

УДК 577.15

Доцент О.Л. Мещерякова, аспирант Ю.С. Новикова,  
старший преподаватель Е.П. Анохина, профессор О.С. Корнеева  
(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра биохимии и биотехнологии.  
тел. (473) 255-55-57  
E-mail: katya\_anoh@mail.ru

Assistant Professor O.L. Meshcheriakova, graduate Yu.S. Novikova,  
senior lecturer E.P. Anokhina, professor O.S. Korneeva  
(Voronezh state university of engineering technologies) Department of biochemistry and  
biotechnology. phone (473) 255-55-57  
E-mail: katya\_anoh@mail.ru

## Получение и характеристика биокатализаторов на основе иммобилизованных гликозидаз

## Preparation and characterization of biocatalysts based on immobilized glycosidases

Реферат. Ферменты подкласса гликозидаз, расщепляющие поли- и олигосахариды до простых сахаров, имеют большое прикладное значение для различных областей промышленности. К таким ферментам относятся  $\alpha$ -L-фукозидаза и  $\beta$ -фруктофуранозидаза.  $\alpha$ -L-Фукозидаза расщепляет фукоидан бурых водорослей до фукозы и фукоолигосахаридов. Фукоза обладает пребиотическим, иммуностропным действием, а также широким спектром биологических активностей в организме позвоночных, фукоолигосахариды – антиоксидантными и пребиотическими свойствами. В связи с этим фукоза и ее полимеры могут быть востребованы в пищевой, кормовой и фармацевтической промышленности.  $\beta$ -Фруктофуранозидаза гидролизует сахарозу с образованием инвертного сиропа повышенного качества и биологической ценности, что представляет интерес для сахарной промышленности. С целью интенсификации процессов гидролиза фукоидана и сахарозы за счет более высокой стабильности и возможности многократного использования ферментных препаратов проведена иммобилизация  $\alpha$ -L-фукозидазы на хитозане и  $\beta$ -фруктофуранозидазы на ионообменнике марки ФИБАН А-6 адсорбционным методом. Активности иммобилизованных  $\alpha$ -L-фукозидазы и  $\beta$ -фруктофуранозидазы составили 80 и 70 % от активности свободных ферментов соответственно. Установлено, что иммобилизованная  $\beta$ -фруктофуранозидаза проявляет максимальную активность при pH 4,0-4,1, иммобилизованная  $\alpha$ -L-фукозидаза – при pH 7,0. Оптимальные значения pH иммобилизованных ферментов совпадают с таковыми для свободных ферментов. Оптимальная температура гидролиза субстратов иммобилизованными  $\alpha$ -L-фукозидазой и  $\beta$ -фруктофуранозидазой составила 50 и 70 °C соответственно, что на 10 °C и 20 °C выше по сравнению со свободными ферментами. Исследования показали достаточную стабильность иммобилизованных гликозидаз, так при 4-кратном их использовании ферментативная активность снижалась в 1,5 раза; при хранении полученных биокатализаторов в холодильной камере в течение 4-6 месяцев сохранилось 80 % каталитической активности ферментов.

