

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АДСОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ИНУЛИНАЗЫ НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦАХ

© 2017 г. М.Г. Холявка, М.С. Кондратьев*, В.В. Терентьев**, А.А. Самченко*,
А.В. Кабанов*, В.М. Комаров*, В.Г. Аргюхов

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

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3

**Институт фундаментальных проблем биологии РАН,

142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 2

E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.04.16 г.

Исследованы условия и механизмы иммобилизации инулиназы на полимерных носителях: катионитах ВИОН КН-1, КУ-2, анионитах ВИОН АН-1, АВ-17-2П, амфолите КОПАН-90. В расчетных данных при формировании практически всех комплексов инулиназы с указанными носителями для иммобилизации значительную роль играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и водородные связи. Анионит АВ-17-2П – единственная из исследованных полимерных матриц, не образующая водородных связей с инулиназой. Механизмы взаимодействия инулиназы с различными амфолитами, катионо- и анионообменными полимерами отличаются друг от друга. Наиболее сильные различия наблюдаются в механизмах сорбции инулиназы на матрицах ВИОН КН-1 и хитозана. Во взаимодействии фермента со смолами КУ-2 и АВ-17-2П и волокнами ВИОН АН-1 и КОПАН-90 принимает участие до 87% одинаковых аминокислотных остатков.

Ключевые слова: компьютерное моделирование, инулиназа, иммобилизация, молекулярный докинг, хитозан, ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90, КУ-2, АВ-17-2П.

В настоящее время разработка технологии получения пищевых продуктов диабетического и профилактического назначения приобретает все большую актуальность. В связи с этим возрос интерес к фруктозе, которая может быть использована в диетическом питании больных сахарным диабетом. Фруктозу, как правило, получают из крахмала путем многостадийного процесса, включающего расщепление его до глюкозы с последующей обработкой глюкозы глюкозоизомеразой и хроматографическим разделением фруктозы и глюкозы. Перспективным направлением является получение фруктозы из растительного инулинсодержащего сырья, в особенности топинамбура. В клубнях топинамбура содержание инулина достигает 20–25%, а сироп при этом содержит не менее 70% фруктозы.

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7), расщепляющая инулин и другие фруктозосодержащие полимеры до фруктозы, широко распространена среди высших растений и микроорганизмов и может применяться для промышленного получения фруктозы из растительного сырья. Однако возмож-

ности применения ферментов ограничены по крайней мере двумя причинами. Во-первых, они неустойчивы при хранении, а также при различных воздействиях, особенно тепловых. Во-вторых, многократное использование ферментов затруднено из-за сложности их отделения от реагентов и продуктов реакции. К тому же достаточно трудно однозначно прогнозировать поведение фермента и кинетику реакции в промышленных ферментерах. Подобные затруднения можно преодолеть путем получения ферментных препаратов, иммобилизованных на нерастворимых носителях.

Рекомбинантную инулиназу из *Escherichia coli*/pMSiftOptR и *Escherichia coli*/pMSiftOptWT успешно сорбировали на анионообменных смолах Duolite A561, Duolite A568, Amberlite IRA67 и Amberlite IRA 94S. При этом соответственно выявлялся следующий уровень активности: 4,5, 20,6, 1,7 и 19,8% для фермента из *Escherichia coli*/pMSiftOptR и 4,2, 19,3, 1,6 и 19,0% при сорбции фермента из *Escherichia coli*/pMSiftOptWT [1].

Была осуществлена адсорбция инулиназы из *Kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 на

анионите Streamline DEAE [2]. Авторы работы [3] иммобилизовали клетки *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, обладающие инулиназной активностью, на альгинате бария, обработанном глутаровым альдегидом. После пяти циклов гидролиза инулина иммобилизованные клетки сохраняли 85% активности. В работе [4] была изучена адсорбция инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 на катионообменной смоле Streamline SP.

Авторы работы [5] связывали молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* YS-1 с Duolite A568 через основания Шиффа между карбонильными группами активированного носителя и свободными аминокетильными группами белка. Для активирования носителя использовали глутаровый альдегид. Иммобилизованный препарат снижал на 10% свою активность при использовании его в течение 4 циклов, на 20% – после 7 циклов, на 50% – по окончании 55 циклов.

