального распределения, проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента при уровне статистической значимости 5%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Механизм сорбции инулиназы на матрице хитозанов.** В первой серии экспериментов мы подбирали условия для иммобилизации инулиназы на матрице хитозанов различной молекулярной массы и степени деацетилирования.

Хитозан является слабым основанием с  $pK_a = 6,5$ , что близко к значению  $pK_a$  остатков D-глюкозамина [11]. Изoeлектрическая точка инулиназы составляет 3,9–4,5 [12–17].

Иммобилизацию осуществляли в ацетатных буферах (рН 4,0 и 5,0) и в фосфатном буфере (рН 7,4). При рН 4,0 суммарный заряд молекулы инулиназы и матрицы хитозана положительный; при рН 5,0 матрица хитозана по-прежнему характеризуется положительным зарядом, общий заряд инулиназы отрицательный; при рН 7,4 молекула инулиназы заряжена отрицательно, заряд хитозана близок к нулевому значению.

На рис. 1 и 2 отражены значения таких показателей, как содержание белка и удельной активности гетерогенных препаратов. При рН 4,0 сорбция белка минимальна. Можно предположить, что в процессе иммобилизации инулиназы на матрице хитозанов высокое зна-

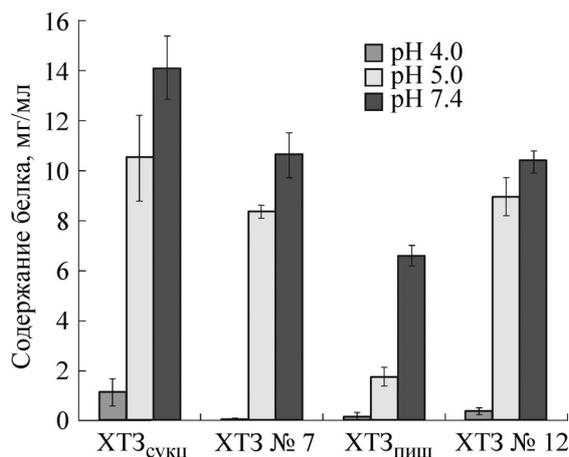


Рис. 1. Содержание белка в гетерогенных препаратах на основе инулиназы и матрицы хитозанов.

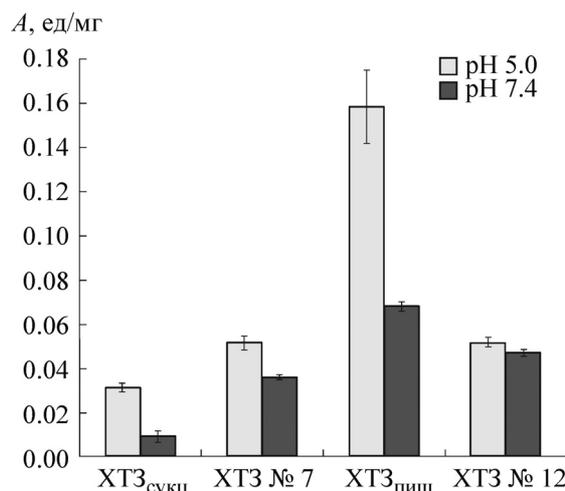


Рис. 2. Удельная каталитическая активность гетерогенных препаратов на основе инулиназы и матрицы хитозанов.

чение имеют электростатические взаимодействия (при pH 4,0 оба компонента системы заряжены положительно).

Наибольшая степень сорбции белка на матрице всех хитозанов детектировалась при pH 7,4 (хитозан имеет заряд, близкий к нулевому значению), а не 5,0 (компоненты системы имеют разноименные заряды), что свидетельствует о существенном вкладе в механизм взаимодействия инулиназы и матрицы носителя не только электростатических, но и гидрофобных взаимодействий.

