

**РОЛЬ ВНУТРЕННИХ СТРУКТУР В ОБРАЗОВАНИИ
КОМПЛЕКСОВ ЭНДОИНУЛИНАЗЫ ИЗ *ASPERGILLUS
FICUUM* С МОНО-, ДИ- И ПОЛИСАХАРИДАМИ**

А.Н. Дубовицкая¹, С.М. Макин¹, Д.Ю. Богомолов¹, М.С. Кондратьев^{1,2},
М.Г. Холявка^{1,3*}, В.Г. Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет

²Институт биофизики клетки РАН

³Севастопольский государственный университет

Поступила в редакцию 22.12.2023 г.

Аннотация. Данная работа раскрывает роль внутренних структур белковых молекул, таких как внутренние полости и туннели, при связывании полипептидной цепи с лигандами. Вклад этих структур в функционирование ферментов рассмотрен на конкретных примерах взаимодействия эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* с моно-, ди- и полисахаридами, а именно: глюкозой, фруктозой, маннозой, сахарозой и инулином. Отдельное внимание уделено результатам одностороннего молекулярного докинга и анализу состава внутренних структур указанных комплексов. Согласно полученным данным, все из представленных лигандов способны как к формированию водородных связей с отдельными аминокислотными остатками, так и к осуществлению с ними физических взаимодействий. Анализ представленных результатов показал, что проявляется закономерность образования определенных типов взаимодействий между отдельными аминокислотами в составе белка и лигандами. В частности, Thr288 имеет тенденцию формировать водородные связи с представленными лигандами и, как правило, обнаруживается в стенках прилегающих к ним туннелей. В свою очередь, Phe352, также выявляемый в данных структурах, участвует предпочтительно в физических взаимодействиях с углеводами. Закономерность прослеживается и в отношении Ile270: данный аминокислотный остаток преимущественно находится в составе стенки ближней к лиганду внутренней полости и формирует физические взаимодействия с рядом рассмотренных лигандов. Сделан акцент на активное вовлечение аминокислот, входящих в состав стенок внутренних структур, примыкающих к лигандам, в непосредственное взаимодействие с моно-, ди- и полисахаридами. Максимальное вовлечение этих аминокислотных остатков в связывание лиганда выявлено у комплекса инулиназы-инулин: ~50% всех аминокислот, окружающих ближайшие к лиганду внутренние полости и туннели, принимают участие в образовании комплекса с полисахаридом. Обсуждаются перспективы использования выдвинутых представлений о внутренних структурах белков в разработке новых технологических решений: проведение более глубокого исследования молекулярной структуры как эндо-, так и экзоинулиназ позволяет выявить потенциальные сайты связывания с ними различных лигандов и открывает новые перспективы для коммерческого использования этих ферментов, что обеспечивает значительный вклад в развитии биотехнологической промышленности.

Ключевые слова: инулиназа, молекулярный докинг, внутренние структуры, туннели, внутренние полости

В пищевой промышленности особую роль играет производство, связанное с использованием инулина и богатого инулином сырья. Их используют для получения сиропов с высоким содержанием фруктозы и фруктоолигосахаридов, которые

обычно применяются в производстве йогуртов, сыров, шоколада, мороженого, соусов, кондитерских изделий, десертов, молока и т. д. [1-3].

Фруктоолигосахариды (ФОС) - это низкокалорийный подсластитель, который благодаря своим высококачественным характеристикам используется во многих продуктах питания и напитках. Фруктоза слаще сахарозы в 1,2-2,0 раза и имеет ряд

© Дубовицкая А.Н., Макин С.М., Богомолов Д.Ю., Кондратьев М.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., 2024

полезных свойств: способствует обходу пути метаболизма глюкозы, улучшает абсорбцию железа, снижает риски возникновения атеросклероза, ожирения и кариеса. Она также обладает функциональными и техническими свойствами, которые делают ее важным ингредиентом в пищевой промышленности. Фруктоза используется в производстве продуктов питания, напитков, фармацевтических препаратов и капсул для инфузий и инъекций [4].

