

## МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ИНУЛИНАЗЫ КАК МОДЕЛЬ ЕЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ КРАУДИНГА

М. Г. Холявка<sup>1,2\*</sup>, М. С. Кондратьев<sup>1,3</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

<sup>3</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр

«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Поступила в редакцию 01.08.2022 г.

**Аннотация.** Инулиназа (КФ 3.2.1.7) расщепляет инулин и другие фруктозосодержащие полимеры до фруктозы. Она широко распространена среди высших растений и микроорганизмов и может использоваться для получения фруктозы из растительного сырья, в особенности из топинамбура, цикория, якона.

Известно, что все биохимические процессы в клетке, в частности, белок-белковые взаимодействия, конформационные переходы биомакромолекул, фолдинг и агрегация белка, а также возникновение мультиферментных комплексов и надмолекулярных структур, протекают в высококонцентрированной среде – в условиях молекулярного краудинга.

В связи с этим целью нашей работы было создать мультиферментные комплексы инулиназы как модель ее функционирования в условиях краудинга путем поперечной сшивки молекул энзима.

Для расчетов *in silico* методом молекулярного докинга мы использовали две структуры инулиназы – из *Aspergillus ficuum* и из *Kluyveromyces marxianus*. Объектом исследования *in vitro* методом ИК-спектроскопии была инулиназа, выделенная из культуры дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-303.

В первой серии экспериментов мы тестировали глутаровый альдегид в качестве сшивающего агента для сополимеризации молекул инулиназы. Вероятно, отсутствие большого количества водородных связей, или ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которые характерны для макромолекулярных лигандов, и явилось причиной наблюдаемых невысоких величин энергий связывания. Представлена суперпозиция сайтов связывания молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и глутарового альдегида. Выявлена тенденция к отсутствию единого предпочтительного местоположения низкомолекулярного лиганда на поверхности белковой глобулы.

При сополимеризации молекул инулиназы глутаровым альдегидом в различных концентрациях нам не удалось сохранить более 20 % каталитической активности нативного ферментного препарата, поэтому мы предположили, что для инулиназы функционирование в условиях краудинга не является оптимальным, поэтому его стоит избегать в промышленных процессах.

Для объяснения факта резкого снижения активности инулиназы при ее сополимеризации с применением глутарового альдегида в качестве сшивающего агента мы использовали данные ИК-спектроскопии. Исходя из полученных данных, можно предположить, что существенное снижение каталитической активности инулиназы после сополимеризации ее молекул глутаровым альдегидом обусловлено значительными структурными перестройками и формированием более плотно упакованного гидрофобного ядра по сравнению с нативной формой фермента.

**Ключевые слова:** инулиназа, глутаровый альдегид, ИК-спектроскопия, молекулярный докинг

Инулиназа (инулаза, 2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) играет важную роль в превращении резервных полифруктанов

типа инулина или левана в моносахарид фруктозу [1-4], которая является источником углерода и энергии для растений и микроорганизмов [5, 6]. Известно более 36 тыс. видов растений, содержащих инулин, поэтому инулиназа может использо-

ваться для получения фруктозы из растительного сырья, в особенности из экстрактов топинамбура, цикория, якона [7-9]. В случае применения инулиназы для расщепления инулинсодержащего сырья можно получить 95 %-ный фруктозный сироп, другое применение инулиназы – прямая ферментация инулина в этанол. В литературе обсуждаются проблемы получения этанола путем сбраживания сока топинамбура с помощью *Zygomonas mobilis* [10, 11] или сока георгина с помощью *Clostridium pasterianum* [12].

Инулиназа – перспективный биокатализатор в производстве диетических продуктов питания, поэтому особого внимания заслуживает подбор эффективных продуцентов этого фермента. Она достаточно широко распространена в микромицетах, бактериях, дрожжах (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* и др.) и высших растениях (топинамбур, подсолнечник, одуванчик, цикорий, георгин и др.) [13-16].