Для выявления механизма адсорбции фермента на матрице хитозанов мы использовали метод инфракрасной спектроскопии. Анализ ИК-спектров хитозанов показывает, что наиболее интенсивными являются полосы поглощения с максимумами в областях 1000–1050 см<sup>-1</sup> (отвечает валентным колебаниям связей –CN– в первичной аминогруппе), 1330–1400 см<sup>-1</sup> (обусловлена плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп), 1500–1560 см<sup>-1</sup> (отвечает за деформационные колебания группировок –N–H и –C–NH<sub>2</sub>–), 780–860 см<sup>-1</sup> (проявляется за счет пульсационных колебаний пиранозного цикла структуры элементарного звена хитозана). Наблюдается и ряд других, менее интенсивных полос поглощения: 2200–2400 см<sup>-1</sup> (соответствует валентным колебаниям атома углерода) и 2800–3000 см<sup>-1</sup> (обусловлена асимметричными и симметричными колебаниями групп –CH и –CH<sub>2</sub>–). Необходимо отметить, что, несмотря на наличие некоторых различий в интенсивности полос поглощения, их положение и форма остаются неизменными для всех выбранных нами типов хитозанов (рис. 3–6).

Об успешной иммобилизации инулиназы свидетельствует наличие следующих полос по-

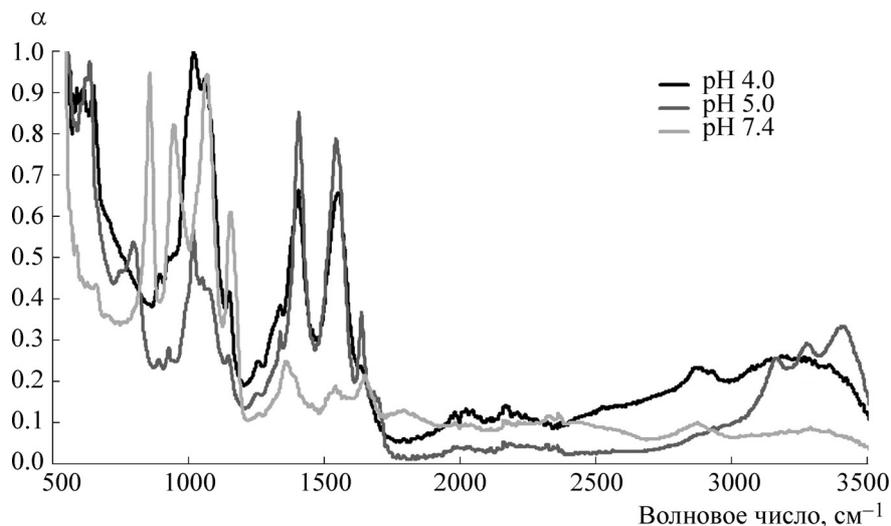
глощения, типичных для белков: «амид I» (1630–1690 см<sup>-1</sup>), «амид II» (1520–1560 см<sup>-1</sup>), «амид III» (1200–1250 см<sup>-1</sup>) и «амид IV» (1050 см<sup>-1</sup>) [18,19].

Перекрытие ряда пиков поглощения фермента и носителя значительно затрудняет анализ ИК-спектров иммобилизованных препаратов (табл. 1). В связи с этим нам пришлось ограничиться рассмотрением лишь неперекрывающихся полос поглощения для инулиназы («амид I» и «амид III») и матрицы хитозана.

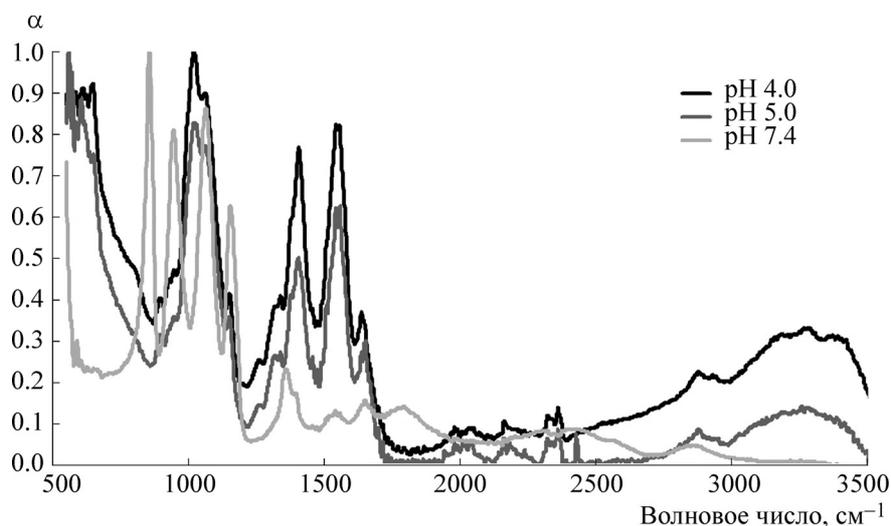
По отношению к основным пикам поглощения матрицы хитозана полоса «амид I» (1630–1690 см<sup>-1</sup>) более выражена в препаратах инулиназы, полученных при ее иммобилизации при pH 7,4 на всех четырех типах носителя (рис. 3–6). Полоса «амид III» имеет сходную интенсивность у всех иммобилизованных образцов, за исключением инулиназы, сорбированной на сукцинате хитозана при pH 7,4, где пик 1200–1250 см<sup>-1</sup> выражен в наибольшей сте-