В работе [6] описан биосенсор на основе иммобилизованных фруктозодегидрогеназы и инулиназы на золотых наночастицах цистеаминна для определения содержания инулина в пище. Минимальная концентрация инулина, определяемая биосенсором, – $6,6 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Сенсор проявлял высокую селективность по отношению к другим углеводам.

Был предложен новый высокостабильный носитель для иммобилизации инулиназы – сополимер глицидилметакрилата, содержащий большое количество эпоксильных групп и обладающий большим количеством поперечных сшивок. Препарат был стабилен более 28 дней [7].

Инулиназа из *Ulocladium atrum* была иммобилизована на мембранах, содержащих хитозан, что позволяло использовать препарат в течение 38–42 циклов гидролиза [8]. Инулиназа из *Aspergillus niger* была адсорбирована на углеродных нанотрубках с соотношением сорбент: сорбат, равным 1:460. Препарат был стабилен в течение пяти недель при комнатной температуре [9]. Инулиназа из *Aspergillus niger* была также иммобилизована на матрице конканавалина [10] и монтмориллонита [11]. Инулиназа была включена в поры ксерогеля с эффективностью 80%. Препарат сохранял активность в четырех циклах реакции по 24 часа [12].

В Воронежском государственном университете эмпирическим путем были разработаны адсорбционный и ковалентный способы иммобилизации инулиназы на ряде синтетических катионитов и анионитов, позволяющие сохранить до 80–85% активности нативного фермента [13,14]. Однако несмотря на множество практических разработок в области иммобилизации

карбогидраз, молекулярные механизмы этого процесса до конца не изучены. Имеются лишь данные инфракрасной спектроскопии и электронной микроскопии комплексов фермент–носитель, которые не позволяют составить полную картину о типах, числе и длине связей и взаимодействиях внутри комплекса иммобилизованного ферментного препарата и матрицы носителя. Результаты рентгеноструктурного анализа и молекулярного докинга представлены в открытой печати лишь для комплексов карбогидраз и их низкомолекулярных лигандов. В связи с этим целью работы было выявление механизма процесса адсорбционной иммобилизации инулиназы на полимерных матрицах: расчет значений аффинности фермента по отношению к носителям для иммобилизации, определение числа, типов и длин связей и взаимодействий между молекулой инулиназы и носителем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модели фермента, ставшей мишенью для докинга, в банке данных Protein Data Bank (PDB) нами была выбрана структура инулиназы из *Aspergillus ficuum* (код молекулы: 3SC7), которая была получена методом рентгеновской дифракции в 2011 г. с разрешением 1,5 Å, что вполне подходит для компьютерных расчетов методом гибкого докинга [15].

В процессе подготовки к расчетам данная модель была «очищена» от молекул воды и других веществ. Важно отметить, что эта инулиназа была кристаллизована вместе с некоторыми органическими лигандами, в том числе с D-маннозой, которая является активатором фермента [16]. Известное местоположение этого сахара на поверхности фермента дало нам возможность прокалибровать выбранный пакет для докинга (Autodock VINA) на вполне конкретном примере комплекса маннозы и инулиназы. Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белка, а также выбрана ячейка для расчета докинга, размеры которой составили $68 \times 58 \times 60$ Å. Центр молекулы белка (которая рассматривалась в жесткой форме) находился в точке с координатами ($x = 37,044$; $y = -36,997$; $z = -5,365$). Эти же данные для мишени использовались нами и для последующих расчетов выбранного набора лигандов.

По результатам докинга, предсказанное программой место взаимодействия смоделированного лиганда хорошо согласуется с экспериментально установленной локализацией ман-



Рис. 1. Локализация компонентов матриц для иммобилизации инулиназы в области торца N-домена при связывании с молекулой фермента.

нозы. Аффинность такого связывания составила $-4,5$ ккал/моль.

Для всех полимеров была выбрана длина цепочки в пять звеньев. Каждый из лигандов в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Заряды на молекуле лиганда расставлялись автоматически – в пакете MGLTools 1.5.6.rc3.

Объектами для проведения экспериментов были инулиназы из *Kluveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*, гомогенные фракции которых получали в лаборатории кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета [17].

