

УДК 547.458.65: 612.396.19

Т.А. КОВАЛЕВА*, М.Г. ХОЛЯВКА, А.С. ТАХА

Воронежский государственный университет, Воронеж, 394000

e-mail: toma@icmail.ru

Разработка гетерогенного катализатора на основе иммобилизованного препарата инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*

Осуществлена адсорбционная иммобилизация фермента инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 на катионнообменном волокне ВИОН КН-1 и определены оптимальные условия функционирования данного препарата. Исследованы физико-химические свойства иммобилизованного фермента и характеристики реакции гидролиза инулина свободной и иммобилизованной инулиназой.

Ключевые слова: адсорбционная иммобилизация, инулиназа, катионнообменное волокно.

Особую значимость в настоящее время приобретают работы по иммобилизации ферментов, расщепляющих полисахариды и полифруктозиды. Иммобилизация энзима на носителе переводит его из разряда гомогенных катализаторов в гетерогенные, имеющие ряд технологических преимуществ.

Инулиназа (2,1-в-D-фруктанфруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) специфически гидролизует в-2,1-связи инулина до фруктозы и фруктоолигосахаридов, причем условия этой реакции более мягкие, чем кислотного гидролиза, требующего низких значений pH, высокой температуры и применения специального кислотоустойчивого оборудования. В связи с этим особую значимость приобретают работы по изучению структурно-функциональных свойств иммобилизованного фермента и кинетики гидролиза инулинсодержащего сырья, а также ряд теоретических и практических вопросов, связанных с изучением влияния природы носителя на активность инулиназы.

Производство фруктозы из крахмала ферментативным путем состоит из нескольких этапов и тре-

буется в уменьшающейся концентрации и ионообменники отмывали нейтральной реакцией в ОН-форму их обрабатывали растворами гидроксида натрия в нарастающей концентрации (0,1—0,25 н.), затем отмывали дистиллированной водой. Для более полного удаления примесей катионно-щелочную обработку проводили трехкратно.

Для кондиционирования ионообменных волокон ВИОН КН-1 последние помещали в дистиллированную воду. После промывания обрабатывали раствором HCl переменной концентрации (0,5 н., 1,0, 1,5, 1,0 и 0,5 н.) для удаления ионов железа. Далее волокна промывали дистиллированной водой и осуществляли попеременную четырехкратную обработку NaOH и HCl (1 н.).

Для проведения сорбционной иммобилизации фермента инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 на катионнообменном волокне ВИОН КН-1 и определены оптимальные условия функционирования данного препарата. Исследованы физико-химические свойства иммобилизованного фермента и характеристики реакции гидролиза инулина свободной и иммобилизованной инулиназой.

бует наличия трех различных ферментов: б-амилазы, глюкоамилазы и глюкозоизомеразы. При этом получают 45%-ный фруктозный сироп. Применение инулиназы для расщепления инулинсодержащего сырья позволяет осуществлять процесс в одну стадию и получать 95%-ный фруктозный сироп.

Целью нашей работы было исследование условий иммобилизации инулиназы, выделенной из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-303, на различных носителях адсорбционным методом, а также изучение физико-химических свойств иммобилизованного ферментного препарата и реакции гидролиза инулина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследований является фермент инулиназа, выделенный из дрожжей *K. marxianus*, обладающих способностью к биосинтезу гидролитических ферментов с высокой активностью [1—6]. Культура дрожжей *K. marxianus* Y-303 была получена из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва).

Список сокращений: SDS — додецилсульфат натрия.

* Автор для переписки.

Глубинное культивирование дрожжей проводили в колбах емкостью 500 см³, содержащих по 50 см³ питательной среды, в течение 72 ч на лабораторной круговой качалке.

Для выращивания *K. marxianus* использовали питательную среду, включающую, %: пептон — 1,0; дрожжевой экстракт — 0,5; фруктозу — 2. Среду стерилизовали в течение 40 мин при 0,8 МПа, охлаждали до 30° и инокулировали водной суспензией дрожжей. Биомассу продуцента отделяли от питательной среды путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин, затем промывали водой и снова центрифугировали в тех же условиях. Готовую биомассу продуцента сушили при 25—27°.