Таблица 1. Основные пики поглощения инулиназы и матрицы хитозана

Матрица хитозана	Инулиназа
780–860 см <sup>-1</sup>	–
1000–1050 см <sup>-1</sup>	1050 см <sup>-1</sup>
–	1200–1250 см <sup>-1</sup>
1330–1400 см <sup>-1</sup>	–
1500–1560 см <sup>-1</sup>	1520–1560 см <sup>-1</sup>
–	1630–1690 см <sup>-1</sup>
2200–2400 см <sup>-1</sup>	–
2800–3000 см <sup>-1</sup>	–



**Рис. 3.** ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице хитозана кислоторастворимого среднемолекулярного (ХТЗ № 07) при различных значениях pH среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата.

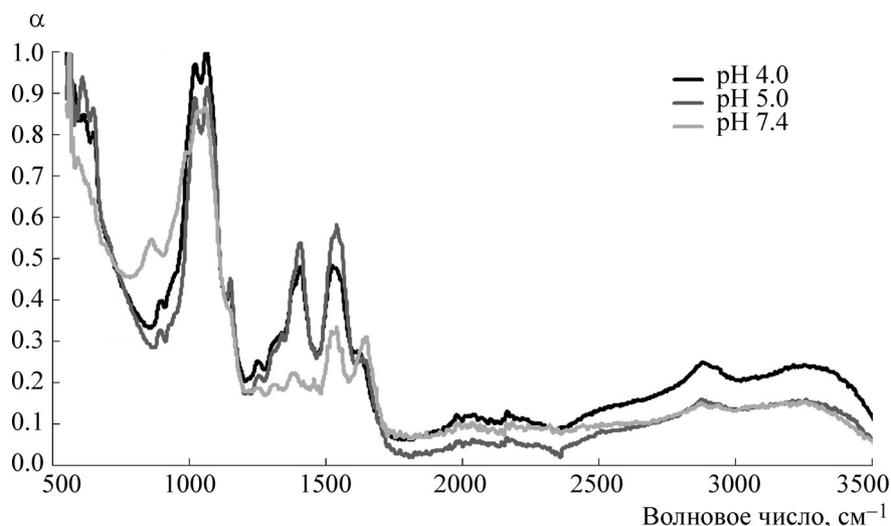


**Рис. 4.** ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице хитозана кислоторастворимого высокомолекулярного (ХТЗ № 12) при различных значениях pH среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата.

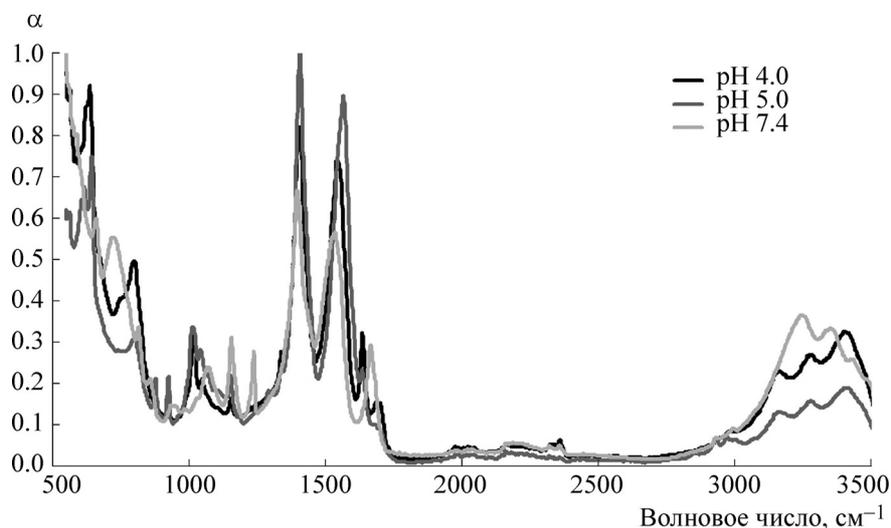
пени. Полученные данные свидетельствуют о более высокой степени сорбции инулиназы на матрице всех четырех типов хитозанов при pH 7,4. Интересно отметить, что полоса 780–860  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая пульсационным колебаниям пиранозного цикла структуры элементарного звена хитозана, также в большей степени выражена у препаратов инулиназы, иммобилизованных при pH 7,4, что может косвенно указывать на формирование локальных участков с высокой концентрацией инулиназы на поверхности матрицы хитозана за счет ад-