Известно, что все биохимические процессы в клетке протекают в высоко концентрированной среде. К таким процессам относятся белок-белковые взаимодействия, конформационные переходы биомолекул, фолдинг и агрегация белка, а также возникновение мультиферментных комплексов и надмолекулярных структур [17]. В совокупности концентрация макромолекул в цитоплазме достигает величины 50–400 мг/мл, при этом молекулы занимают значительную часть объема среды – до 40 % [18]. Подобные условия в клетке обозначаются как «молекулярный краудинг» (crowding – столпотворение). Согласно современной точке зрения, цитоплазма скорее заполнена крупными ансамблями макромолекул, образующими функциональные комплексы, чем свободно диффундирующими и сталкивающимися макромолекулами [19].

Для понимания сущности биохимических процессов, происходящих в живой клетке, необходимо имитировать условия краудинга в экспериментах *in silico* и *in vitro*. В связи с этим целью нашей работы было создать мультиферментные комплексы инулиназы как модель ее функционирования в условиях краудинга путем поперечной сшивки молекул энзима.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

*Объект исследования.* Для расчетов *in silico* мы использовали два типа структур ину-

линазы – из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3SC7>) и из *Kluyveromyces marxianus* (5KLU), которая была получена путем реконструкции методами высокопроизводительного компьютерного моделирования на основе молекулы инвертазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 4EQV) [20].

Объектом исследования *in vitro* была инулиназа, выделенная из культуры дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-303 и очищенная до гомогенного состояния, которое было доказано методом электрофореза [21, 22].

*Подготовка и анализ образцов методом инфракрасной спектроскопии.* Регистрацию ИК-спектров неориентированных порошкообразных образцов осуществляли в ЦКПНО ВГУ с помощью спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия).

*Молекулярный докинг.* Подготовка структуры фермента для докинга выполнялась по стандартной для Autodock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>) схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов.

Модель структуры глутарового альдегида была нарисована в молекулярном конструкторе HyperChem (<https://hyperchem.software.informer.com/>), последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в РМЗ (Parametric Method 3). Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей.

Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белка и лиганда с помощью MGLTools (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>), а также выбрана ячейка для расчета докинга, размеры которой составили 68×58×60Å. Центр молекулы белка находился в точке с координатами ( $x = 37.044$ ;  $y = -36.997$ ;  $z = -5.365$ ). Центр молекулы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула инулиназы полностью была внутри расчетной области пространства.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения поставленной цели мы изучили условия поперечной сшивки молекул инулиназы. Получаемые нами мультиферментные комплексы можно представить схематично следующим образом (рис. 1).

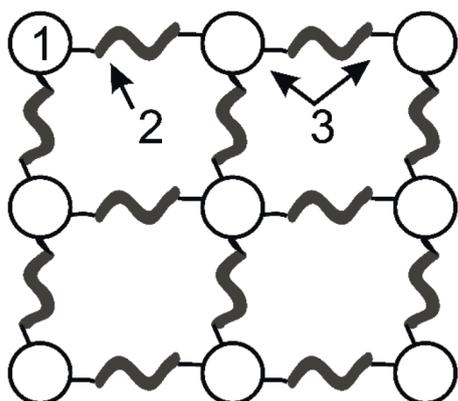


Рис. 1. Поперечная сшивка молекул инулиназы: 1 – молекулы фермента, 2 – сшивающий агент, 3 – ковалентная связь

В первой серии экспериментов мы тестировали глутаровый альдегид в качестве сшивающего агента для сополимеризации молекул инулиназы (рис. 2). С помощью каскадного молекулярного докинга нами были получены значения аффинностей для пяти последовательных точек связывания инулиназы и глутарового альдегида (табл. 1).

Вероятно, отсутствие большого количества водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий (рис. 3), которые столь характерны для макромолекулярных лигандов [23, 24], в случае глутарового альдегида и явилось причиной наблюдаемых невысоких величин энергий связывания. Суперпозиция сайтов взаимодействия молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и глутарового альдегида представлена на рис. 4. Стоит отметить тенденцию к отсутствию единого предпочтительного местоположения низкомолекулярного лиганда на поверхности белковой глобулы.

При получении мультиферментных комплексов путем сополимеризации молекул инулиназы глутаровым альдегидом в различных концентрациях нам не удалось сохранить более 20 % каталитической активности нативного ферментного препарата, поэтому мы предположили, что для инулиназы функционирование в условиях краудинга не является оптимальным, поэтому его стоит избегать в промышленных процессах.