Для выделения фермента биомассу экстрагировали ацетатным буфером, рН 4,7 (1,5—2 ч при 20—22° и перемешивании), центрифугировали (35 мин при 3000 об/мин) и супернатант подвергали дальнейшей обработке. Фермент осаждали 80%-ным изопропиловым спиртом в соотношении 1:4 и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме ацетатного буфера (рН 4,7). Дальнейшую очистку инулиназы проводили методом гель-фильтрации на сефадексе G-150 (Pharmacia, Швеция) [7, 8]. Гомогенность полученных препаратов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по модифицированному методу Дэвиса без SDS [9].

В качестве носителей для иммобилизации фермента использовали анионообменные смолы АМ 21А (опытное производство НИИ пластических масс) и АВ-16ГС (Производственное объединение “Азот”) и катионообменное волокно ВИОН КН-1 (опытное производство Института физической и органической химии НАН Белоруссии) [10]. Подготовку ионитов к иммобилизации осуществляли путем кондиционирования ионообменников и перевода их в нужную форму [11, 12]. Для этого исследуемые образцы ионообменных смол помещали в насыщенные растворы NaCl на 3—4 ч (для предотвращения растрескивания гранул), и затем носители промывали дистиллированной водой. Для удаления минеральных примесей иониты обрабатывали растворами HCl в соотношении 5 об. на 1 об. смолы в нарастающей концентрации (0,5 н., 1,0, 2,0 и 3,0 н.) до полного отсутствия ионов железа. Затем проводили обработку соляной кисло-

той в уменьшающейся концентрации и ионообменники отмывали дистиллированной водой до нейтральной реакции среды. Для перехода ионитов в ОН-форму их обрабатывали растворами гидроксида натрия в нарастающей концентрации (0,1—0,25 н.), затем отмывали дистиллированной водой. Для более полного удаления примесей кислотно-щелочную обработку проводили трехкратно.

Для кондиционирования ионообменных волокон ВИОН КН-1 последние помещали в дистиллированную воду и после набухания обрабатывали в статических условиях раствором HCl переменной концентрации (0,5 н., 1,0, 1,5, 1,0 и 0,5 н.) для удаления ионов железа. Далее волокна промывали дистиллированной водой и осуществляли попеременную четырехкратную обработку NaOH и HCl (1 н.).

Для проведения сорбционной иммобилизации 5 г носителя оставляли на ночь при комнатной температуре в 50 мл ацетатного буфера (рН 4,5). К суспензии ионита добавляли 5 мл фермента (10⁻⁵ М) и перемешивали в колбе с помощью мешалки в течение 1,5 ч при 25°, далее центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Осадок промывали ацетатным буфером (рН 4,5) до отсутствия в промывных водах белка. Контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-46 (Россия) при λ 190 нм и 280 нм.

Содержание белка в опытах со свободным ферментом определяли методом Лоури, для иммобилизованной инулиназы использовали модифицированный метод Лоури [13]. Каталитическую активность энзима измеряли спектрофотометрическим методом при помощи реакции Селиванова [9]*.

Активность инулиназы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{a}{180bt},$$

где А — каталитическая активность, ед/мг белка для растворимого фермента (носителя для иммобилизованного); а — количество фруктозы, мкг; b — концентрация фермента в реакционной смеси, мг/мл гидролизата; t — время гидролиза, мин; 180 — молекулярная масса фруктозы. При расчете активности иммобилизованного фермента учитывали содержание фермента в 1 г носителя.

* За единицу каталитической активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль фруктозы за 1 мин в условиях эксперимента.

Для определения активности свободного ферментного препарата реакцию гидролиза инулина проводили, используя два термостатируемых ферментера (контрольный и опытный), в которых реакционная смесь перемешивалась с помощью магнитной мешалки. Условия эксперимента были следующие: температура 50°, pH 4,7, концентрация инулина $5 \cdot 10^{-4}$ М, время реакций 20 мин [14, 15].

При определении каталитической активности иммобилизованного фермента инкубацию осуществляли в ферментере периодического действия при температуре 70°, pH 4,5, концентрации инулина $5 \cdot 10^{-4}$ М в течение 20 мин и постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Далее гидролизат анализировали на содержание фруктозы.

Для гидролиза субстрата в непрерывном режиме мы использовали стеклянный реактор, который представляет собой термостатируемую колонку высотой 20 см и диаметром 1 см. При подготовке реактор промывали ацетатным буфером (pH 4,7), в него помещали 0,5 г препарата иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы с содержанием фермента 4,95 мг и каталитической активностью 20,2 ед. Температура гидролиза 70°, pH 4,5, концентрация инулина $5 \cdot 10^{-4}$ М.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета программ Statgraphics. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммобилизация — один из путей повышения устойчивости ферментов к денатурирующим

воздействиям внешней среды, обеспечивающий многократное применение биокатализаторов в фармацевтической, пищевой промышленности, а также в аналитических целях.