сорбции фермента не на матрицу носителя, а на молекулы самого белка.

Полоса 1330–1400  $\text{см}^{-1}$ , обусловленная плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп, более интенсивна у препаратов инулиназы, иммобилизованных при pH 4,0 и 5,0 на всех типах хитозанов, что свидетельствует о наличии большего количества свободных (от адсорбированного фермента) аминогрупп матрицы носителя, чем при использовании в качестве иммобилизационной среды фосфатного буфера с pH 7,4.



**Рис. 5.** ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице пищевого хитозана при различных значениях pH среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата.



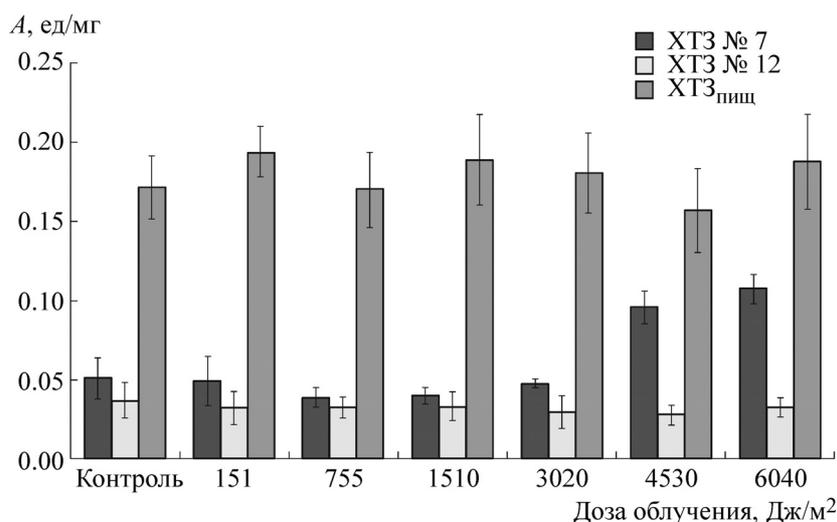
**Рис. 6.** ИК-спектр поглощения инулиназы из *Aspergillus niger* после иммобилизации на матрице сукцината хитозана при различных значениях pH среды;  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата.

Таким образом, можно заключить, что наиболее перспективными для иммобилизации инулиназы среди природных полимеров являются хитозан кислоторастворимый среднемолекулярный ХТЗ № 07 ( $M_r = 200$  кДа, степень деацетилирования 82%) и хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ХТЗ № 12 ( $M_r = 350$  кДа, степень деацетилирования – 94,85%), так как они позволяют получить оптимальное соотношение степени сорбции и удельной каталитической активности препаратов инулиназы. При использовании в качестве носителя пищевого хитозана ( $M_r < 100$  кДа) наблюдается самая высокая удельная активность препарата, однако при нескольких контактах с рабочим

(ацетатным) буфером носитель образует локальные участки геля, что делает затруднительным многократное использование ферментного катализатора, иммобилизованного на его матрице.

Формирование комплекса инулиназа–матрица хитозана происходит в основном за счет гидрофобных взаимодействий, существенную роль играют также электростатические взаимодействия.

В табл. 2 отражены оптимальные условия функционирования гетерогенных ферментных препаратов иммобилизованной инулиназы. Сукцинат хитозана мы не использовали в дальнейших исследованиях из-за высокой потери



**Рис. 7.** УФ-индуцированные изменения удельной каталитической активности инулиназы, иммобилизованной на матрице хитозанов.

активности фермента в ходе адсорбции на его матрице.