В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP Biomedicals (США), выделенный из цикория (молекулярная масса порядка 5000 Да). В качестве синтетических носителей для иммобилизации применяли ионообменные смолы и волокна, подробное описание которых дано в наших работах [13,18]. Для гидролиза субстрата мы использовали термостатируемый стеклянный реактор. Температура гидролиза – 70°C , pH 4,5 [16].

Содержание белка в пробах определяли методом Лоури [19]. Каталитическую активность фермента измеряли спектрофотометрически резорциновым методом [16]. За единицу каталитической активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ фруктозы за 1 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изученный нами набор лигандов включал в себя хитозан, катионообменные и анионообменные смолы и волокна, краткая характеристика которых представлена в табл. 1.

Для высокомолекулярных лигандов (хитозан, поликатиониты и полианиониты) было выявлено место связывания с молекулой инулиназы – торцевая часть « β -бочки» в N-домене белка (рис. 1) – сторона, противоположная локализации активного центра инулиназы.

Выявленная нами в расчетах локализация мест связывания матриц для иммобилизации инулиназы дает объяснение крайне низкому снижению уровня каталитической активности фермента при связывании с подложкой: места сорбции инулиназы не затрагивают активный центр фермента и даже, возможно, в некоторой степени ориентируют макромолекулу, более эффективно экспонируя ее активный центр к субстрату.

Стоит отметить, что в указанном ряду лигандов наибольшей аффинностью к мишени обладала матрица катионообменной смолы КУ-2, расчет показал величину сродства $-7,3$ ккал/моль. Полученные расчетные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными (табл. 2): при иммобилизации инулиназы из *Kluveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* процент сохранения активности у гетерогенных препаратов тем выше, чем выше аффинность фермента к матрице носителя.

Ранее нами было установлено непосредственное участие сульфогруппы в процессе сорбции инулиназы на матрице КУ-2 [20]. Опреде-

Таблица 1. Структура элементарных звеньев носителей для иммобилизации инулиназы

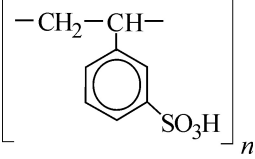
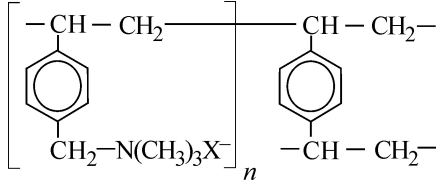
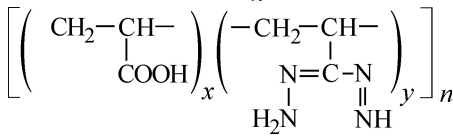
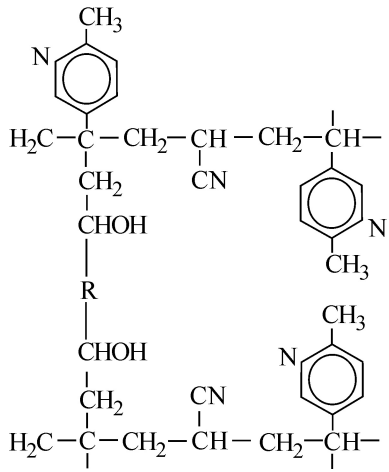
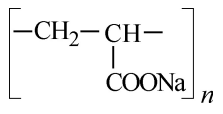
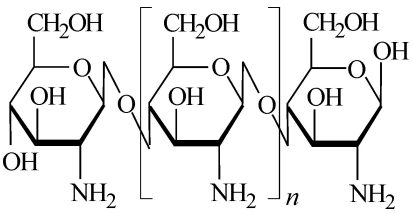
Название ионита	Тип ионита	Структура элементарного звена
КУ-2	Катионит, смола	
АВ-17-2П	Анионит, смола	
КОПАН-90	Амфолит, волокно	
ВИОН АН-1	Анионит, волокно	
ВИОН КН-1	Катионит, волокно	
Хитозан		

Таблица 2. Значения аффинности и процента сохранения активности инулиназы при иммобилизации