Инулиназа была выделена из биомассы дрожжей *K. marxianus* путем осаждения изопропиловым спиртом с последующей очисткой методом гель-хроматографии на сефадксе G-150 (табл. 1). Элюцию фермента проводили ступенчато цитратно-фосфатным буфером (pH 4,7) со скоростью 12 мл/ч. Показано, что инулиназной активностью обладает фракция с $V_e = 54$ мл.

Для определения кажущейся молекулярной массы использовали набор белков-маркеров: каталаза — 230 кДа; бычий сывороточный альбумин — 68 кДа; α -интерферон — 22 кДа и цитохром с — 13 кДа. Установлено, что кажущаяся молекулярная масса инулиназы составляет 63 кДа. Электрофорез в полиакриламидном геле выявил гомогенность полученного препарата инулиназы *K. marxianus*.

Ряд исследователей осуществляли иммобилизацию инулиназы на разнообразных носителях. Так, при включении фермента в альгинатный гель он сохранял 35% активности свободного энзима. Инулиназа, выделенная из клеток *Penicillium* sp., была включена в гель каррагинана. Препарат сохранил 11,7% активности свободного фермента. D. Letca и соавт. использовали для иммобилизации инулиназы макропористые ионообменники Duolite A 568 и Amberlite 94 S и получили ферментные препараты, сохраняющие 19,3% и 19,0% активности свободного энзима, соответственно [16]. Оптимальная температура реакции гидролиза инулина при использовании иммобилизованной инулазы характеризовалась сдвигом в область более высоких температур (50° для

Таблица 1

Выделение инулиназы из дрожжей *K. marxianus*

Стадия, объект очистки	Количество белка, мг/мл	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	$1,227 \pm 0,021$	$0,082 \pm 0,015$	1,0	100,0
Экстракт культуры	$0,541 \pm 0,009$	$0,254 \pm 0,009$	3,1	44,1
Осаждение изопропиловым спиртом	$1,128 \pm 0,007$	$0,814 \pm 0,008$	9,9	10,4
Гель-хроматография на сефадксе G-150	$0,025 \pm 0,007$	$1,470 \pm 0,007$	17,9	2,0

свободного фермента, 55° — для иммобилизованного) [17].

Иммобилизованные ферменты, используемые в пищевой и фармацевтической промышленности, должны отвечать жестким санитарно-гигиеническим нормам. Поэтому в качестве носителей в наших экспериментах применяли ионообменники ВИОН-КН-1, АВ-16-ГС, АМ-21-А, используемые при водоподготовке и обесцвечивании конечных продуктов производства аминокислот. ВИОН характеризуется высокой скоростью сорбции и регенерации (в 10—15 раз выше, чем для зернистых материалов), высокой емкостью, селективностью, гидролитической устойчивостью к действию кислот, щелочей, регенерирующих агентов (сохранение обменной емкости после 100 и более циклов сорбция—регенерация). Несмотря на то, что описано большое количество методов связывания ферментов с носителем, выбор ионообменника и способа иммобилизации остается во многом эмпирическим [18, 19].

Показано, что инулиназа, иммобилизованная на волокнистом ионите ВИОН КН-1, сохраняла 27,5% активности свободного фермента. При связывании со смолой АВ-16-ГС оставалось 17,8% первоначальной активности, а при адсорбционной иммобилизации на ионите АМ-21-А — 14,5% активности (рис. 1). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что наиболее эффективным носителем для иммобилизации инулиназы является ионообменное волокно ВИОН КН-1.

Далее исследовали зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной на ионообменном волокне ВИОН КН-1 инулиназы от температуры гидролиза (рис. 2).

Показано, что максимальную каталитическую активность свободный фермент проявляет при 50°, что вполне согласуется с литературными данными. Так, для фермента *K. marxianus* var. *bulgaricus* температурный оптимум соответствует 55° [6] а для инулиназы *K. marxianus* Y-85 EI — 52° [3].