Инулин и фруктоолигосахариды могут усваиваться только благодаря деятельности бактерий, то есть являются пребиотиками. Они улучшают состав флоры кишечника человека путем ферментации, в результате чего образуется популяция бифидобактерий [1, 4-5].

Гидролизовать инулин до олигосахаридов способен ряд ферментов, среди них особое внимание заслуживают инулиназы – экзоинулиназа (КФ 3.2.1.80) и эндоинулиназа (КФ 3.2.1.7).

Экзоинулиназа осуществляет гидролиз инулина с его концевой звена, высвобождая фруктозу с молекулой глюкозы, тогда как эндоинулиназа действует на внутренние β -2,1-гликозидные связи инулина с образованием ФОС различной длины цепи [6-7].

Гидролиз, катализируемый инулиназами, опосредуется кислотным катализом, для которого требуются два каталитических остатка, а именно донор протона и нуклеофил. Электрофильно-нуклеофильное взаимодействие между карбоксильной группой обоих каталитических остатков способствует гидролизу фруктанов инулинового типа. Активный центр эндоинулиназы состоит из молекул глутамата, а именно Glu43 и Glu233, которые ведут себя как нуклеофил и донор протонов соответственно. Остатки, окружающие фрагменты глутамата, играют важную роль в каталитическом гидролизе инулина, главным образом, с образованием инулотриозы в качестве основного продукта. В этом катализе принимают опосредованное участие Met41, Asn42, Gln59, Pro62, Trp67, Ile70, Phe99, Arg175, Asn265, Arg295 и Asp298. Сайт-направленный мутагенез остатков Trp17 и Glu20 также указывает на важность этих остатков в поддержании активности инулиназы из *A. ficum* [8-9].

Хотя объем информации о структурных аспектах инулиназ каждый день увеличивается, молекулярный механизм гидролиза экзо- и эндоинулиназой до сих пор не ясен. Таким образом, исследования структурных и функциональных характеристик инулиназ являются важнейшим направлением современной биотехнологии [4, 10].

Однако при работе с инулиназой присутствуют затруднения, связанные с неоднородностью субстрата – растительное сырье, богатое инулином, представляет собой смесь сахаров [6] и может включать, помимо инулина, такие углеводы как глюкоза, фруктоза, сахароза и манноза [11].

Фруктоза и глюкоза, которые образуются в результате гидролиза инулина, оказывают ингибирующее воздействие на фермент [6, 12-15]. Инулиназа использует инулин в качестве основного субстрата, но также может использовать сахарозу в качестве минорного субстрата [16-19]. Манноза способна выступать в качестве активатора инулиназы [20].

Различные сахара, содержащиеся в растительном сырье, могут оказывать различное влияние на активность инулиназы. Именно поэтому важно исследовать пути взаимодействия этих сахаров с молекулами фермента, используя методы компьютерной биологии.

Белки – это трехмерные структуры со сложной формой и топографией поверхности. Такие внутренние структуры, как туннели, полости и поры, часто играют важную функциональную роль.

В фармацевтической химии целью исследователей является поиск или создание сайтов, связывающих молекулы, подобные лекарствам. Поскольку межмолекулярное взаимодействие активно вовлекает внутренние структуры, их анализ является важной частью анализа фармацевтических агентов, рационального дизайна лекарств и прогнозирования их лечебных эффектов [21].

Внутренние полости белковых молекул играют значительную роль для осуществления взаимодействий с лигандом. В частности, активные центры ферментов обычно располагаются во внутренних полостях молекул. Более 60% белковых молекул имеют активный центр, погруженный в полости. Пورا – это путь, ведущий через структуру белка без какого-либо прерывания внутренней полостью. Туннель соединяет поверхность белка с внутренней полостью или две внутренние полости между собой. Туннели обеспечивают транспорт субстратов, кофакторов, растворителей и продуктов к активному центру и обратно и играют решающую роль во всех частях каталитического цикла фермента. Они также контролируют вход лигандов в активный центр. Выбор лигандов, которые могут проходить через туннели, предотвращает образование «непродуктивных» комплексов в месте связывания, что может снизить эффективность действия фермента [22-24].