Носитель	Аффинность, ккал/моль	Процент сохранения активности инулиназы	
		из <i>Kluyveromyces marxianus</i> [13,16]	из <i>Helianthus tuberosus</i> [18]
КУ-2	-7.3	61.7	80.4
АВ-17-2П	-6.8	75.5	22.5
ВИОН КН-1	-5.8	27.5	8.7
КОПАН-90	-5.9	16.9	22.7
ВИОН АН-1	-6.5	35.8	20.6

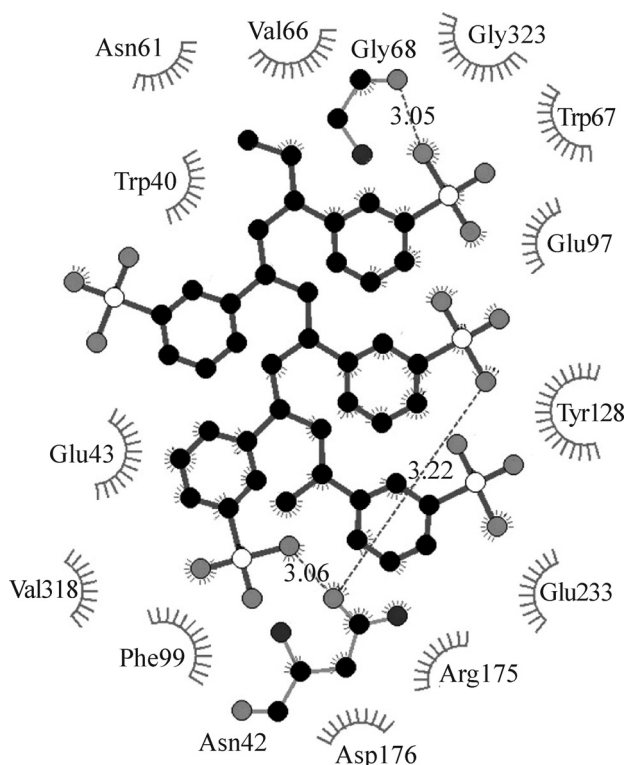


Рис. 2. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей КУ-2 (пунктирными линиями обозначены водородные связи).

ленный вклад в формирование комплекса фермент–носитель вносят водородные связи [21]. Из рис. 2 отчетливо видно, что сульфогруппы катионита КУ-2 образуют две водородные связи с остатком Asn42 (3,06 и 3,22 Å) и одну водородную связь с остатком Gly68 (3,05 Å). Кроме того формируется ряд ван-дер-ваальсовых взаимодействий между сульфогруппами и углеродной матрицей носителя и остатками Trp40, Glu43, Asn61, Val66, Trp67, Glu97, Phe99, Tyr128, Arg175, Asn176, Glu233, Val318, Gly323.

Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей АВ-17-2П представлены на рис. 3, который демонстрирует наличие только ван-дер-ваальсовых взаимодействий между анионом и ферментом, причем в образовании этих взаимодействий со стороны носителя участвуют как атомы углерода, так и атомы азота, а со стороны белка – аминокислотные остатки Trp40, Asn42, Glu43, Gln59, Trp67, Glu97, Phe99, Tyr128, Thr130, Gln133, Val166, Glu233, Val234, Thr255, Asn265, Asp298, Asn320, Gly323, Lys332.

На основании данных инфракрасной спектроскопии установлено, что связывание белковой глобулы с матрицей ВИОН КН-1 происходит за счет связей между карбоксильными группами иона и положительно заряженными