Для инулиназы, адсорбционно иммобилизованной на ВИОН КН-1 (а также на АВ-16-ГС и АМ-21-А), максимум активности достигается при 70°, что на 20° выше, чем свободного фермента. Кроме того, растворимый фермент полностью инактивируется при 80°, тогда как при иммобилизации каталитическая активность при 80° сохраняется на уровне 80% от максимальной.

Вероятно, повышение оптимальной температуры реакции гидролиза инулина иммобилизованным ферментным препаратом обусловлено тем, что при присоединении к носителю происхо-

дит повышение жесткости третичной структуры фермента. Чем больше образовано связей между носителем и ферментом, тем большей стабильностью обладает белковая молекула при повышении температуры [18, 19].

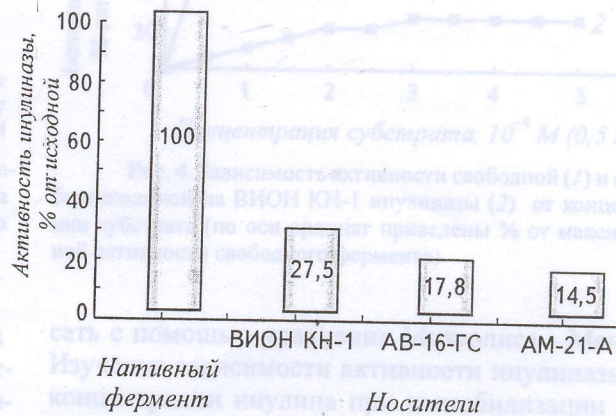


Рис. 1. Активность инулиназы при иммобилизации на различных носителях

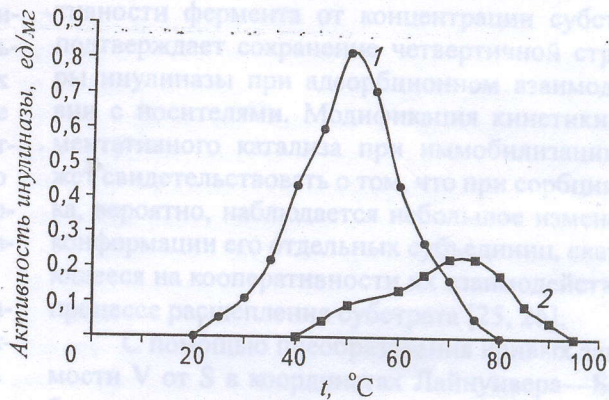


Рис. 2. Зависимость активности свободной (1) и иммобилизованной на ВИОН КН-1 (2) инулиназы от температуры

Анализ данных литературы показывает, что инулиназы из различных микроорганизмов различаются по рН-оптимуму. Грибные и дрожжевые инулиназы проявляют максимальную активность в более кислой среде (рН 4,0—5,5), бактериальные — в диапазоне рН 5,5—7,5. По данным различных авторов, рН-оптимум для инулиназ из *K. marxianus* составляет 4,4—7,5 [20]. Так, для фермента *K. marxianus* ATCC52466 оптимальное значение рН = 6,0 [4], а для инулиназы *K. marxianus* T-2 рН = 5,0 [2].

По нашим данным, оптимальное значение рН для свободного фермента составляет 4,7 (рис. 3).

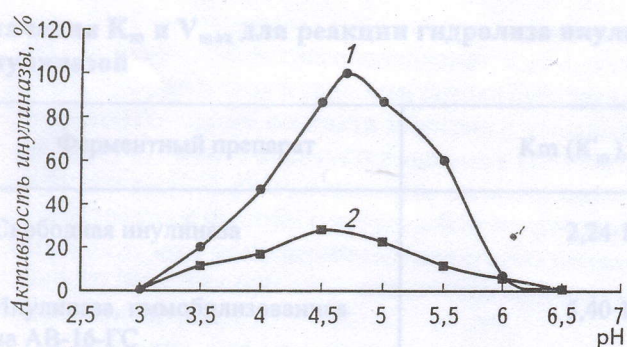


Рис. 3. Зависимость активности свободной (1) и иммобилизованной на ВИОН КН-1 (2) инулиназы от pH среды. За 100% принята максимальная активность свободного фермента

При иммобилизации энзима на всех исследуемых носителях оптимум pH практически не изменяется: наблюдается лишь некоторое расширение диапазона значений, которое можно объяснить различием между локальными значениями pH микроокружения активного центра в иммобилизованном состоянии и в растворе [21].