Summary. Enzymes subclass glycosidases cleaving poly- and oligosaccharides to simple sugars, are of great practical importance for a variety of industries. Such enzymes include  $\alpha$ -L-fucosidase and  $\beta$ -fructofuranosidase.  $\alpha$ -L-fucosidase splits fucoidan kelp to fucose and fucooligosaccharides. Fucose has prebiotic, immunotropic action, and a wide spectrum of biological activity in vertebrates, fucooligosaccharides - antioxidant and prebiotic properties. In this regard, and fucose polymers may be demanded in the food, feed and pharmaceutical industry.  $\beta$ -fructofuranosidase sucrose hydrolysis with the formation of invert syrup high quality and biological value that is of interest to the sugar industry. In order to intensify the processes of hydrolysis of fucoidan and sucrose due to the higher stability and reusability of enzyme preparations carried immobilization  $\alpha$ -L-fucosidase on chitosan and  $\beta$ -fructofuranosidase of ion exchange brand FIBAN A-6 adsorption method. Activity of the immobilized  $\alpha$ -L-fucosidase and  $\beta$ -fructofuranosidase were 80 and 70% of the activity of the free enzyme, respectively. Found that immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase exhibits maximal activity at pH 4,0-4,1, the immobilized  $\alpha$ -L-fucosidase - at pH 7,0. The optimal pH of immobilized enzymes similar to those for the free enzyme. Optimal temperature hydrolysis substrates immobilized  $\alpha$ -L-fucosidase and  $\beta$ -fructofuranosidase was 50 and 70 °C respectively, 10 °C and 20 °C higher compared to free enzymes. Studies have shown sufficient stability of immobilized glycosidases, so at 4-fold using their enzymatic activity decreased by 1.5 times; Biocatalysts obtained in storage in the refrigerator for 4-6 months retained 80% of the catalytic activity of enzymes.

**Ключевые слова:** гликозидазы,  $\alpha$ -L-фукозидаза,  $\beta$ -фруктофуранозидаза, фукоидан, фукоза, фукоолигосахариды, сахароза, инвертный сироп, адсорбция, иммобилизация, хитозан, волокнистый ионообменник, гидролиз, субстрат.

**Keywords:** glucosidase,  $\alpha$ -L-fucosidase,  $\beta$ -fructofuranosidase, fucoidan, a fucose, fucooligosaccharides, sucrose, invert syrup, adsorption, immobilization, chitosan fiber ion exchanger hydrolysis substrate.

---

© Мещерякова О.Л., Новикова Ю.С.,  
Анохина Е.П., Корнеева О.С., 2014

Гликозидазы – ферменты, широко распространенные в природе и играющие большую роль в обмене веществ живой клетки, преобразуя олиго- и полисахариды в более простые сахара, доступные клетке для дальнейшего катаболизма с целью получения необходимых структурных элементов и химической энергии [1]. Особенно велико прикладное значение этих ферментов для биотехнологии и пищевой промышленности с целью получения функциональных продуктов.

Так, в последнее время возрос интерес к разработке биотехнологий пищевых продуктов диабетического и профилактического назначения. Актуальным в настоящее время является производство «минорного» сахара – фукозы, обладающего пребиотическим, иммуностимулирующим действием [2, 3] и биологической активностью в организме позвоночных [4, 5], а также фукоолигосахаридов, проявляющих антиоксидантную и пребиотическую активность [3, 6].

Одним из перспективных способов получения фукозы и фукоолигосахаридов является гидролиз фукоиданов бурых водорослей  $\alpha$ -L-фукозидазой.  $\alpha$ -L-Фукозидаза расщепляет гликозидные связи в фукоиданах – матричных полисахаридах бурых водорослей с образованием фукозы и фукоолигосахаридов, которые представляют интерес для пищевой, кормовой и фармацевтической промышленности.

Достаточно устойчивый и стабильно возрастающий спрос имеет производство инвертного сиропа (сахара), представляющего собой смесь глюкозы и фруктозы в различном соотношении и являющегося крупнотоннажным продуктом пищевой промышленности. Этот продукт в 1,2-1,5 раза слаще сахарозы и отличается более мягким вкусом, меньшей вязкостью и большим содержанием сахаристых веществ по сравнению с сахарными сиропами [7]. Замена кислотного способа инверсии сахарозы при производстве инвертного сахара на ферментативную с использованием специфического фермента  $\beta$ -фруктофуранозидазы позволяет существенно повысить качество инвертного сахара и его биологическую ценность.