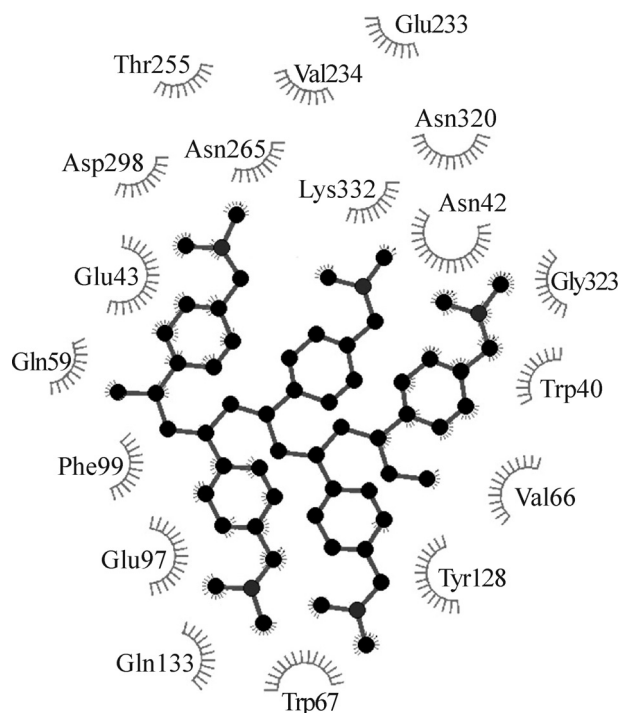


Рис. 3. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей АВ-17-2П.

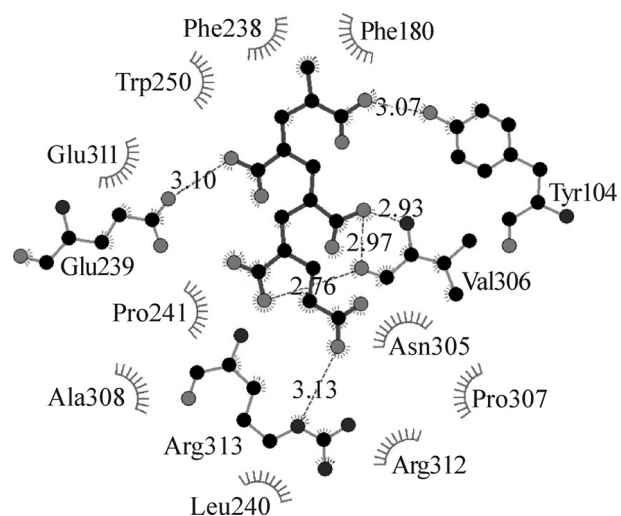


Рис. 4. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей ВИОН КН-1 (пунктирными линиями обозначены водородные связи).

аминокислотными остатками инулиназы [20]. Из рис. 4 следует, что Arg313 образует водородную связь длиной 3,13 Å с карбоксильной группой волокна, водородные связи образуются также между остатками Tyr104 (3,07 Å), Glu239 (3,10 Å), Val306 (три водородные связи длиной 2,97, 2,96 и 2,76 Å) фермента и матрицей носителя. Кроме того, сорбция инулиназы на ка-

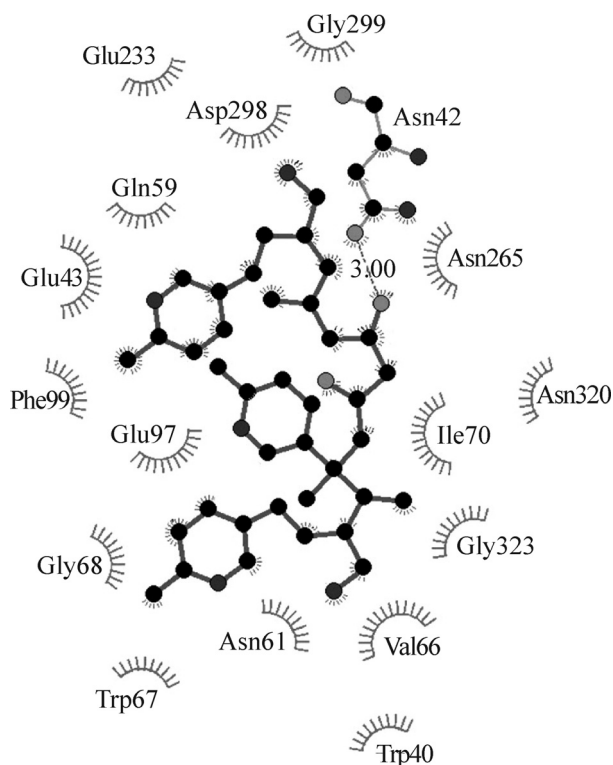


Рис. 5. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей ВИОН АН-1 (пунктирной линией обозначена водородная связь).

тионите ВИОН КН-1 поддерживается ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между атомами углерода и кислорода матрицы волокна и остатками Phe180, Phe238, Leu240, Pro241, Trp250, Asn305, Pro307, Ala308, Gly311, Arg312 фермента.