Анализ полученных данных позволяет предположить, что механизмы устойчивости иммобилизованных ферментов к действию экстремальных значений pH и температуры, а также других денатурирующих агентов обусловлены прежде всего изменением их третичной структуры, ответственной за образование фермент-субстратного комплекса. При этом предотвращаются такие процессы, как агрегация молекул фермента и диссоциация олигомерных белков на субъединицы.

Однако следует помнить, что иммобилизация может приводить и к значительной потере активности фермента, что увеличивает важность подбора носителя [22].

Изучение ферментативного катализа иммобилизованными энзимами необходимо для выявления механизмов действия мембраносвязанных ферментов, олигомерных белков и полиферментных систем, сконструированных по модульному принципу [23].

К иммобилизованным ферментам применимы основные положения теории гетерогенного катализа. Иммобилизация ферментов, как правило, приводит к изменению кинетических и термодинамических параметров ферментативных реакций, поэтому их обозначают как кажущиеся (K'_m , V'_{max} и т.д.). Для большинства ферментов значение K'_m при иммобилизации увеличивается, а V'_{max} уменьшается [24, 25].

Нами показано, что кинетику реакции, катализируемой свободным ферментом, нельзя опи-

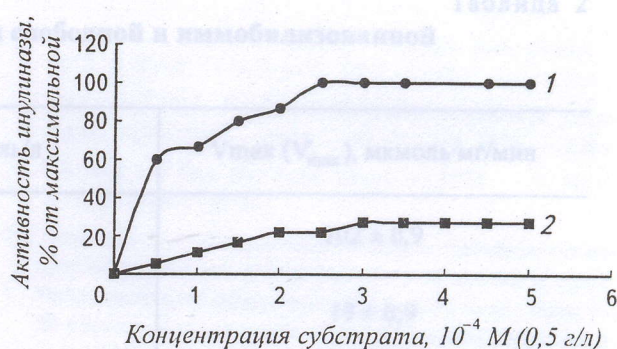


Рис. 4. Зависимость активности свободной (1) и иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы (2) от концентрации субстрата (по оси ординат приведены % от максимальной активности свободного фермента)

сать с помощью уравнения Михаэлиса—Ментен. Изучение зависимости активности инулиназы от концентрации инулина при иммобилизации инулиназы на ионообменном волокне ВИОН КН-1 показало, что ее кинетика в определенном приближении подчиняется закономерности Михаэлиса—Ментен (рис. 4).

Наличие изломов на кривых зависимости активности фермента от концентрации субстрата подтверждает сохранение четвертичной структуры инулиназы при адсорбционном взаимодействии с носителями. Модификация кинетики ферментативного катализа при иммобилизации может свидетельствовать о том, что при сорбции белка, вероятно, наблюдается небольшое изменение конформации его отдельных субъединиц, сказывающееся на кооперативности их взаимодействия в процессе расщепления субстрата [25, 26].

С помощью преобразования кривых зависимости V от S в координатах Лайнуивера—Берка были определены K_m и V_{max} (а также K'_m и V'_{max}) реакции гидролиза инулина изучаемыми ферментными препаратами (табл. 2).

Сравнительный анализ кривых $V(S)$ и значений основных кинетических параметров реакции гидролиза инулина полученными иммобилизованными препаратами инулиназы из *K. marxianus* позволяют сделать вывод, что наибольшее сродство к субстрату проявляет инулиназа, адсорбционно связанная с ионообменником ВИОН КН-1. Очевидно, данное волокно достаточно прочно связывается с инулиназой, обеспечивая более высокую термо- и pH-стабильность белка. В связи с этим вполне вероятно, что ВИОН КН-1 окажется пригодным для многократного использования в лабораторных и промышленных условиях.

В следующей серии экспериментов изучали влияние условий хранения и длительного исполь-

Таблица 2

Значения K_m и V_{max} для реакции гидролиза инулина свободной и иммобилизованной инулиназой

Ферментный препарат	K_m (K'_m), моль/л	V_{max} (V'_{max}), мкмоль·мг/мин
Свободная инулиназа	$2,24 \cdot 10^{-4}$	$102 \pm 0,9$
Инулиназа, иммобилизованная на АВ-16-ГС	$5,40 \cdot 10^{-4}$	$19 \pm 0,9$
Инулиназа, иммобилизованная на АМ-21-А	$6,10 \cdot 10^{-4}$	$15 \pm 0,9$
Инулиназа, иммобилизованная на ВИОН КН-1	$3,30 \cdot 10^{-4}$	$35 \pm 0,9$

зависимости от скорости потока субстрата на активность инулиназы, иммобилизованной на ВИОН КН-1.