Различия в профилях внутренних структур, сопровождающие взаимодействие эндоинулина-

зы из *Aspergillus ficuum* с различными углеводами, подробно рассмотрены в [25], данная же работа посвящена выявлению роли этих внутренних структур в образовании комплексов инулиназы с моно-, ди- и полисахаридами.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования была выбрана пространственная структура эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7). Отрисовка молекул углеводов была произведена в HyperChem. Докинг белковых структур с лигандами (молекулами глюкозы, фруктозы, сахарозы, маннозы и инулина) осуществляли в программном обеспечении AutoDock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodockvina-1-1-2-64-bit>). Вычисление параметров туннелей и внутренних полостей проводили при помощи программы MOLE (<http://mole.chemi.muni.cz>).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Инулин

Методами молекулярного докинга (рис. 1) установлено, что взаимодействие молекулы ину-

линазы с инулином осуществляется с помощью водородных связей (**Tyr104**, Glu239, Val306) и различных физических взаимодействий (**Phe180**, Phe181, Arg183, **Phe238**, Pro241, Thr248, Trp250, **Asn305**, **Arg313**) (здесь и далее: аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии и входящие в состав внутренних полостей выделены жирным шрифтом; участвующие во взаимодействии и входящие в состав туннелей выделены жирным курсивом).

Всего в молекуле инулиназы из *Aspergillus ficuum* обнаруживается 7 внутренних полостей (рис. 2). К молекуле инулина примыкает внутренняя полость объемом 0,152 нм³, которая отсутствует у других изучаемых нами комплексов [25]. Полость образована следующими аминокислотными остатками: **Tyr104**, Lys178, **Phe180**, Met237, **Phe238**, Val304, **Asn305**, **Arg313**. Таким образом, ~50% аминокислотных остатков, формирующих стенки данной полости, принимают участие во взаимодействии с инулином. К молекуле инулина также примыкает туннель длиной 6,39 Å. Он также не образуется при взаимодействии инулиназы с другими лигандами. В