Выявлено, что после иммобилизации инулиназы температурный оптимум ее функционирования сдвигается в сторону более высоких значений. При адсорбции на матрице пищевого хитозана он увеличивается до 70°C, что на 20°C выше, чем для нативного энзима. Оптимум значений pH для всех гетерогенных препаратов смещается в более щелочную сторону. При связывании белка с кислоторастворимым среднемолекулярным хитозаном pH оптимум сдвигается до 6,0–7,5.

**УФ-индуцированные изменения функциональных свойств иммобилизованной инулиназы.** Установлено, что при облучении УФ-светом инулиназы, иммобилизованной на матрице пищевого и кислоторастворимого высокомолекулярного хитозанов (XTЗ № 12), во всем диапазоне выбранных нами доз (от 151 до 6040 Дж/м<sup>2</sup>) не происходит статистически значимых изменений активности фермента по сравнению с необлученными образцами (рис. 7). При иммобилизации энзима на кислоторастворимом среднемолекулярном хитозане (XTЗ № 7)

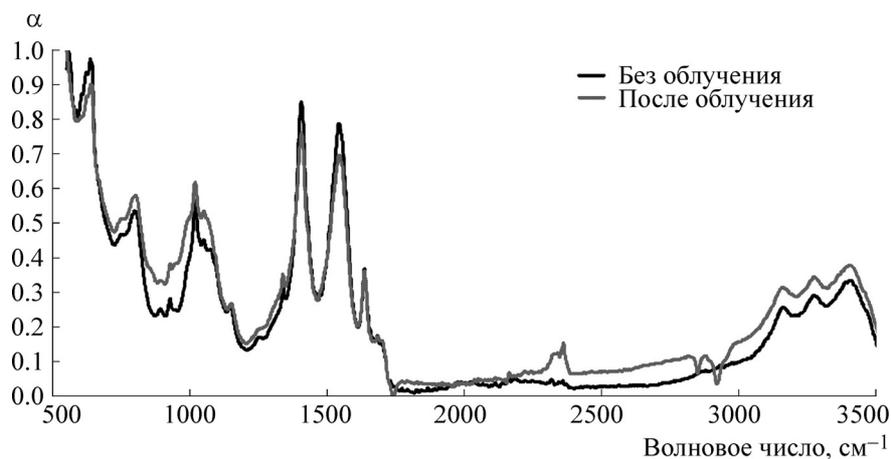
варьирования значений активности препарата не происходит в интервале доз 151–3020 Дж/м<sup>2</sup>, при дозах 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> каталитическая способность иммобилизованной инулиназы увеличивается, вероятно, за счет десорбции фермента в раствор с матрицы носителя.

В пользу этой гипотезы свидетельствуют результаты ИК-спектроскопии (рис. 8). После УФ-облучения в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup> в ИК-спектре инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого среднемолекулярного хитозана (XTЗ № 7), происходят следующие изменения: пики 1035 и 1085 см<sup>-1</sup> формируют единый максимум на 1050 см<sup>-1</sup>, соответствующий валентным колебаниям связей –СН– в первичной аминогруппе; появляются новые пики с максимумом 2818, 2875 и 2976 см<sup>-1</sup>, обусловленные асимметричными и симметричными колебаниями групп –СН и –СН<sub>2</sub>–, что может свидетельствовать об уменьшении доли белка в составе иммобилизованного препарата инулиназы.

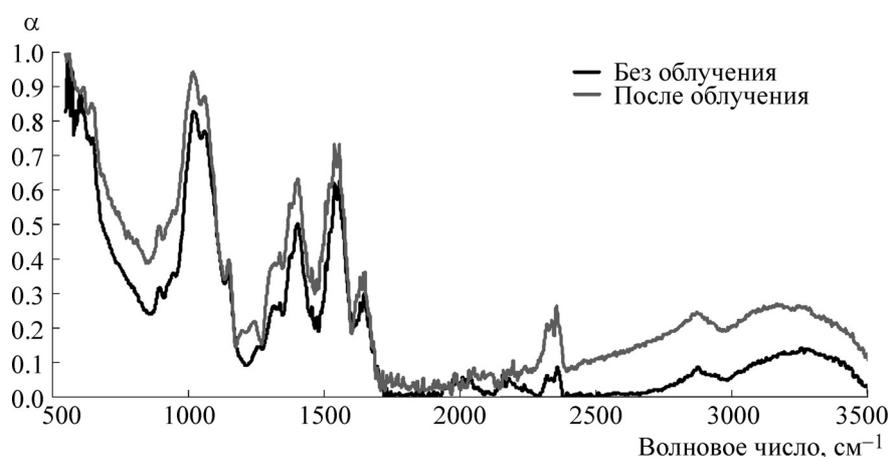
Интересно отметить, что в ИК-спектре инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана (XTЗ № 12), после УФ-облучения в дозе