Рис. 5 отражает связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей ВИОН АН-1. Анионит образует водородную связь длиной 3,00 Å с остатком Asn42 молекулы инулиназы и ряд ван-дер-ваальсовых взаимодействий с Trp40, Glu43, Gln59, Asn61, Trp67, Gly68, Ile70, Glu97, Phe99, Val166, Glu233, Asn265, Asp298, Gly299, Gly323, Asn320.

Волокно КОПАН-90 образует пять водородных связей со следующими аминокислотными остатками инулиназы: Glu43 (3,10 Å), Gln59 (2,77 Å), Val66 (две связи – 2,77 и 2,8 Å), Glu233 (3,07 Å), а также ряд ван-дер-ваальсовых взаимодействий – с остатками Asn42, Trp67, Ile70, Glu97, Phe99, Tyr128, Arg175, Thr255, Asn265, Asp298, Gly299, Gly323, Asn320 (рис. 6).

Матрица хитозана формирует девять водородных связей с Arg183 (3,21 Å), Gln184 (2,8 Å), Glu239 (2,8 и 3,31 Å), Asn305 (3,07 Å), Val306 (3,10 Å), Pro307 (3,06 Å), Gly311 (3,23 и 3,24 Å), ван-дер-ваальсовы взаимодействия – с Tyr104,

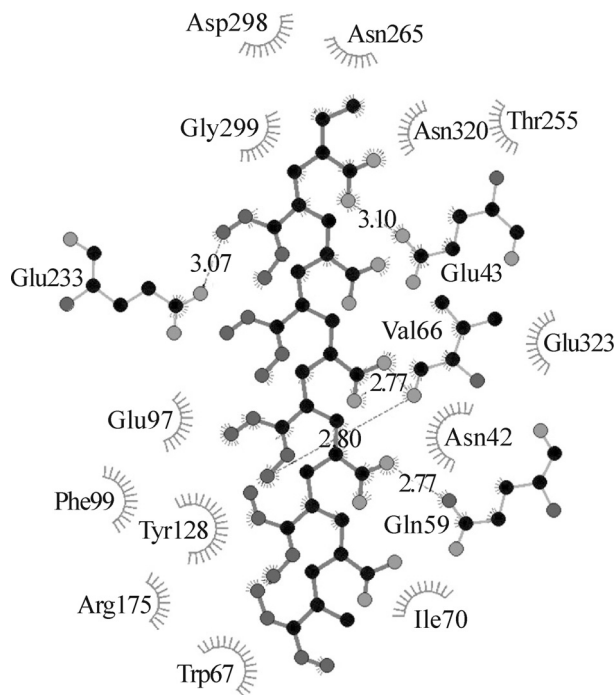


Рис. 6. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей КОПАН-90 (пунктирными линиями обозначены водородные связи).

Phe180, Phe181, Phe238, Trp250, Val304, Arg312, Arg313 (рис. 7).

Следует отметить, что многие аминокислотные остатки на поверхности инулиназы формируют контактную область при сорбции фермента сразу на нескольких, существенно отличающихся друг от друга по структуре и заряду, носителях. Например, во взаимодействии матрицы КУ-2 и инулиназы принимают участие лишь два (Asn176 и Val318) «уникальных» (не встречающихся в образовании связей и взаимодействиях с матрицами других носителей) аминокислотных остатка, остальные 15 остатков участвуют в образовании водородных связей или ван-дер-ваальсовых взаимодействий фермента с другими ионитами или хитозаном. В частности, остатки Asn42, Gln43, Trp67, Glu97, Phe99, Gly233, Gly323 встречаются в контактной области молекулы инулиназы и следующих носителей: КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН АН-1, КОПАН-90. При этом смола КУ-2 является катионитом, волокно КОПАН-90 – амфолитом, а смола АВ-17-2П и волокно ВИОН АН-1 – анионитами. При взаимодействии КУ-2 и ВИОН АН-1 с молекулой инулиназы «общими» при формировании контактной области являются Asn61 и Gly68, для пары КУ-2 и КОПАН-90 – Val66 и Arg175. Во взаимодействии инулиназы с матрицами КУ-2, АВ-17-2П,

ВИОН АН-1 участвует Trp40, а с носителями КУ-2, АВ-17-2П, КОПАН-90 – Tyr128.

