

ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ИНУЛИНАЗ ИЗ *HELIANTHUS TUBEROSUS*, *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* И *ASPERGILLUS NIGER*

М. Г. Холявка^{1,2*}, В. Г. Артюхов¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

Аннотация. Экзо- (КФ 3.2.1.80) и эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7) участвуют в углеводном метаболизме высших растений и некоторых микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. Исследования структурных особенностей инулиназ необходимо развивать и расширять, так как вопросы о структурно-функциональных отличиях инулиназ и родственных им ферментов, выделенных из продуцентов различных таксономических групп, до сих пор окончательно не решены. До конца не выявлены родственные и эволюционные связи среди инулиназ, выделенных из различных продуцентов. В связи с этим целью работы было изучить особенности вторичных структур инулиназ растительного, дрожжевого и грибного происхождения на примере инулиназ из *Helianthus tuberosus*, *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger*.

Объектами исследования были инулиназы, выделенные из культуры дрожжей *Kluyveromyces marxianus* и клубней топинамбура *Helianthus tuberosus* на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, а также коммерческий препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия).

Регистрацию ИК-спектров неориентированных порошкообразных образцов осуществляли в ЦКПНО ВГУ с помощью спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия). Соотношение типов вторичной структуры для инулиназ определяли, основываясь на законе Бугера-Ламберта-Бера.

Доказано, что инулиназы растительного, дрожжевого и грибного происхождения имеют свои структурные особенности, что, вероятно, обуславливает отличия их физико-химических и каталитических свойств. У трех инулиназ, выделенных из *Helianthus tuberosus*, достоверных отличий в соотношении типов вторичной структуры (α -спиралей, β -слоев, неупорядоченных областей) выявлено не было. Энзим из *Aspergillus niger* характеризуется наименьшим содержанием β -слоев (на 8-17 % ниже, чем у других инулиназ) и наибольшим количеством неупорядоченных участков (на 10-20 % выше, чем у прочих исследованных нами ферментов). Содержание β -слоев в молекуле инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на 8-9 % ниже, чем у растительных энзимов и на 8 % выше, чем у грибного фермента, при этом количество неупорядоченных участков на 8-10 % выше, чем у инулиназ из *Helianthus tuberosus*, и на 10 % ниже, чем у инулиназы, выделенной из *Aspergillus niger*.

Ключевые слова: инулиназа, вторичная структура белка, α -спирали, β -слой, неупорядоченные области, ИК-спектроскопия

Инулиназы участвуют в углеводном метаболизме высших растений и некоторых микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. Существуют экзо- (КФ 3.2.1.80) и эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7). Эндоинулиназы

(2,1- β -D-фруктанфруктаногидролазы) расщепляют молекулу инулина вдали от концевых остатков фруктозы, продуктами гидролиза являются олигосахариды, инулотриозы (нистозы (GF₃)), инулотетраозы (фруктозил-1-нистозы (GF₄)), инулопентаозы. Экзоинулиназы (β -D-фруктанфруктогидролазы) отщепляют концевые остатки фруктозы от молекул инулина, сахарозы и раффинозы [1-5]. При полном гидролизе инулина из растительных экстрактов (ци-

кория, артишока, георгина, топинамбура) как экзо-, так и эндоинулиназы приводят к образованию фруктозы в качестве конечного продукта, обеспечивая высокую, хотя и несколько различающуюся в зависимости от источника инулина, глубину конверсии субстрата [6, 7]. Экзоинулиназа осуществляет гидролиз инулина по процессинговому механизму, последовательно отщепляя концевые мономерные звенья фруктозы, а также гидролизуя терминальные связи между фруктозой и глюкозой. Эндоинулиназа на первых этапах гидролиза разрушает внутренние β -2,1-фруктозидные связи инулина, приводя к образованию олигосахаридов с последующим их превращением во фруктозу [8, 9, 10].

Проанализировав ряд работ, можно сделать вывод о том, что исследования структурных особенностей инулиназ необходимо развивать и расширять, так как вопросы о структурно-функциональных отличиях инулиназ и родственных им ферментов, выделенных из продуцентов различных таксономических групп, до сих пор окончательно не решены [11, 12]. Модели пространственной структуры предложены только для инвертазы из *Thermotoga maritima* [13, 14], инвертазы из *Schwanniomyces occidentalis* [15], инвертазы, связанной с клеточной стенкой из *Arabidopsis thaliana* [16], экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* [17, 18] и *Aspergillus ficuum* [19], β -фруктофуранозидазы из *Bifidobacterium longum* [20] и фруктан 1-экзогидролазы из *Cichorium intybus* [21]. До конца не выявлены родственные и эволюционные связи среди инулиназ, выделенных из различных продуцентов. В связи с этим целью работы было изучить особенности вторичных структур инулиназ растительного, дрожжевого и грибного происхождения на примере инулиназ из *Helianthus tuberosus*, *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования была инулиназа, выделенная из культуры дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, три инулиназы (I, II, III), выделенные из клубней топинамбура *Helianthus tuberosus* на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, а также коммерческий препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия). Все ферментные препараты были очищены до гомогенного состояния, которое было доказано методом электрофореза [22].