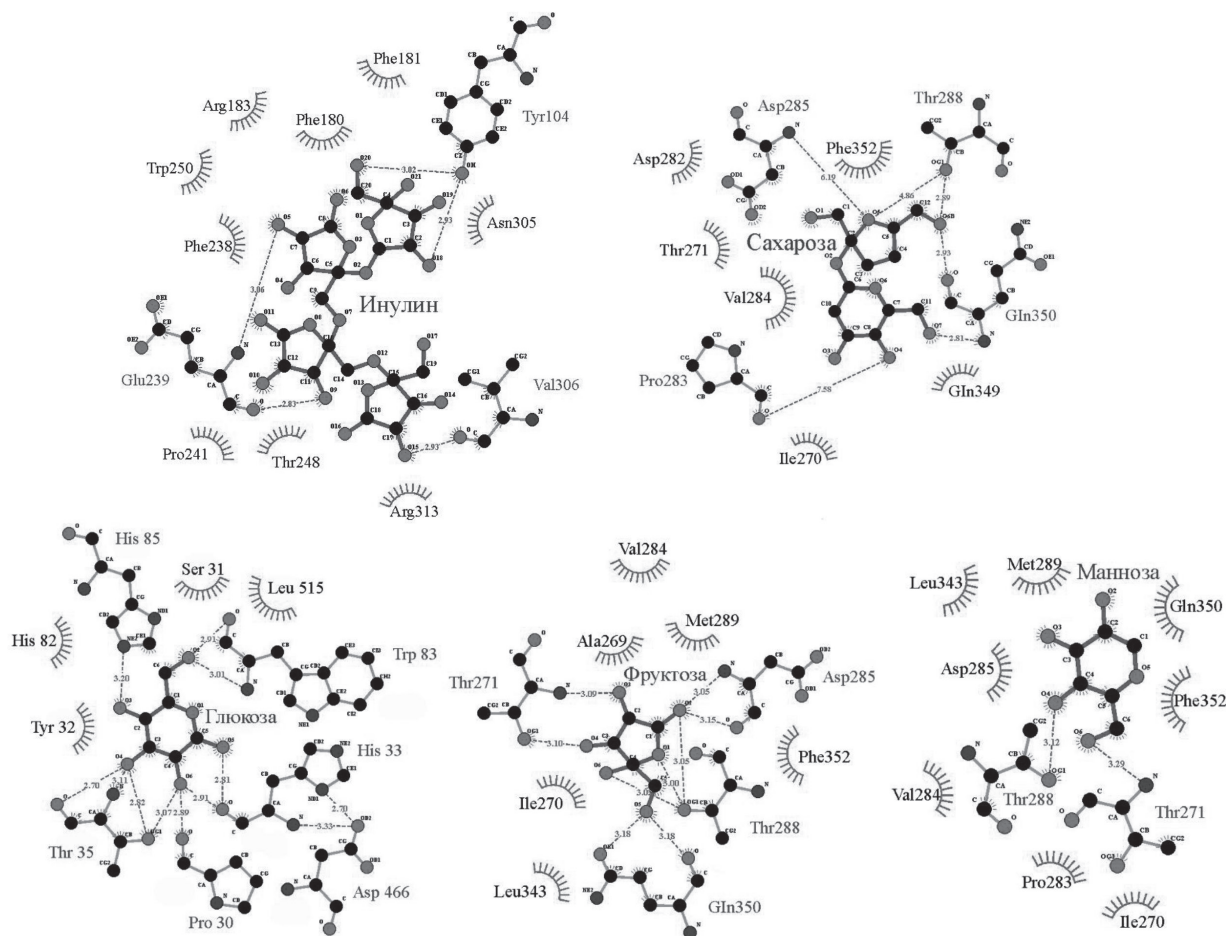


Рис. 1. Детализация результатов молекулярного докинга инулиназы с моно-, ди- и полисахаридами

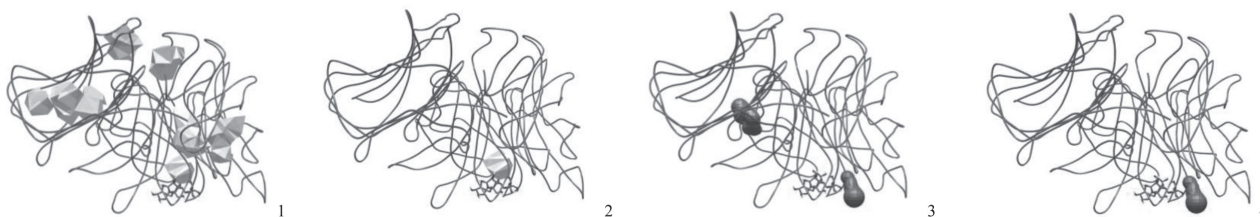


Рис. 2. Внутренние структуры комплекса инулиназа-инулин (1 – все представленные внутренние полости, 2 – внутренняя полость, примыкающая к молекуле инулина, 3 – все представленные туннели, 4 – туннель, примыкающий к молекуле инулина)

состав его стенок входят следующие аминокислотные остатки: Tyr 104, Tyr 105, Pro 107, **Asn 305**. Из них **Asn 305** принимает участие во взаимодействии с лигандом, что подтверждают данные односточного молекулярного докинга.

Так как инулиназа среди субстратов имеет наивысшую специфичность именно к инулину [26], справедливо предположить, что данный туннель играет решающую роль в транспортировке инулина к активному центру фермента.

Глюкоза

С помощью односточного молекулярного докинга (рис. 1) было установлено, что в образовании комплекса с лигандом принимают участие следующие аминокислотные остатки: Pro30, **His33**, Thr35, **Trp83**, His85, Asp466 (образуют водородные связи с лигандом); Ser31, **Tyr32**, His82, **Leu515** (формируют физические взаимодействия).

Всего в комплексе инулиназа-глюкоза наблюдается 6 внутренних полостей (рис. 3). Ближайшая к лиганду полость имеет объем 0,284 нм³ и следующий аминокислотный состав: **Tyr32**, **His33**, Phe34, Leu80, Met81, **Trp83**, Trp303, Leu335, Ser336, Phe337, Pro338, Ile363, **Leu515**. В данном комплексе присутствует один туннель длиной 15,09 Å, он удален от лиганда и не взаимодействует с ним.