Иммобилизация ферментов  $\alpha$ -L-фукозидазы и  $\beta$ -фруктофуранозидазы позволит интенсифицировать процессы гидролиза фукоиданов и сахарозы за счет более высокой стабильности и возможности многократного использования ферментных препаратов, что существенно снизит стоимость конечных продуктов. А получение гетерогенных биокатализаторов на основе указанных иммобилизо-

ванных гликозидаз, способных работать в непрерывном режиме, является перспективным подходом к промышленному усовершенствованию этих процессов.

Целью данного исследования являлось получение высокостабильных биокатализаторов на основе иммобилизованных  $\alpha$ -L-фукозидазы и  $\beta$ -фруктофуранозидазы для увеличения кратности их использования в реакционных циклах.

Объектами исследования служили  $\alpha$ -L-фукозидаза *Aspergillus awamori* и  $\beta$ -фруктофуранозидаза *Kluyveromyces marxianus* Y-303 с каталитическими активностями 2310 ед/г и 2700 ед/мг соответственно.

В качестве носителя для иммобилизации  $\alpha$ -L-фукозидазы использовали хитозан со степенью деацетилирования  $>85\%$  и молекулярной массой  $>300$  kDa;  $\beta$ -фруктофуранозидазы – волокнистый ионообменник марки ФИБАН А-6, подготовку которого осуществляли путем кондиционирования и перевода его в нужную ионообменную форму [8].

Активность  $\alpha$ -L-фукозидазы определяли по количеству свободной фукозы по методу Дише [9], определение активности  $\beta$ -фруктофуранозидазы осуществляли методом Бертрана [10] и методом Сомоджи-Нельсона [11]. За единицу активности  $\alpha$ -L-фукозидазы и  $\beta$ -фруктофуранозидазы принимали такое количество фермента, которое образует 1 мкмоль фукозы или редуцирующих веществ соответственно за 1 мин в стандартных условиях.

Иммобилизацию  $\alpha$ -L-фукозидазы и  $\beta$ -фруктофуранозидазы проводили адсорбционным способом. Для иммобилизации  $\alpha$ -L-фукозидазы сорбент помещали в водный раствор фермента различных концентраций (0,1-2,0 мг/см<sup>3</sup>). Иммобилизацию  $\beta$ -фруктофуранозидазы осуществляли по разработанной нами ранее методике [12]. Эффективность иммобилизации контролировали по содержанию остаточного белка в ферментном растворе.

Содержание белка определяли модифицированным методом Лоури [11], используя калибровочный график, построенный по бычьему сывороточному альбумину («Sigma», США).

Для определения оптимального pH действия свободных и иммобилизованных ферментов осуществляли гидролиз субстратов в интервале pH 3,0-8,0. Влияние температуры на каталитическую активность свободных и иммобилизованных ферментов исследовали в интервале температур 20-80 °C.

Стабильность полученных биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов исследовали в течение 6 мес.

В качестве носителя для иммобилизации  $\alpha$ -L-фукозидазы использовали хитозан. Хитозан отличается от других носителей высокой сорбционной емкостью и способностью образовывать прочные комплексы с белковыми молекулами. Основной моделью взаимодействия хитозана с белковыми молекулами выступает сорбционная модель физико-химического взаимодействия субстратов. При этом исключается химическое взаимодействие с образованием прочных ковалентных связей. [13]. Кроме того, хитозан сохраняет свойства поверхности в растворенном состоянии, что делает его пригодным для проведения иммобилизации адсорбционным способом в водных растворах фермента.

На рисунке 1 показана кривая сорбции фермента на хитозане в зависимости от концентрации раствора фермента.