Остатки Gln59, Asp298 и Asn320 участвуют в сорбции инулиназы на матрицах трех ионитов: АВ-17-2П, ВИОН АН-1, КОПАН-90; Val166 и Asn265 – на поверхности АВ-17-2П и ВИОН АН-1, Thr255 – на АВ-17-2П и КОПАН-90.

«Уникальными» при образовании ван-дер-ваальсовых взаимодействий с ферментом для АВ-17-2П являются остатки Thr130, Gln133, Val234, Asn265, Lys332. Водородных связей анионит (единственный из исследуемых нами носителей) с инулиназой не образует.

«Уникальных» аминокислотных остатков для волокон ВИОН АН-1 и КОПАН-90 не выявлено, но «общими» только для этой пары являются Ile70 и Gly299.

Интересно, что «общих» с другими четырьмя носителями (КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН АН-1, КОПАН-90) аминокислотных остатков в области взаимодействия с молекулой инулиназы у пары ВИОН КН-1 и хитозан не обнаружено, однако внутри пары «общими» являются Glu239 и Val306, которые участвуют в образовании водородных связей, а также Phe180, Phe238, Arg312, формирующие ван-дер-ваальсовы взаимодействия между инулиназой и матрицами для иммобилизации.

Необходимо подчеркнуть, что в расчетных данных при формировании практически всех комплексов инулиназы с носителями значительную роль играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Известно, что отдельные ван-дер-ваальсовы взаимодействия крайне слабы, однако сумма их энергий довольно значительна и вполне способна быть определяющей силой, отвечающей за стабильность сформированного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе исследования на модели фермента инулиназы, а также моделях ее лигандов – фрагментах матриц для иммобилизации – были определены аффинности связывания и на основании этого сделаны выводы о перспективности экспериментального тестирования некоторых из соединений в качестве иммобилизационных агентов для инулиназы.

Несмотря на то, что в расчетных данных при формировании практически всех комплексов инулиназы с носителями значительную роль играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и водородные связи, механизмы процесса адсорбции инулиназы на матрицах различных амфолитов, катионо- и анионообменных полимеров отлич

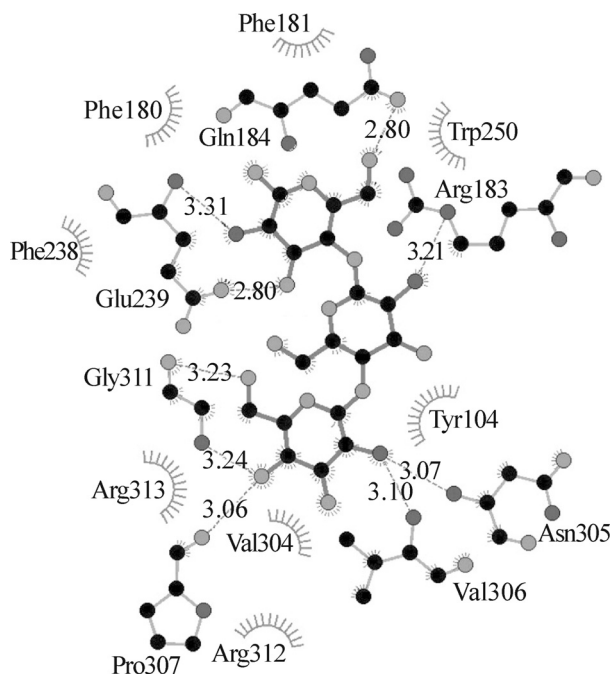


Рис. 7. Связи и взаимодействия между молекулой инулиназы и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи).

чаются друг от друга. Наиболее сильные различия, по сравнению с другими носителями, наблюдаются в механизмах сорбции инулиназы на матрицах ВИОН КН-1 и хитозана. Во взаимодействии фермента со смолами КУ-2 и АВ-17-2П и волокнами ВИОН АН-1 и КОПАН-90 принимает участие до 87% одинаковых аминокислотных остатков.