Фруктоза

Посредством гибкого молекулярного докинга (рис. 1) было установлено, что во взаимодействии инулиназы с фруктозой в равной степени играют роль водородные связи (Thr271, Asp285, **Thr288**, Gln350) и физические взаимодействия (**Ala269**, **Ile270**, Val284, **Met289**, Leu343, **Phe352**).

В модели комплекса инулиназы с фруктозой также наблюдается 6 внутренних полостей (рис. 4), ближняя к лиганду имеет объем 0,205 нм³.



Рис. 3. Внутренние структуры комплекса инулиназа-глюкоза (слева направо: все внутренние полости комплекса; внутренняя полость, прилегающая к молекуле глюкозы и взаимодействующая с ней; туннель в составе комплекса)



Рис. 4. Внутренние структуры комплекса инулиназа-фруктоза (слева направо: все внутренние полости комплекса; внутренняя полость, прилегающая к молекуле фруктозы и взаимодействующая с ней; туннель, прилегающий к молекуле фруктозы и взаимодействующий с ней)

В ее состав входят следующие аминокислотные остатки: Leu200, Leu217, Ile222, Leu225, Trp232, Val252, Met253, Met254, Leu268, **Ala269**, **Ile270**, Phe279, Ala281, Val284, **Met289**.

Единственный туннель имеет длину 15,09 Å и прилегает к молекуле фруктозы. В его формировании принимают участие следующие аминокислотные остатки: Ala286, Ser287, **Thr288**, Trp290, Leu291, Asn293, **Phe352**, Gln354, Glu478, Ala479, Val480.

Манноза

Методами молекулярного односточного докинга (рис. 1) было выявлено, что основной вклад в образование комплекса вносят физические взаимодействия (**Ile270**, Pro283, Val284, Asp285, **Met289**, Leu343, Gln350, **Phe352**), в меньшей степени – водородные связи (Thr271, **Thr288**).

В комплексе инулиназы с маннозой наблюдается 7 внутренних полостей (рис. 5). Ближайшая полость, располагающаяся к лиганду, имеет объем 0,205 нм³. Данная полость встречается исключительно в моделях молекулы инулиназы в комплексе с молекулами маннозы и сахарозы. Ее аминокислотный состав: Leu200, Leu217, Ile222, Leu225, Trp232, Val252, Met253, Met254, Leu268, Ala269, **Ile270**, Phe279, Ala281, Val284, **Met289**.

В данном комплексе обнаружен лишь один туннель, со следующим составом: Ala286, Ser287, **Thr288**, Trp290, Leu291, Asn293, **Phe352**, Gln354, Gly477, Glu478, Ala479, Val480.

Сахароза

Согласно результатам молекулярного докинга (рис. 1), в физических взаимодействиях с сахарозой принимают участие следующие аминокислоты: **Ile270**, Thr271, Asp282, **Val284**, Gln349, **Phe352**. В то время как аминокислотные остатки Pro283, Asp285, **Thr288**, Gln350 задействованы в образовании водородных связей.

В модели наблюдается 7 внутренних полостей (рис. 6), ближайшая к лиганду имеет объем 0,205 нм³ и идентична по составу аналогичной полости в комплексе инулиназа-манноза: Leu200, Leu217, Ile222, Leu225, Trp232, Val252, Met253, Met254, Leu268, Ala269, **Ile270**, Phe279, Ala281, **Val284**, Met289. Туннель в данном комплексе один, и он также является идентичным туннелю в молекуле инулиназы в комплексе с маннозой: Ala286, Ser287, **Thr288**, Trp290, Leu291, Asn293, **Phe352**, Gln354, Gly477, Glu478, Ala479, Val480.