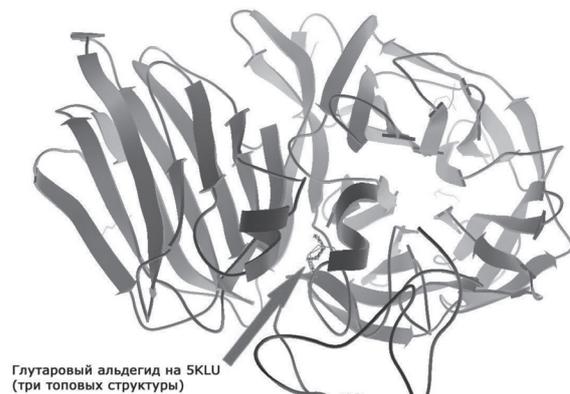


Рис. 2. Локализация наиболее предпочтительного места связывания глутарового альдегида на молекуле инулиназы (показана стрелкой) из *Aspergillus ficuum* (3SC7) и *Kluyveromyces marxianus* (5KLU)

Для объяснения резкого снижения активности инулиназы при ее сополимеризации с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента мы использовали метод ИК-спектроскопии (рис. 5, табл. 2).

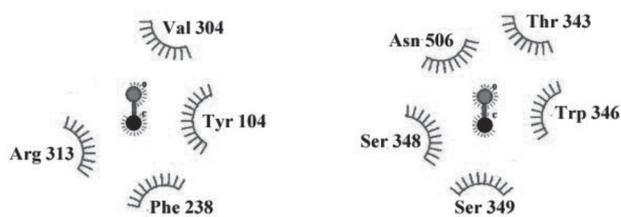


Рис. 3. Связи и взаимодействия между глутаровым альдегидом и молекулой инулиназы из *Aspergillus ficuum* (А) и *Kluyveromyces marxianus* (Б)

Таблица 1

Результаты расчетов каскадного молекулярного докинга для инулиназы и глутарового альдегида

Номер лиганда	Аффинность, ккал/моль	
	Инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i>	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>
1	-3,5	-4,4
2	-3,4	-4,1
3	-3,2	-3,1
4	-3,1	-3,4
5	-3,4	-3,2

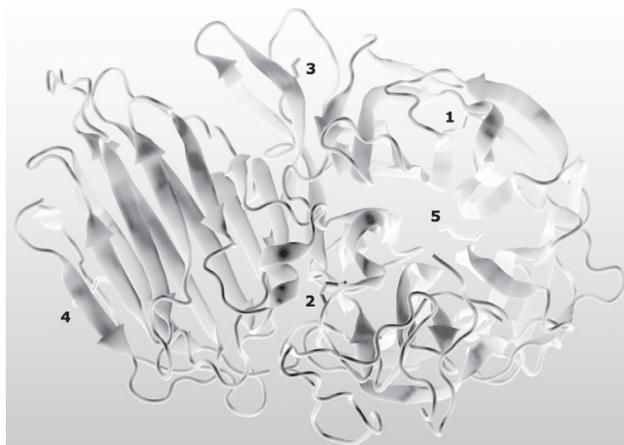


Рис. 4. Суперпозиция сайтов связывания молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с глутаровым альдегидом

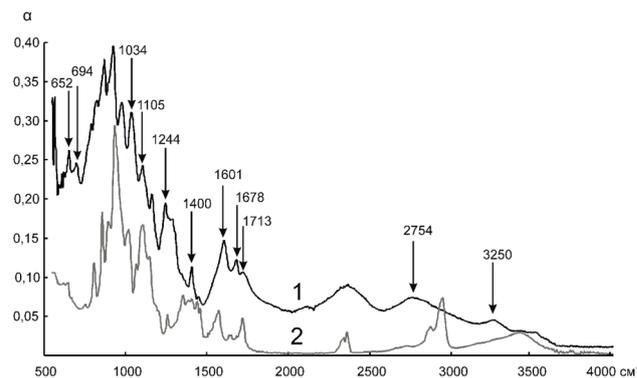


Рис. 5. ИК-спектр поглощения инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* до (1) и после (2) сополимеризации ее молекул с помощью глутарового альдегида:  $\alpha$  – коэффициент поглощения изучаемого препарата