Приведенные в статье материалы могут быть использованы для более глубокого изучения молекулярных механизмов взаимодействия инулиназы с матрицей ряда синтетических ионитов; их необходимо принимать во внимание при разработке новых способов оценки и регулирования структурного состояния белковых молекул в условиях их иммобилизации на различных типах носителей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 16-33-50037-мол_нр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Letca, C. Hemmerling, M. Walter, et al., Roum. Biotechnol. Lett. **9** (5), 1879 (2004).
2. Y. Makino, P. S. Lima, F. M. Filho, and M. I. Rodrigues, Brazil. J. Chem. Engineer. **22** (4), 539 (2005).

3. E. Barranco-Flrido, M. Garcia-Garibay, L. Gomez-Ruiz, and A. Azaola, *Process Biochem.* **37** (5), 513 (2001).
4. S. J. Kalil, F. Maugeri, and M. I. Rodrigues, *Process Biochem.* **40**, 581 (2005).
5. R. S. Singh, R. Dhaliwal, and M. Puri, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34** (10), 649 (2007).
6. J. Manso, M. A. Mena, P. Yanez-Sedeno, and J. M. Pingarron, *Anal. Biochem.* **375** (2), 345 (2008).
7. M. Trytek, J. Fiedurek, B. Podkościelna, et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42** (7), 985 (2015).
8. T. M. Mohamed, S. M. El-Souod, E. M. Ali, et al., *J. Biosci.* **39** (5), 785 (2014).
9. T. B. Garlet, C. T. Weber, R. Klaić, et al., *Molecules* **19** (9), 14615 (2014).
10. C. Altunbas, M. Uygun, D. A. Uygun, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170** (8), 1909 (2013).
11. G. de Oliveira Kuhn, C. D. Rosa, M. F. Silva, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169** (3), 750 (2013).
12. G. L. Santa, S. M. Bernardino, S. Magalhaes, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **165** (1), 1 (2011).
13. T. A. Kovaleva, M. G. Kholyavka, and A. S. Takha, *Biotechnology in Russia* **2**, 73 (2009).
14. T. A. Kovaleva, M. G. Holyavka, and S. S. Bogdanova, *Bull. Experim. Biol. Medicine* **148** (1), 39 (2009).
15. J. Pouyez, A. Mayard, A. M. Vandamme, et al., *Biochimie* **94**, 2423 (2012).
16. T. A. Kovaleva, M. G. Kholyavka, and A. S. Takha, *Biotechnology in Russia* **3**, 106 (2007).
17. M. G. Holyavka, T. A. Kovaleva, M. V. Grechkina, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **50** (1), 10 (2014).
18. M. G. Kholyavka, T. A. Kovaleva, E. A. Khрупina, et al., *Biotechnology in Russia* **6**, 31 (2012).
19. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Faar, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
20. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, С. И. Карпов и др., *Биофизика* **2**, 274 (2014).
21. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, В. Г. Артюхов и др., *Фундаментальные исследования* **4**, 663 (2013).

The Molecular Mechanism of the Adsorption Immobilization of Inulinase on Polymer Matrices

M.G. Holyavka*, **M.S. Kondratyev****, **V.V. Terentyev*****, **A.A. Samchenko****,
A.V. Kabanov**, **V.M. Komarov****, and **V.G. Artyukhov***

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

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The conditions and mechanisms of immobilization of inulinase with polymeric immobilization carriers: cation-exchangers VION KN-1, KU-2, anion-exchangers VION AN-1, AV-17-2P, ampholyte KOPAN-90 were studied. The calculated data show a significant role played by van der Waals interactions and hydrogen bonds in the formation of virtually all of inulinase complexes with the immobilization matrices. Among all of the studied polymeric matrices, anion-exchanger AV-17-2P is the only matrix that is unable to form hydrogen binding with inulinase. Mechanisms of interaction between inulinase and various ampholytes, cation and anion exchange resins differ from each other. The strongest distinctions are observed in sorption mechanisms of inulinase on VION KN-1 and chitosan matrices. About 87% of the identical amino acid residues are involved in interaction of enzyme with KU-2 and AV-17-2P resins and VION AN-1 and KOPAN-90 fibers.

Key words: computer modeling, inulinase, immobilization, molecular docking, chitosan, VION KN-1, VION AN-1, KOPAN-90, KU-2, AV-17-2P