**Таблица 2.** Оптимальные условия функционирования гетерогенных ферментных препаратов иммобилизованной инулиназы

Параметр	Свободный фермент	Иммобилизованный фермент		
		XTЗ № 07	XTЗ № 12	XTЗ_пищ
pH	4,5–4,7	6,0–7,5	5,0–7,0	5,8–7,0
t, °C	50	50–55	50–70	70



**Рис. 8.** ИК-спектры поглощения инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого средномолекулярного хитозана (ХТЗ № 7) до и после УФ-облучения препарата в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup>.



**Рис. 9.** ИК-спектры поглощения инулиназы, иммобилизованной на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана (ХТЗ № 12) до и после УФ-облучения препаратов в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

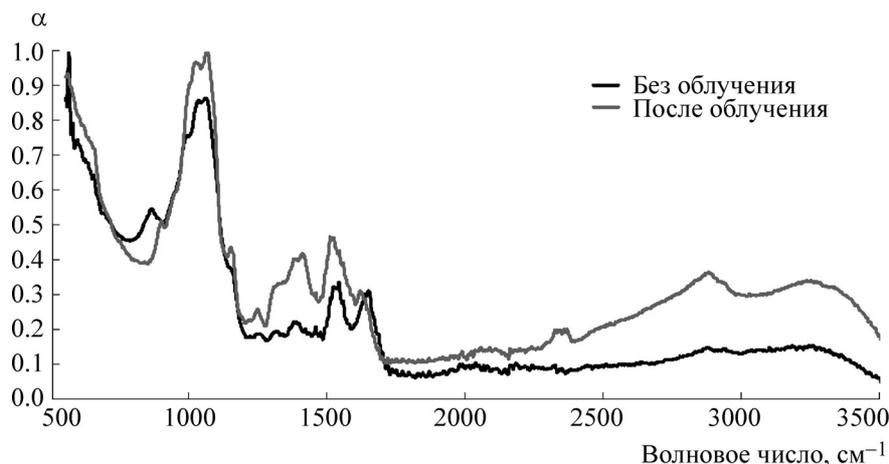
6040 Дж/м<sup>2</sup> усиливается интенсивность полос в области 1200–1240 см<sup>-1</sup>, которая соответствует области «амид III» (рис. 9). В спектре инулиназы, иммобилизованной на матрице пищевого хитозана (рис. 10), после облучения в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup> происходит смещение обусловленного пульсационными колебаниями пиранозного цикла хитозана пика с 850 см<sup>-1</sup> к 890 см<sup>-1</sup>; также наблюдается сдвиг пика полосы амид I с 1637 см<sup>-1</sup> к 1610 см<sup>-1</sup>. Кроме того, более выраженными становятся следующие максимумы: 1016 и 1058 см<sup>-1</sup> (отвечающие валентным колебаниям связей –CN– в первичной аминогруппе), 1232 см<sup>-1</sup> (соответствующий полосе «амид III»), 1371 и 1398 см<sup>-1</sup> (обусловленные плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп), 1506 см<sup>-1</sup> (отвечающий за деформационные колебания группировок –N–N и –C–NH<sub>2</sub>–), что указывает на структурные перестройки как в матрице хитозана, так и в

молекуле иммобилизованного на нем фермента под действием УФ-света.

Приведенные выше данные свидетельствуют о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующим: хитозан вступает во взаимодействие с молекулой инулиназы, образуя комплекс, более фоторезистентный, чем нативные молекулы белка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее перспективными для иммобилизации инулиназы среди тестируемых нами декстранов являются хитозан кислоторастворимый средномолекулярный и хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный, т.к. их применение позволяет получить оптимальное соотношение степени сорбции и удельной каталити-



**Рис. 10.** ИК-спектры поглощения инулиназы, иммобилизованной на матрице пищевого хитозана до и после УФ-облучения препарата в дозе 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

ческой активности препаратов инулиназы. Выдвинуто предположение о том, что формирование комплекса инулиназа–матрица хитозана происходит в основном за счет гидрофобных взаимодействий, существенную роль в этом процессе играют также электростатические взаимодействия.