Рис. 5. Внутренние структуры комплекса инулиназа-манноза (слева направо: все внутренние полости комплекса; внутренняя полость, прилегающая к молекуле маннозы и взаимодействующая с ней; туннель, прилегающий к молекуле маннозы и взаимодействующий с ней)



Рис. 6. Внутренние структуры комплекса инулиназа-сахароза (слева направо: все внутренние полости комплекса; внутренняя полость, прилегающая к молекуле сахарозы и взаимодействующая с ней; туннель, прилегающий к молекуле сахарозы и взаимодействующий с ней)

Таблица 1

Аминокислотные остатки, принимающие участие во взаимодействии с лигандом и/или входящие в состав примыкающих к лиганду структур

Лиганд	Аминокислотные остатки		Аминокислотные остатки, образующие стенки прилегающих к лиганду внутренних структур	
	образующие с лигандом водородные связи	участвующие в реализации физических взаимодействий с лигандом	полости	туннеля
Инулин	Tyr104 , Glu239, Val306	Phe181, Arg183, Phe180 , Trp250, Phe238 , Pro241, Thr248, Arg313 , Asn305	Tyr104 , Lys178, Phe180 , Met237, Phe238 , Val304, Asn305 , Arg313	Tyr104, Tyr105, Asn305 , Pro107
Глюкоза	His85, Trp83 , His33 , Thr35, Asp466, Pro30	Ser31, Leu515 , His82, Tyr32	Tyr32 , His33 , Phe34, Leu80, Met81, Trp83 , Trp303, Leu335, Ser336, Phe337, Pro338, Ile363, Leu515	-
Фруктоза	Asp285, Thr288 , Gln350, Thr271	Val284, Met289 , Ala269 , Phe352 , Ile270 , Leu343	Leu200, Leu217, Ile222, Leu225, Trp232, Val252, Met253, Met254, Leu268, Ala269 , Ile270 , Phe279, Ala281, Val284, Met289	Thr288 , Trp290, Leu291, Phe352 , Glu478, Gln354, Leu291, Val480, Asn293, Ala479, Ser287, Trp290, Ala286
Манноза	Thr288 , Thr271	Met289 , Leu343, Gln350, Asp285, Phe352 , Val284, Pro283, Ile270	Leu200, Leu217, Ile222, Leu225, Trp232, Val252, Met253, Met254, Leu268, Ala269, Ile270 , Phe279, Ala281, Val284, Met289	Phe352 , Gln354, Gly477, Glu478, Trp290, Leu291, Val480, Asn293, Ala479, Ser287, Thr288 , Ala286
Сахароза	Gln350, Pro283, Asp285, Thr288	Phe352 , Asp282, Gln349, Ile270 , Thr271, Val284	Leu200, Leu217, Ile222, Leu225, Trp232, Val252, Met253, Met254, Leu268, Ala269, Ile270 , Phe279, Ala281, Val284 , Met289	Phe352 , Gln354, Gly477, Glu478, Trp290, Leu291, Val480, Asn293, Ala479, Ser287, Thr288 , Ala286

*Аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии и входящие в состав внутренних полостей, выделены жирным шрифтом; участвующие во взаимодействии и входящие в состав туннелей, выделены жирным курсивом

В результате проведенного анализа моделей комплексов инулиназы из *Aspergillus ficuum* с моно-, ди- и полисахаридами подтверждается значение внутренних структур молекулы фермента не только для формирования пространственной организации белковой глобулы, но и в отношении участия во множественных взаимодействиях с изучаемыми нами лигандами. Для удобства все данные по составу прилегающих к лигандам внутренних структур были сведены в таблицу:

Анализ результатов свидетельствует о том, что существуют определенные закономерности во взаимодействии отдельных аминокислотных остатков и изучаемых нами углеводов. Например, Thr288 предпочитает формировать водородные связи с рассматриваемыми лигандами и находится в примыкающих к ним туннелях. Phe352, обнаруживаемый в тех же структурах, склонен осуществлять физические взаимодействия с углеводами. Также можно заметить закономерность в поведении Ile270: этот аминокислотный остаток часто участвует в образовании внутренней полости, примыкающей к лиганду, и формирует

физические взаимодействия с представленными углеводами.