Регистрацию ИК-спектров неориентированных порошкообразных образцов осуществляли в ЦКПНО ВГУ с помощью спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия). Соотношение типов вторичной структуры для инулиназ определяли как описано в работе [23], основываясь на законе Бугера-Ламберта-Бера, из уравнения

$$D = -\lg T = -\lg I/I_0 = \lg I_0/I = \varepsilon cl$$

где I – интенсивность света, прошедшего через образец; I_0 – интенсивность света, падающего на образец; ε – коэффициент молярной экстинкции, л \times моль $^{-1}\times$ см $^{-1}$; c – концентрация исследуемого вещества, моль/л; l – длина оптического пути образца, см; D – оптическая плотность образца, T – коэффициент его светопропускания.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методом ИК-спектроскопии нами были изучены особенности вторичных структур инулиназ из *Helianthus tuberosus*, *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger* (табл. 1, 2).

Таблица 1

Характерные полосы поглощения на ИК-спектрах инулиназ

Полоса поглощения, см $^{-1}$	Характеристика полосы
3400-3200	полоса валентных колебаний NH $_2$ – группы
1690-1630	амид I
1560-1520	амид II
1300-1200	амид III
1050	амид IV
700-580	амид V

У трех инулиназ (I, II, III), выделенных из *Helianthus tuberosus*, достоверных отличий в соотношении типов вторичной структуры (α -спиралей, β -слоев, неупорядоченных областей) выявлено не было. Энзим из *Aspergillus niger* характеризуется наименьшим содержанием β -слоев (на 8-17 % ниже, чем у других инулиназ) и наибольшим количеством неупорядоченных участков (на 10-20 % выше, чем у прочих исследованных нами ферментов). Содержание β -слоев в молекуле инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на 8-9 % ниже, чем у растительных энзимов и на 8 % выше, чем у грибного фермента, при этом количество неупорядоченных участков на 8-10 % выше, чем у инулиназ из *Helianthus tuberosus*, и на 10 % ниже, чем у инулиназы, выделенной из *Aspergillus niger* (табл. 3).

Таблица 2

Различия в ИК-спектрах инулиназ из *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* и *Helianthus tuberosus*

Полоса поглощения, см ⁻¹	Причина возникновения на спектре	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	Инулиназа I из <i>Helianthus tuberosus</i>
3000-2100	Валентные колебания СН-группы в ненасыщенных и ароматических соединениях	Полоса более интенсивна, что свидетельствует о наличии более высокого числа аминокислот с ароматическими боковыми радикалами	Полоса менее интенсивна	
1780-1700	Карбонильная группа С=О	Полоса хорошо выражена, что указывает на наличие на поверхности молекулы более высокого числа остатков аспарагиновой и глутаминовой аминокислот	Полоса выражена в меньшей степени	
1690-1630	Колебания связи С=N	Полоса имеет более высокую интенсивность и отчетливо выражена, что указывает на существенные различия в количестве или расположении остатков аргинина и лизина		Полоса выражена в меньшей степени
1049	Симметричные валентные колебания двух связей С-С	Полоса более интенсивна, что может свидетельствовать о наличии более высокого числа аминокислот с длинными алкильными радикалами	Полоса менее интенсивна	
868	Асимметричные валентные колебания двух связей С-С	Полоса более интенсивна, что может свидетельствовать о наличии более высокого числа аминокислот с длинными алкильными радикалами	Полоса менее интенсивна	

Таблица 3

Содержание типов (%) вторичной структуры в инулиназах из различных продуцентов

Конформация	Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>	Инулиназы из <i>Helianthus tuberosus</i>		
			I	II	III
α-спирали	27	25	25,5	27	28
β-слои	28	20	37	36	37
Неупорядоченная структура	45	55	37,5	37	35

В ходе проделанной работы мы пришли к выводу, что инулиназы растительного, дрожжевого и грибного происхождения различаются друг от друга по структурным параметрам, что, вероятно, обуславливает их отличия по физико-химическим и каталитическим свойствам.