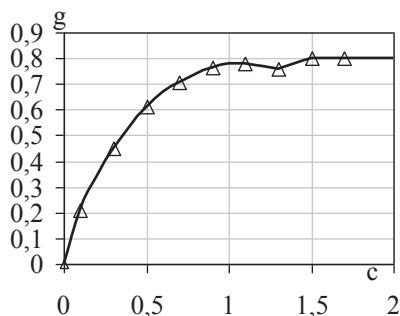


Рисунок 1. Кривая сорбции  $\alpha$ -L-фукозидазы на хитозане в зависимости от концентрации раствора ферментного препарата: g – масса белка, связавшегося с носителем, мг/г; c – концентрация водного раствора фермента, мг/см³

Исследование зависимости сорбции от концентрации раствора фермента показало, что максимальная степень сорбции  $\alpha$ -L-фукозидазы наблюдалась в интервале концентраций 0,1-1,8 мг/см³. При увеличении концентрации фермента оптическая плотность растворов при сорбции не отличалась от свободного фермента, что говорит о том, что иммобилизация фермента идет в интервале низких концентраций. Было установлено, что для иммобилизации  $\alpha$ -L-фукозидазы достаточно 1,2 г хитозана, который содержал в среднем 0,8 мг фермента. Выход иммобилизованного фермента находился в диапазоне 65-68 %.

График имеет вид плавно восходящей кривой с горизонтальным участком после насыщения, на которой наблюдается небольшой перегиб. Этот эффект, по-видимому, является результатом полислойной адсорбции и следствием особенностей и равновесного характера процессов сорбции и десорбции. Он обусловлен актив-

ностью поверхности твердой фазы, определяемой величиной ее поверхностного потенциала или взаимодействием функциональных групп в процессе элюирования фермента. Вблизи точек перегиба кривая имеет практически горизонтальный участок, что свидетельствует о постоянной концентрации фермента.

При создании гетерогенного ферментного препарата на основе иммобилизованной  $\alpha$ -L-фукозидазы необходимо изучить физико-химические свойства полученного комплекса фермент-носитель. В связи с этим были исследованы зависимости каталитической активности свободной и иммобилизованной  $\alpha$ -L-фукозидазы от pH и температуры. На рисунке 2 показана зависимость свободной и иммобилизованной  $\alpha$ -L-фукозидазы от величины pH.

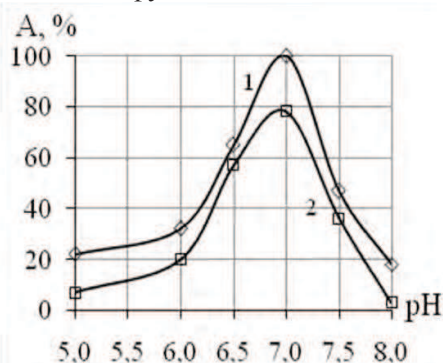


Рисунок 2. Зависимость активности (% от максимальной) от pH при температуре 40 °C: 1-свободной, 2- иммобилизованной  $\alpha$ -L-фукозидазы.

Как видно на рисунке 2, иммобилизованная  $\alpha$ -L-фукозидаза так же, как и свободная, проявляла максимальную активность при pH 7,0. Таким образом, иммобилизация не влияла на оптимальные значения pH действия фермента.

Исследования влияния температуры на активность свободной и иммобилизованной  $\alpha$ -L-фукозидазы показали, что оптимальная температура гидролиза субстрата смещается в сторону более высоких значений с максимальной активностью при 50 °C (рисунок 3), что на 10 °C выше, чем для свободного фермента. Влияние температуры на активность ферментов объясняется тем, что она, с одной стороны, воздействует на белковую часть фермента, приводя его к денатурации и снижению каталитической функции, а с другой стороны – интенсифицирует скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и все последующие этапы преобразования субстрата. В результате связывания молекул фермента с носителем возрастает их термостабильность. Это положение подтверждено в ряде работ [14, 15, 16].