Таблица 2

Изменения в ИК-спектрах инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* после сополимеризации с глутаровым альдегидом

Полоса поглощения	Изменения	Вероятная причина изменений после сополимеризации
3250 $\text{cm}^{-1}$	Смещение до 3400 $\text{cm}^{-1}$ и снижение интенсивности	Может свидетельствовать о перестройках в белковой глобуле, компактизации молекулы фермента, а также выходе на ее поверхность дополнительного числа боковых аминогрупп остатков аргинина, лизина и гистидина
2754 $\text{cm}^{-1}$	Расщепление на две полосы: 2945 и 2866 $\text{cm}^{-1}$	Вероятно, указывает на наличие глутарового альдегида в полученном препарате, т.к. полосы в области 2880 $\text{cm}^{-1}$ являются характерными для альдегидных групп
1713 $\text{cm}^{-1}$	Смещение до 1717 $\text{cm}^{-1}$ и существенное увеличение интенсивности	Указывает на наличие глутарового альдегида в полученном препарате, т.к. полосы в области 1720 $\text{cm}^{-1}$ являются характерными для алифатических альдегидов
1678 $\text{cm}^{-1}$	Смещение до 1680 $\text{cm}^{-1}$ и снижение интенсивности	Может быть связано с более плотной упаковкой гидрофобного ядра по сравнению с нативной формой инулиназы, что, вероятно, является одной из основных причин снижения ее ферментативной активности после иммобилизации
1601 $\text{cm}^{-1}$	Расщепление на две полосы: 1636 и 1572 $\text{cm}^{-1}$ , снижение их интенсивности	
1400 $\text{cm}^{-1}$	Расщепление на три полосы: 1393, 1377, 1350 $\text{cm}^{-1}$	Изменения могут свидетельствовать о взаимодействии молекулы инулиназы с глутаровым альдегидом через аминогруппы, т.к. полоса обусловлена плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH-групп
1244 $\text{cm}^{-1}$	Смещение до 1255 $\text{cm}^{-1}$ и снижение интенсивности	Вероятно, свидетельствуют о значительных структурных перестройках в молекуле фермента
1105 $\text{cm}^{-1}$	Смещение до 1099 $\text{cm}^{-1}$ и снижение интенсивности	
1034 $\text{cm}^{-1}$	Расщепление на две полосы: 1065 и 1015 $\text{cm}^{-1}$ , снижение их интенсивности	
694 и 652 $\text{cm}^{-1}$	Смещение до 642 и 607 $\text{cm}^{-1}$	
		Может свидетельствовать о структурных перестройках белковой глобулы, т.к. полосы обусловлены колебаниями сульфогруппы

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что существенное снижение каталитической активности инулиназы после сополимеризации ее молекул глутаровым альдегидом обусловлено значительными структурными перестройками и формированием более плотно упакованного гидрофобного ядра по сравнению с нативной формой фермента.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в

сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Данные ИК-спектроскопии получены с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жеребцов Н.А., Абрамова И.Н., Шеламова С.А., Попова Т.Н. // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 6. С. 619-625.

Холявка М. Г., Кондратьев М. С., Артюхов В. Г.

2. Kholiyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A. // *Biocatalysis and Biotransformation*. 2016. Vol. 34. № 1. P. 1-17.
3. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // *Биотехнология*. 2012. № 1. С. 43-63.
4. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2011. № 1. С. 3-7.
5. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. 184 с.
6. Абелян В.А., Манукян Л.С. // *Биохимия*. 1996. Т. 61, № 6. С. 1028-1036.
7. Парк С., Хен И., Ким Х., Сонг С., Ум Т.-Б., Че К.-С. // *Биохимия*. 2003. Т. 68, № 6. С. 805-809.
8. Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Trushin M.V., Artyukhov V.G. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 115. P. 829-834.
9. Холявка М.Г., Ковалёва Т.А., Хрупина Е.А., Волкова С.А., Артюхов В.Г. // *Биотехнология*. 2012. № 6. С. 31-42.
10. Allais J.J., Hoyos-Lopez G., Kammoun S., Baratti J.C. // *Applied and Environmental Microbiology*. 1987. Vol. 53. № 5. P. 942-945.
11. Kim C., Rhee S. // *Appl. Biochem Biotechnol*. 1990. Vol. 23. № 2. P. 171-180.
12. Oiwa H., Naganuma M., Ohnima S. // *Agr. and Biol. Chem*. 1987. Vol. 51. № 10. P. 2819-2820.
13. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2007. Т. 7. № 5. С. 804-810.
14. Carniti P., Beltrame P.L., Guardione D., Focher B., Marzetti A. // *Biotechnol. Bioeng*. 1991. Vol. 37. № 6. P. 575-579.
15. Onodera S., Shiomi N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1992. Vol. 56. P. 1443-1447.
16. Pandey A., Joseph S., Ashakumary L., Selvakumar P., Soccol C.R. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999. Vol. 82. P. 103-114.
17. Чеботарева Н.А. // *Успехи биологической химии*. 2007. Т. 47. С. 233-258.
18. Fulton A.B. // *Cell*. 1982. Vol. 30. P. 345-347.
19. Ellis R.J., Minton A.P. // *Nature*. 2003. Vol. 425. P. 27-28.
20. Абдуллатыпов А.В., Кондратьев М.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // *Биофизика*. 2016. Т. 61. № 4. С. 669-676.
21. Артюхов В.Г., Холявка М.Г., Ковалёва Т.А. // *Биофизика*. 2013. Т. 58. № 4. С. 635-644.
22. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Битюцкая Л.А., Гречкина М.В., Образцова Т.Б. // *Биофизика*. 2009. Т. 54. № 6. С. 1005-1011.
23. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M. // *Computers in Biology and Medicine*. 2016. Vol. 71. P. 198-204.
24. Holyavka M.G., Kondratev M.S., Lukin A.N., Agapov B.L., Artyukhov V.G. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 138. P. 681-692.

*Воронежский государственный университет*  
Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь  
E-mail: holyavka@rambler.ru

*Кондратьев М. С., к. ф.-м. наук, старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, заведующий лабораторией, Институт биофизики клетки Российской академии наук*  
E-mail: ma-ko@bk.ru

*Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии*  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

*Voronezh State University*  
Holyavka M. G., PhD., DSci., prof., department of biophysics and biotechnology, Professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol  
E-mail: holyavka@rambler.ru

*Kondratyev M. S., PhD., senior researcher, department of biophysics and biotechnology, head of the laboratory, Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences*  
E-mail: ma-ko@bk.ru

*Artyukhov V. G., PhD., DSci., prof., Head of the Biophysics and Biotechnology Department*  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

# MULTI-ENZYME COMPLEXES OF INULINASE AS A MODEL OF ITS FUNCTIONING UNDER CROWDING CONDITIONS

M. G. Holyavka<sup>1,2\*</sup>, M. S. Kondratiev<sup>1,3</sup>, V. G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State University

<sup>2</sup> Sevastopol State University

<sup>3</sup> Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Center" Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences "

**Abstract.** Inulinase (EC 3.2.1.7) breaks down inulin and other fructose-containing polymers into fructose. It is widely distributed among higher plants and microorganisms and can be used to obtain fructose from plant materials, especially from Jerusalem artichoke, chicory, and yacon.

It is known that all biochemical processes in the cell, in particular, protein-protein interactions, conformational transitions of biomacromolecules, protein folding and aggregation, as well as the formation of multienzyme complexes and supramolecular structures, proceed in a highly concentrated environment – under conditions of molecular crowding.

In this regard, the aim of our work was to create multienzyme complexes of inulinase as a model of its functioning under crowding conditions by cross-linking enzyme molecules.

For *in silico* calculations by the molecular docking method, we used two inulinase structures, from *Aspergillus ficuum* and from *Kluyveromyces marxianus*. Inulinase isolated from the yeast culture *Kluyveromyces marxianus* Y-303 was the object of the *in vitro* study by IR spectroscopy.