Обнаружен фотопротекторный эффект матрицы хитозана по отношению к молекулам инулиназы. Установлено, что комплекс инулиназа–хитозан кислоторастворимый среднемолекулярный менее устойчив, как к действию УФ-света, так и к температурным воздействиям, по сравнению с инулиназой, иммобилизованной на матрицах пищевого и кислоторастворимого высокомолекулярного хитозанов.

Область применения результатов – получение биокатализаторов для пищевой промышленности, функционирующих в экстремальных условиях, а следовательно, обладающих перспективными для масштабирования производства особенностями: устойчивость к действию высоких температур, других физических факторов, химических денатурантов и кислых сред.

Исследования иммобилизованной на природных полимерах инулиназы в ближайшие годы, возможно, помогут расширить наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов и усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы, так как реализация перспектив применения ферментов в различных областях науки и техники связана с получением именно иммобилизованных на нерастворимых носителях энзимов, обладающих повышенной стабильностью в отношении денатурирующих агентов и возможностью многократного применения.

Экспериментальные результаты данного исследования были получены на оборудовании Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 16-34-01141 мол\_а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. А. Абеян и Л. С. Манукян, *Биохимия* **61** (6), 1028 (1996).
2. Н. А. Жеребцов, О. С. Корнеева и Т. Н. Тертычная, *Прикладная биохимия и микробиология*. **35** (2), 123 (1999).
3. О. С. Корнеева, *Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды* (Изд-во Воронеж. ун-та, Воронеж, 2001).
4. G. G. Sokolenko and N. A. Karpechenko, *Microbiology* **84** (1), 23 (2015).
5. К. Г. Скрябин *Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение* (Наука, М., 2002).
6. О. О. Логинова, М. Г. Холявка и В. Г. Артюхов, *Биофармацевтич. журн.* **2**, 13 (2015).
7. Д. А. Сливкин, В. Л. Лапенко, О. А. Сафонова и др., *Вестн. Воронежского гос. университета*. **2**, 214 (2011).
8. М. Г. Holyavka, Т. А. Kovaleva, М. V. Grechkina, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **50** (1), 10 (2014).
9. О. Н. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Faar, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
10. Т. А. Kovaleva, М. Г. Kholyavka, А. S. Takha, *Biotechnology in Russia*, № 3, 106 (2007).
11. F. C. MacLaughlin R. J. Mumper, J. Wang, et al., *J. Controlled Release* **56**, 259 (1998).

12. M. Arand, A. M. Golubev, J. R. Neto, et al., *Biochem. J.* **362**, 131 (2002).
13. T. A. Kovaleva, M. G. Kholiyavka, and V. G. Artyukhov, *Biotechnology in Russia*, № 1, 43 (2012).
14. A. Pessoa and M. Vitolo, *Biotechnology Techniques*. **11**, 421 (1997).
15. R. Xiao, M. Tanida, and S. Takao, *J. Ferment. Technol.* **67**, 331 (1989).
16. Y. Ji and X. Zhao, *Wei Sheng Wu Xue Bao* **38**, 120 (1998).
17. M. Warchol, S. Perrin, J. P. Grill, and F. Schneider, *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 462 (2002).
18. M. G. Holyavka, T. A. Kovaleva, S. I. Karpov, et al., *Biophysics* **59** (2), 222 (2014).
19. Т. А. Ковалева и М. Г. Холявка, *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии* **1**, 3 (2011).

## **Interaction of Inulinase Molecules with Chitosan Matrix, UV-Induced Changes in Functional Properties of Immobilized Inulinase**

**M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov, and P.V. Seredin**

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

We have developed a technique for immobilization of inulinase on chitosans with different molecular weights. The acid soluble middle molecular (200 kDa) and high molecular (350 kDa) chitosans are shown to be promising matrices for inulinase adsorption. The assumption is made that the formation of an inulinase–chitosan complex, chitosan as a matrix, is mainly due to hydrophobic interactions, electrostatic interactions also play an essential role. The enzyme complex with high molecular weight chitosan is more stable against the action of UV-light and temperature influences. This allows us to recommend chitosan as the catalyst in the industry for the production of fructose from inulin-containing vegetable raw materials.

*Key words: inulinase, immobilization, chitosan, UV-light*