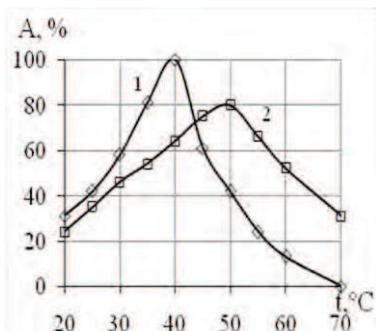


Рисунок 3. Влияние температуры на активность  $\alpha$ -L-фукозидазы (% от максимальной) при pH 7,0: 1 – свободный фермент, 2 – иммобилизованный

Проводились исследования процесса иммобилизации  $\beta$ -фруктофуранозидазы и влияния его на физико-химические свойства фермента.

Для иммобилизации  $\beta$ -фруктофуранозидазы в качестве носителя использовали волокнистый ионообменник ФИБАН А-6. Этот носитель имеет следующие характеристики: 1) высокая скорость ионообменных и сорбционных процессов; 2) устойчивость к действию агрессивных сред и температуры; 3) хорошая смачиваемость водой; 4) возможность применения в виде тонких фильтрующих слоев и многократных циклов кислотного-щелочной обработки и высушивания-увлажнения; 5) обладает большой обменной емкостью и высокими механическими свойствами. Все вышеперечисленное позволяет рекомендовать использовать данное волокно в качестве носителя для иммобилизации ферментов.

Кривая сорбции  $\beta$ -фруктофуранозидазы на волокнистом носителе показана на рисунке 4. Кривая сорбции  $\beta$ -фруктофуранозидазы, как и в случае с  $\alpha$ -L-фукозидазой имеет перегиб, что свидетельствует о сложности протекания процесса. Очевидно, что помимо взаимодействия сорбент-сорбат, результатом которого является формирование мономолекулярного слоя белка, дальнейшее нарастание количества сорбированного фермента происходит в ходе взаимодействия

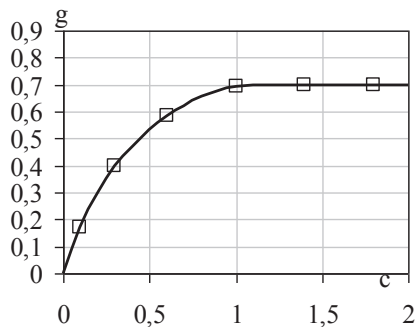


Рисунок 4. Кривая сорбции  $\beta$ -фруктофуранозидазы на ФИБАН А-6 в зависимости от концентрации раствора ферментного препарата: g – масса белка, связанного с носителем, мг/г; с – концентрация водного раствора фермента, мг/см<sup>3</sup>

Было установлено, что для иммобилизации  $\beta$ -фруктофуранозидазы достаточно 1,0 г ФИБАН А-6, который содержал в среднем 0,7 мг фермента. Выход иммобилизованного фермента находился в диапазоне 68-71 %.

Емкость используемых для иммобилизации волокнистых носителей превышает емкость гранульных в среднем в 3 раза. Только при низких концентрациях  $\beta$ -фруктофуранозидазы (до 1,0 мг/см<sup>3</sup>) количество сорбированного фермента сопоставимо с этой же величиной. Это связано, вероятно, с более легкой доступностью молекул фермента к сорбционным центрам носителя благодаря наличию транспортных пор. Процесс включения молекул фермента в поры носителя можно рассматривать как “улавливание” биомолекул. Ферменты, внедренные таким способом в матрицу носителя, защищены от действия микробов и макромолекулярных веществ, продуцируемых микробами. Биокатализаторы в таком виде также более удобны для использования, что в ряде случаев делает их применение более предпочтительным, чем биокатализаторов в другой форме.

Было изучено влияние pH реакционной смеси на активность препаратов свободной и иммобилизованной  $\beta$ -фруктофуранозидазы.

Как видно на рисунке 5, иммобилизованная  $\beta$ -фруктофуранозидаза проявляла максимальную активность при pH 4,0-4,1.