In the first series of experiments, we tested glutaraldehyde as a crosslinking agent for the copolymerization of inulinase molecules. Probably, the absence of a large number of hydrogen bonds, or van der Waals interactions, which are characteristic of macromolecular ligands, was the reason for the observed low binding energies. The superposition of binding sites of the inulinase molecule from *Kluyveromyces marxianus* and glutaraldehyde is presented. A tendency to the absence of a single preferred location of the low molecular weight ligand on the surface of the protein globule was revealed.

During the copolymerization of inulinase molecules with different concentrations of glutaraldehyde, we failed to retain more than 20 % of the catalytic activity of the native enzyme, so we assumed that the functioning of inulinase under crowding conditions is not optimal, so it should be avoided in industrial processes.

To explain the sharp decrease in the activity of inulinase during its copolymerization using glutaraldehyde as a crosslinking agent, we used IR spectroscopy data. Based on the data obtained, it can be assumed that a significant decrease in the catalytic activity of inulinase after the copolymerization of its molecules with glutaraldehyde is due to significant structural rearrangements and the formation of a more densely packed hydrophobic core compared to the native form of the enzyme.

**Keywords:** inulinase, glutaraldehyde, IR spectroscopy, molecular docking

## REFERENCES

- Zherebtsov N.A., Abramova I.N., Shelamova S.A., Popova T.N., Applied Biochemistry and Microbiology, 2003, Vol. 39, No 6, pp. 544-548.
- Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Biocatalysis and Biotransformation, 2016, Vol. 34, № 1, pp. 1-17.
- Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Biotechnology in Russia, 2012, № 1, pp. 43-63.
- Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii, 2011, № 1, pp. 3-7.
- Korneeva O.S. Karbogidrazy: preparativnoe poluchenie, struktura i mekhanizm dejstviya na oligo- i polisaharidy. Voronezh: Izd-vo Voronezh. un-ta, 2001, 184 p.
- Abelyan V.A., Manukyan L.S., Biochemistry (Mosc), 1996, Vol. 61, № 6, pp. 1028-1036.
- Park S., Han Y., Kim H., Song S., Uhm T.B., Chae K.S., Biochemistry (Mosc), 2003, Vol. 68, № 6, pp. 658-661.
- Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Trushin M.V., Artyukhov V.G., International Journal of Biological Macromolecules, 2018, Vol. 115, pp. 829-834.
- Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A., Volkova S.A., Artyukhov V.G., Biotechnology in Russia, 2012, № 6, pp. 31-41.

10. Allais J.J., Hoyos-Lopez G., Kammoun S., Baratti J.C., *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, Vol. 53, № 5, pp. 942-945.
11. Kim C., Rhee S., *Appl. Biochem Biotechnol.*, 1990, Vol. 23, № 2, pp. 171-180.
12. Oiwa H., Naganuma M., Ohnima S., *Agr. and Biol. Chem.*, 1987, Vol. 51, № 10, pp. 2819-2820.
13. Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Taha A.S., *Sorbcionnye i hromatograficheskie processy*, 2007, Vol. 7, № 5, pp. 804-810.
14. Carniti P., Beltrame P.L., Guardione D., Focher B., Marzetti A., *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, Vol. 37, № 6, pp. 575-579.
15. Onodera S., Shiomi N., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, Vol. 56, pp. 1443-1447.
16. Pandey A., Joseph S., Ashakumary L., Selvakumar P., Socol C.R., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, Vol. 82, pp. 103-114.
17. Chebotareva N.A., *Uspekhi biologicheskoy himii*, 2007, Vol. 47, pp. 233-258.
18. Fulton A.B., *Cell*, 1982, Vol. 30, pp. 345-347.
19. Ellis R.J., Minton A.P., *Nature*, 2003, Vol. 425, pp. 27-28.
20. Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., *Biophysics*, 2016, Vol. 61, № 4, pp. 565-571.
21. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A., *Biophysics*, 2013, Vol. 58, № 4, pp. 493-501.
22. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Obraztsova T.B., *Biophysics*, 2009, Vol. 54, № 6, pp. 675-680.
23. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., *Computers in Biology and Medicine*, 2016, Vol. 71, pp. 198-204.
24. Holyavka M.G., Kondratev M.S., Lukin A.N., Agapov B.L., Artyukhov V.G., *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, Vol. 138, pp. 681-692.