Каталитическая активность фермента и содержание белка в иммобилизованном препарате, который хранили в сухом виде при комнатной температуре, не изменялись на протяжении двух лет.

Известно, что наиболее предпочтительными в промышленных условиях являются реакторы непрерывного действия, позволяющие автоматизировать технологический процесс. Кроме того, при использовании реакторов непрерывного

действия возрастает время контакта фермента с субстратом. При этом диффузионные затруднения доступа молекулы субстрата к молекуле иммобилизованного фермента преодолеваются более эффективно по сравнению с реакцией гидролиза в реакторе периодического действия. Создаются благоприятные условия для образования фермент-субстратного комплекса [27]. Поэтому мы изучили особенности непрерывного гидролиза инулина в реакторе колоночного типа [28, 29].

Было показано, что при пропускании раствора инулина через колонку иммобилизованного препарата инулиназы со скоростью 3 мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза. Активность препарата в реакторе колоночного типа в этом случае на 69% превысила его активность в ферментере при периодическом способе гидролиза субстрата.

При увеличении скорости потока субстрата каталитическая активность иммобилизованной инулиназы снижается. При 4 мл/мин и при 5 мл/мин активность фермента уменьшается на 24% и 52%, соответственно, по сравнению с его активностью в реакторе периодического действия (рис. 5).

Это явление можно объяснить следующим образом. Для протекания реакции катализа в случае иммобилизованного фермента молекула субстрата диффундирует внутрь матрицы носителя. При малых скоростях потока диффузионные затруднения преодолеваются за счет увеличения времени взаимодействия фермента с субстратом и

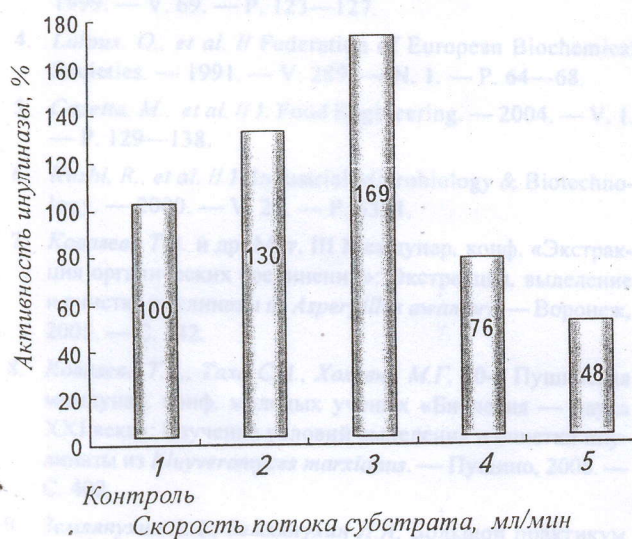


Рис. 5. Активность иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы при различной скорости потока субстрата. Контроль (100%) — максимальная активность в реакторе периодического действия в оптимальных условиях

создания благоприятных условий для возникновения фермент-субстратного комплекса. Соответственно, при увеличении скорости потока субстрата уменьшается время контакта инулина с инулиназой, и, в результате образуется меньшее количество фруктозы [27]. Для достижения максимальной эффективности иммобилизованный препарат инулиназы следует использовать в реакторах непрерывного действия при скорости потока субстрата 3 мл/мин (см. рис. 5).

Показано, что при многократном использовании иммобилизованного препарата его активность практически не изменялась (данные не приведены).

Таким образом, был получен ферментный препарат иммобилизованной инулиназы, выделенный из дрожжей *K. marxianus*, с высокой активностью. Подобраны оптимальные условия, а также исследованы физико-химические свойства и характеристики реакции гидролиза инулина свободной и иммобилизованной на ионообменном волокне ВИОН КН-1 инулиназой. Показана устойчивость препарата при хранении и использовании.