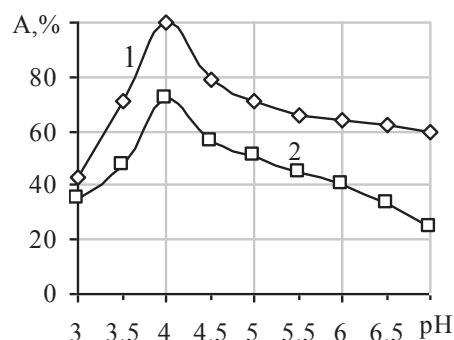


Рисунок 5. Зависимость активности (% от максимальной) от pH при температуре 40 °C: 1-свободной, 2- иммобилизованной  $\beta$ -фруктофуранозидазы

Небольшой сдвиг pH (на 0,1 единицу) может быть обусловлен различием между локальными значениями pH микроокружения активного центра и pH, измеряемым в объеме раствора. На локальное значение pH микроокружения оказывают влияние следующие факторы: заряд матрицы носителя, изменение заряда субстрата при превращении его в продукты, диффузия субстрата и продукта, изменение суммарного заряда белка при иммобилизации [18].

В ходе работы была проведена серия экспериментов по определению влияния температуры на активность свободной и иммобилизованной  $\beta$ -фруктофуранозидазы.

Для иммобилизованной  $\beta$ -фруктофуранозидазы оптимальная температура гидролиза сахарозы составила 70 °С (рисунок 4). Данный показатель на 20 °С выше, чем для свободного фермента [17].

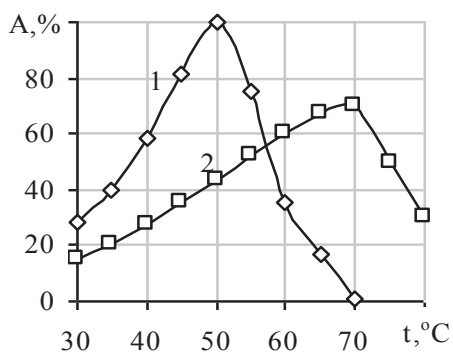


Рисунок 4. Влияние температуры на активность  $\beta$ -фруктофуранозидазы (% от максимальной) при pH 4,0: 1 – свободный фермент, 2 – иммобилизованный

Можно предположить, что повышение оптимальных температур действия иммобилизованных ферментных препаратов обусловлено тем, что при присоединении к носителю происходит повышение жесткости третичной структуры, ответственной за каталитическое превращение субстрата. Чем больше образовано связей между носителем и ферментом, тем стабильность белковой молекулы выше по отношению к температуре [18].

Опыты по определению активности свободных и иммобилизованных ферментов показали, что в процессе иммобилизации происходит снижение каталитических активностей  $\alpha$ -L-фукозидазы и  $\beta$ -фруктофуранозидазы на 20 % и 30 % соответственно. Причиной снижения активности ферментов при иммобилизации могут быть диффузионные затруднения, препятствующие доступу субстрата к активному центру фермента, а также возможное ограничение конформационной подвижности белка вследствие его многоточечного связывания с поверхностью носителя.

Изучалось влияние условий хранения и кратность использования полученных биокатализаторов. Было установлено, что при многократном использовании (4-5 раз) иммобилизованных гликозидаз снижение ферментативной активности было незначительно (рисунок 6).

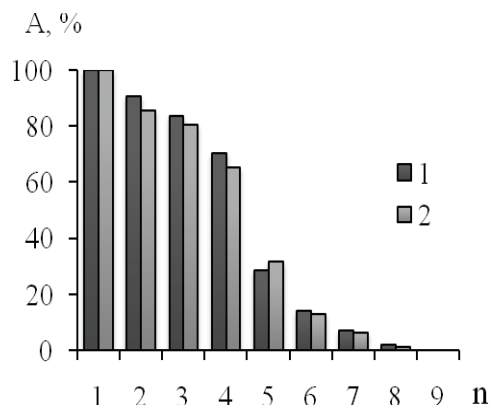


Рисунок 6. Кратность использования иммобилизованной  $\beta$ -фруктофуранозидазы (1) и  $\alpha$ -L-фукозидазы (2) в реакции гидролиза субстрата: A – активность иммобилизованного фермента (% от максимальной); n – количество реакционных циклов