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

- Onodera S., Shiomi N. // *Agric. Biol. Chem.* 1988. Vol. 52. P. 2569–2576.
- Basso A., Spizzo P., Ferrario V., Knapic L., Savko N., Braiuca P., Ebert C., Ricca E., Calabro V., Gardossi L. // *Biotechnol. Prog.* 2010. Vol. 26, № 2. P. 397–405.
- Sumat C.J., Jain P.C., Kango N. // *Braz. J. Microbiol.* 2012. Vol. 43. P. 1517.
- Rawat H.K., Ganaie M.A., Kango N. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2015. Vol. 107, № 3. P. 799–811.
- Vijayaraghavan K., Yamini D., Ambika V., Sowdamini N.S. // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2009. Vol. 29. P. 67–77.
- Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydashina 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.
- Волков П.В., Сеницына О.А., Федорова Е.А., Рожкова А.М., Сагруддинов А.Д., Зоров И.Н., Окунев О.Н., Гусаков А.В., Сеницын А.П. // *Биохимия.* 2012. Т. 77, № 5. С. 611–621.
- Flores A.C., Morlett J.A., Rodriguez R. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2016. Vol. 56, № 11. P. 1893–1902.

9. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Биотехнология. 2012. № 1. С. 43-63.
10. Жеребцов Н.А., Абрамова И.Н., Шеламова С.А., Попова Т.Н. // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 6. С. 619-625.
11. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A. // Biocatalysis and Biotransformation. 2016. V. 34, № 1. P. 1-17.
12. 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.
13. Alberto F., Bignon C., Sulzenbacher G., Henrissat B., Czjzek M. // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 18903–18910.
14. Alberto F., Jordi E., Henrissat B., Czjzek M. // Biochem. J. 2006. Vol. 395. P. 457–462.
15. Alvaro-Benito M., Polo A., Gonzalez B., Fernandez-Lobato M., Sanz-Aparicio J. // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 13930–13941.
16. Verhaest M., Lammens W., Le Roy K., De Coninck B., De Ranter C.J., Van Laere A., Van den Ende W., Rabijns A. // Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. 2006. Vol. 62. P. 1555–1563.
17. Arand M., Golubev A.M., Brandao Neto J.R., Polikarpov I., Wattiez R., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Shabalin K.A., Shishliannikov S.M., Chepurnaya O.V., Neustroev K.N. // Biochem. J. 2002. Vol. 362, № 1. P. 131–135.
18. Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Polikarpov I. // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 344, № 11. P. 471–480.
19. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G., Perpete E.A., Wouters J., Housen I., Michaux C. // Biochimie. 2012. Vol. 94, № 11. P. 2423–2430.
20. Bujacz A., Jedrzejczak-Krzepkowska M., Bielecki S., Redzynia I., Bujacz G. // FEBS J. 2011. Vol. 278. P. 1728–1744.
21. Verhaest M., Van den Ende W., Le Roy K., De Ranter C.J., Van Laere A., Rabijns A. // The Plant Journal. 2005. Vol. 41. P. 400–411.
22. Холявка М.Г. Дис. канд. биол. наук. Воронеж, 2010, 178 с.
23. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. №1. С. 3-7.

Воронежский государственный университет
Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии. Профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета
E-mail: holyavka@rambler.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., Biophysics and Biotechnology Department. Full Professor of Physics Department, Sevastopol State University
E-mail: holyavka@rambler.ru

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

FEATURES OF THE SECONDARY STRUCTURES OF INULINASES FROM *HELIANTHUS TUBEROSUS*, *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* AND *ASPERGILLUS NIGER*

M. G. Holyavka^{1,2*}, V. G. Artyukhov¹

¹ Voronezh State University

² Sevastopol State University

Abstract. Exo- (EC 3.2.1.80) and endoinulinases (EC 3.2.1.7) are involved in the carbohydrate metabolism of higher plants and some microorganisms, are the most important components of signaling pathways, and play one of the key roles in controlling the processes of cell differentiation and development. Studies of the structural features of inulinases need to be developed and expanded, since the issues of structural and functional differences between inulinases and related enzymes isolated from producers of various taxonomic groups have not yet been finally resolved. Relationships and evolutionary relationships among inulinases isolated from various producers have not been fully identified. In this regard, the purpose of this

work was to study the features of the secondary structures of plant, yeast, and fungal inulinases using the example of inulinases from *Helianthus tuberosus*, *Kluyveromyces marxianus* and *Aspergillus niger*.

The objects of the study were inulinases isolated from a culture of the yeast *Kluyveromyces marxianus* and tubers of *Helianthus tuberosus* at the Department of Biophysics and Biotechnology of Voronezh State University, as well as a commercial preparation of inulinase from *Aspergillus niger* from Sigma Aldrich (Germany).