Получено 10.01.07

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян В.А., Манукян Л.С. // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 6. — С. 1028—1036.
2. Pessoa, A., Vitolo, M. // Braz. J. Chem. Eng. — 1999. — V. 16. — N. 3. — P. 324—340.
3. Selvakumar, P., Pandey, A. // Bioresource Technology. — 1999. — V. 69. — P. 123—127.
4. Laloux, O., et al. // Federation of European Biochemical Societies. — 1991. — V. 289. — N. 1. — P. 64—68.
5. Cazetta, M., et al. // J. Food Engineering. — 2004. — V. 1. — P. 129—138.
6. Kushi, R., et al. // J. Industrial Microbiology & Biotechnology. — 2000. — V. 25. — P. 6381.
7. Ковалева Т.А. и др. Мат. III Междунар. конф. «Экстракция органических соединений»: Экстракция, выделение и очистка инулиназы из *Aspergillus awamori*. — Воронеж, 2005. — С. 342.
8. Ковалева Т.А., Таха С.А., Холявка М.Г. 10-я Пушкинская междунар. конф. молодых ученых «Биология — наука XXI века»: Изучение условий выделения и очистки инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*. — Пушкино, 2006. — С. 402.
9. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по биохимии и физиологии растений: Учеб. пособие. — Воронеж: Изд-во Воронеж ун-та, 1996. — 188 с.
10. Иониты. Каталог. — Черкассы: Отделение НИИТЕХ-Ма, 1975. — 37 с.
11. Горбунов Н.В., Полянский Н.Г. // Журн. физ. химии. — 1978. — Т. 52. — № 5. — С. 1259—1262.
12. Полянский Н.Г., Горбунов Н.В., Полянская Н.Л. Методы исследования ионитов. — М.: Химия, 1976. — 208 с.
13. Chibata, I. // Pure and Appl. Chem. — 1978. — V. 50. — N. 7. — P. 667—675.
14. Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобилизованными амилазами: Дис... д-ра биол. Наук. — Воронеж: Воронежский государственный университет, 1998. — 421 с.
15. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. — Воронеж: ВГУ, 2001. — 184 с.
16. Letca, D., et al. // Roum. Biotechnol. Lett. — 2004. — V. 9. — N. 5. — P. 1879—1886.
17. Nakamura, T., Nakatsu, S. // J. Agr. Chem. Soc. Jap. — 1977. — V. 51. — N. 12. — P. 681—689.
18. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы: В 2 т. / Под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинек. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — Т. 1. — 296 с.
19. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. — М.: Мир, 1983. — 213 с.
20. Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Селеменев В.Ф. // Вестник ВГУ. Серия химия, биология. — 2000. — № 6. — С. 119—123.
21. Селеменев В.Ф. Обменные процессы и межмолекулярные взаимодействия в системах ионит—вода—аминокислота: Дис... д-ра хим. наук. — Воронеж: Воронежский государственный университет, 1993. — 587 с.
22. Шкутина И.В. Адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы на ионогенных и неионогенных носителях: Дис. канд. биол. наук. — Воронеж: Воронежский государственный университет, 2001. — 145 с.
23. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. — Тбилиси: Мецниереба, 1984. — 154 с.
24. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. — 720 с.
25. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1990. — 350 с.
26. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 1. — М.: Мир, 1982. — 389 с.
27. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. — М.: Академия, 2003. — 208 с.
28. Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Холявка М.Г. // Современные проблемы науки и образования. — 2006. — № 5. — С. 92—93.
29. Ковалева Т.А., Кожокина О.М. Влияние условий хранения и режимов работы в реакторе колончатого типа на структурно-функциональные свойства иммобилизованной инулазы: Теория и практика сорбционных процессов. Межвузовский сб. науч. трудов. В. 26. — Воронеж, 2000. — С. 98—100.

T.A. KOVALEVA*, M.G. HOLYAVKA, and A.S. TAKHA

Voronezh State University, 394000, Voronezh Russia

e-mail: toma@icmail.ru

Development of a Heterogeneous Biocatalyst on the Basis of the Immobilized Inulinase Preparation from *Kluyveromyces marxianus*

The adsorption immobilization of enzyme inulinase from *Kluyveromyces marxianus* on a cation-exchange fibre VION KN-1 has been performed; the optimum conditions for functioning of this preparation were determined. Physical and chemical properties of the immobilized enzyme and characteristics of the inulin hydrolysis by free and immobilized inulinase were investigated.

Key words: adsorption immobilization, cation-exchange fibre, inulinase.

В номере

- Система mini-Mu использована для интеграции генов синтеза аминокислот в хромосому *E.coli*
- Выделен пептид бацилл, ответственный за подавление фитопатогенных грибов и бактерий

*Author for correspondence.