Остаточную активность измеряли периодически сначала 2-4 раза в неделю, затем каждые 1-2 мес. При условиях хранения полученных биокатализаторов в холодильной камере наблюдалось незначительное снижение каталитической активности иммобилизованных ферментов по истечении 4-6 месяцев (до 70 % активности), что свидетельствует об эффективности предложенных способов иммобилизации.

В результате было установлено, что данные способы иммобилизации являются простыми и эффективными для получения гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных гликозидаз. В таких биокатализаторах отсутствуют токсические сшивающие реагенты, которые могут оказывать дезактивирующее действие на ферментативную активность, поэтому ферменты сохраняли высокую активность. Адсорбция ферментов на поверхности носителей прочная, так как поры носителей имеют подходящий размер, а поверхностное покрытие – соответствующую микроструктуру и химическую природу, вследствие чего полученные биокатализаторы проявляли достаточно высокую термостабильность.

Кроме того, исследования влияния иммобилизации на кратность использования ферментов показали перспективность использования полученных биокатализаторов в непрерывном режиме в нескольких реакционных циклах гидролиза субстрата.

Таким образом, были получены гетерогенные биокатализаторы  $\beta$ -фруктофуранозидазы и  $\alpha$ -L-фукозидазы, отличающиеся высокой активностью, термостабильностью и кратностью использования в реакциях гидролиза субстратов.

Работа выполнена в рамках НИОКР по программе У.М.Н.И.К. (ГК №11720p/17208 от 05.04.2013).

ЛИТЕРАТУРА

1 Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2001. 184 с.

2 Luther K.B., Haltiwanger R.S. Role of unusual O-glycans in intercellular signaling // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2009. V. 41. P. 1011–1024.

3 Санина Т.В. и др. Исследование бифидогенной активности фукозы и ее полимеров // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 1. С. 141-143.

4 Черенков Д.А. и др. Фукоза: биологическая роль, пути получения и применение // Биотехнология. 2010. № 6. С. 63-71.

5 Intra J., Cenni F., Perotti M.-E. An a-L-Fucosidase Potentially Involved in Fertilization Is Present on Drosophila Spermatozoa Surface // Molecular reproduction and development. 2006. V. 73. P. 1149–1158.

6 Черенков Д.А., Анохина Е.П., Кирьянова С.В., Корнеева О.С. Антиоксидантная активность продуктов гидролиза природных полимеров (маннана и фукоидана) // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2012. №1. С. 151-153.

7 Кретович В. Л. Основы биохимии растений. М.: Высшая школа, 1986. 547 с.

8 ГОСТ 10896-78. Иониты. Подготовка к испытанию. Введен 01.01.1980. М.: ИПК Издательство стандартов, 1991. 7 с.

9 Dische Z., Shettles L. B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination // J. Biol. Chem. 1948. V. 175. № 2. P. 595-603.

10 Ермаков А.И. Методы биохимических исследований растений. Л.: Агропромиздат Ленинградское отделение, 1976. 430 с.

11 Польшалина Г.В., Чердниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М.: ДеЛи принт, 2003. 375 с.

12 Мещерякова О.Л. и др. Иммобилизация β-фруктофуранозидазы на волокнистом носителе // Биотехнология. 2012. № 4. С. 58-62.

13 Леваньков С.В., Якуш Е.В. Адсорбционные свойства хитозана по отношению к белковым веществам // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра. 2001. Т.1. С. 121-128.