The IR spectra of nonoriented powder samples were recorded at the Central Control and Observatory of Voronezh State University using a Bruker Vertex-70 spectrometer (Germany). The ratio of secondary structure types for inulinases was determined based on the Bouguer-Lambert-Beer law.

It has been proven that inulinases of plant, yeast and fungal origin have their own structural features, which probably determines the differences in their physicochemical and catalytic properties. Three inulinases isolated from *Helianthus tuberosus* showed no significant differences in the ratio of secondary structure types (α -helices, β -sheets, disordered regions). The enzyme from *Aspergillus niger* is characterized by the lowest content of β -sheets (8-17% lower than that of other inulinases) and the largest number of disordered regions (10-20% higher than that of other enzymes studied by us). The content of β -sheets in the inulinase molecule from *Kluyveromyces marxianus* is 8-9% lower than that of plant enzymes and 8% higher than that of the fungal enzyme, while the number of disordered regions is 8-10% higher than that of inulinases from *Helianthus tuberosus*, and 10% lower than that of inulinase isolated from *Aspergillus niger*.

Keywords: inulinase, protein secondary structure, α -helices, β -sheets, disordered regions, IR spectroscopy

REFERENCES

1. Onodera S., Shiomi N., *Agric. Biol. Chem.*, 1988, V. 52, pp. 2569–2576.
2. Basso A., Spizzo P., Ferrario V., Knapic L., Savko N., Braiuca P., Ebert C., Ricca E., Calabro V., Gardossi L., *Biotechnol. Prog.*, 2010, V. 26, No 2, pp. 397–405.
3. Sumat C.J., Jain P.C., Kango N., *Braz. J. Microbiol.*, 2012, V. 43, pp. 1517.
4. Rawat H.K., Ganaie M.A., Kango N., Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, V. 107, No 3, pp. 799–811.
5. Vijayaraghavan K., Yamini D., Ambika V., Sowdamini N.S., *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2009, V. 29, pp. 67–77.
6. 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, V. 115, pp. 829–834.
7. Volkov P.V., Fedorova E.A., Rojkova A.M., Satrutdinov A.D., Zorov I.N., Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Sinitsyna O.A., Okunev O.N., *Biochemistry (Moscow)*, 2012, V. 77, No 5, pp. 492–501.
8. Flores A.C., Morlett J.A., Rodriguez R., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, V. 56, No 11, pp. 1893–1902.
9. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., *Biotechnology in Russia*, 2012, No 1, pp. 43–63.
10. Zherebtsov N.A., Abramova I.N., Shelamova S.A., Popova T.N., *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003, V. 39, No 6, pp. 544–548.
11. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., *Biocatalysis and Biotransformation*, 2016, V. 34, No 1, pp. 1–17.
12. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Obraztsova T.B., *Biophysics*, 2009, V. 54, No 6, pp. 675–680.
13. Alberto F., Bignon C., Sulzenbacher G., Henrissat B., Czjzek M., *J. Biol. Chem.*, 2004, V. 279, pp. 18903–18910.
14. Alberto F., Jordi E., Henrissat B., Czjzek M., *Biochem. J.*, 2006, V. 395, pp. 457–462.
15. Alvaro-Benito M., Polo A., Gonzalez B., Fernandez-Lobato M., Sanz-Aparicio J., *J. Biol. Chem.*, 2010, V. 285, pp. 13930–13941.
16. Verhaest M., Lammens W., Le Roy K., De Coninck B., De Ranter C.J., Van Laere A., Van den Ende W., Rabijns A., *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.*, 2006, V. 62, pp. 1555–1563.
17. Arand M., Golubev A.M., Brandao Neto J.R., Polikarpov I., Wattiez R., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Shabalin K.A., Shishliannikov S.M., Chepurnaya O.V., Neustroev K.N., *Biochem. J.*, 2002, V. 362, No 1, pp. 131–135.
18. Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Polikarpov I., *J. Mol. Biol.*, 2004, V. 344, No 11, pp. 471–480.
19. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G., Perpete E.A., Wouters J., Housen I., Michaux C., *Biochimie*, 2012, V. 94, No 11, pp. 2423–2430.

Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

20. Bujacz A., Jedrzejczak-Krzepkowska M., Bielecki S., Redzynia I., Bujacz G., FEBS J., 2011, V. 278, pp. 1728–1744.

21. Verhaest M., Van den Ende W., Le Roy K., De Ranter C.J., Van Laere A., Rabijns A., The Plant Journal, 2005, V. 41, pp. 400–411.

22. Kholyavka M.G. Dis. kand. biol. nauk. Voronezh, 2010, 178 s.

23. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii, 2011, No 1, pp. 3-7.