14 Ушаков В. М. и др. Способ извлечения инвертазы из дрожжевых клеток в процессе их культивирования // Биотехнология. 1992. № 1. С.43-45

15 Коваленко Г. А. и др. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. III. Биокаталитические свойства адсорбированной инвертазы // Биотехнология 2003. № 4. С. 52-62.

16 Коваленко Г.А. и др. Биокаталитические свойства адсорбированных дрожжевых мембран // Биотехнология. 2004. № 6. С. 34-45.

17 Мещерякова О.Л. и др. Сравнительная характеристика свойств свободной и иммобилизованной β-фруктофуранозидазы // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 2. С. 356.

18 Тривен М. Иммобилизованные ферменты. М.: Мир, 1987. 513 с.

REFERENCES

1 Korneeva O. S. Carbohydrate: preparative synthesis, structure and mechanism of action on oligo - and polysaccharides. Voronezh: Voronezh state University, 2001. 184 p. (In Russ.).

2 Luther K.B., Haltiwanger R.S. Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009, vol. 41, pp. 1011–1024.

3 Sanina T.V. et al. The study bifidogenic activity fucose and its polymers. Herald of the Voronezh state University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2011, no. 1, pp. 141-143. (In Russ.).

4 Cherenkov D. A. et al. Fucose: biological role, ways of production and utilization. Biotechnology, 2010, no. 6, pp. 63-71. (In Russ.).

5 Intra J., Cenni F., Perotti M.-E. An a-L-Fucosidase Potentially Involved in Fertilization Is Present on Drosophila Spermatozoa Surface. Molecular reproduction and development, 2006, vol. 73, pp. 1149–1158.

6 Cherenkov D. A., Anokhina E. P., Kiryanova S. V., Korneeva O. S. Antioxidant activity of the hydrolysis products of natural polymers (mannan and fucoidan). Herald of the Voronezh state University of engineering technologies, 2012, no. 1, pp. 151-153. (In Russ.).

7 Kretovich V. L. Fundamentals of biochemistry. M.: Higher school, 1986. 547 p. (In Russ.).

8 GOST 10896-78. Ion exchangers. Preparation for the test. Introduced 01.01.1980. M: IPC standards Publishing house, 1991. 7 p. (In Russ.).

9 Dische Z., Shettles L. B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. J. Biol. Chem, 1948, vol. 175, no 2, pp. 595-603.

10 Ermakov A. I. Methods of biochemical studies of plants. L.: Agropromizdat Leningrad branch, 1976. 430 p. (In Russ.).

11 Polygaline G.V., Cherednichenko V. S., Rimareva L. V. Determination of enzyme activity. The Handbook. M: Delhi print, 2003. 375 p. (In Russ.).

12 Meshcheriakova O. L. et al. Immobilization of  $\beta$ -fructofuranosidase on the fibrous carrier. Biotechnology, 2012, no. 4, pp. 58-62. (In Russ.).

13 Levenkov S. V., Iakush E. V. Adsorption properties of chitosan with respect to protein substances. Proceedings of the Pacific research fisheries center, 2001, no 1, pp. 121-128. (In Russ.).

14 Ushakov V. M. et al. Method of extraction of invertase from yeast cells in the process of their cultivation. Biotechnology, 1992, no. 1, pp. 43-45. (In Russ.).

15 Kovalenko G. A. et al. Carbon-containing microstructurally ceramic media for adsorptive immobilization of enzymes and microorganisms. III. Biocatalytic properties of adsorbed invertase. Biotechnology, 2003, no. 4, pp. 52-62. (In Russ.).

16 Kovalenko G. A. et al. Biocatalytic properties of adsorbed yeast membranes. Biotechnology, 2004, no. 6, pp. 34-45. (In Russ.).

17 Meshcheriakova O. L. et al. Comparative characteristics of the properties of free and immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase. Modern problems of science and education, 2012, no. 2, pp. 356. (In Russ.).

18 Trevin M. Immobilized enzymes. M.: Mir, 1987. 513 p. (In Russ.).