Таким образом, знание структурно-функциональных характеристик инулиназ и их внутренней пространственной организации важно для понимания механизма инулиназной активности. Более глубокое изучение молекулярной структуры как эндо-, так и экзоинулиназ открывает новые перспективы их коммерческого использования, и, кроме того, способствует выявлению потенциальных сайтов связывания лигандов различной структуры, что обеспечивает существенный вклад в развитие биотехнологической промышленности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mathur A. Inulinase: Microbial origin to food applications / A. Mathur, D. Sadana // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 10. – No 4. – P 360-374.
2. Holyavka M. Structural and functional properties of inulinases: a review / M. Holyavka, V. Artyukhov, T. Kovaleva // Biocatalysis and Biotransformation. – 2016. – Vol. 34. – No 1. – P. 1-17.

3. Ковалева Т. А. Исследование иммобилизации инулиназы на ионогенных и неионогенных носителях / Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, А. С. Таха // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007. – Т. 7. – № 5. – С. 804-810.
4. Singh R. S. Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications / R. S. Singh, T. Singh, M. Hassan, J. F. Kennedy // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 193-210.
5. Ojwach J. Oligosaccharides production from coprophilous fungi: An emerging functional food with potential health-promoting properties / J. Ojwach, A. I. Adetunji, T. Mutanda, S. Mukaratirwa // Biotechnology Reports. – 2022. – Vol. 33. – P. e00702.
6. Singh R. S. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks / R. S. Singh, T. Singh, C. Larroche // Bioresource technology. – 2019. – Vol. 273. – P. 641-653.
7. Holyavka M. G. Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix / M. G. Holyavka, M. S. Kondratyev, A. N. Lukin, B. L. Agapov, V. G. Artyukhov // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 138. – P. 681-692.
8. Park S. Trp17 and Glu20 residues in conserved WMN (D/E) PN motif are essential for *Aspergillus ficuum* endoinulinase (EC 3.2. 1.7) activity / S. Park, Y. Han, H. Kim, S. Song, T. B. Uhm, K. S. Chae // Biochemistry (Moscow). – 2003. – Vol. 68. – P. 658-661.
9. Vandamme A. M. Asparagine 42 of the conserved endo-inulinase INU2 motif WMNDPN from *Aspergillus ficuum* plays a role in activity specificity / A. M. Vandamme, C. Michaux, A. Mayard, I. Housen // FEBS Open Bio. – 2013. – Vol. 3. – P. 467-472.
10. Ковалева Т. А. Исследование структурных особенностей инулиназ из различных продуцентов методом ИК-спектрофотометрии / Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 1. – С. 3-7.
11. Redondo-Cuenca A. Inulin extraction from common inulin-containing plant sources / A. Redondo-Cuenca, S. E. Herrera-Vázquez, L. Condezo-Hoyos, E. Gómez-Ordóñez, P. Rupérez // Industrial Crops and Products. – 2021. – Vol. 170. – P. 113726.
12. Meng Q. Efficient biosynthesis of exopolysaccharide from Jerusalem artichoke using a novel strain of *Bacillus velezensis* LT-2 / Q. Meng, C. Lu, H. Gao, G. Chen, L. Wu, J. Wu, S. Li, B. F. He // Bioresource Technology. – 2021. – Vol. 320. – P. 124346.
13. Zhang L. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris* / L. Zhang, C. Zhao, W. Y. Ohta, Y. Wang // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40. – No 5. – P. 1541-1545.
14. Corona R. I. Substrates' and products' inhibition in fructanase production by a new *Kluyveromyces marxianus* CF15 from *Agave tequilana* fructan in a batch reactor / R. Corona, A. Morales-Burgos, C. Pelayo, J. A. Arias, J. P. García-Sandoval // Bioprocess and biosystems engineering. – 2019. – Vol. 42. – P. 1779-1791.
15. Guzmán-Lagunes F. Production of polyhydroxybutyrate by coupled saccharification–fermentation of inulin / F. Guzmán-Lagunes, L. Martínez-dlCruz, P. Wongsirichot, J. Winterburn, C. Montiel // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2023. – P. 1-11.
16. Germec M. Predicting the experimental data of the substrate specificity of *Aspergillus niger* inulinase using mathematical models, estimating kinetic constants in the Michaelis–Menten equation, and sensitivity analysis / M. Germec, I. Turhan // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2021. – Vol. 13. – P. 10641–10652.
17. Germec M. Effect of pH control and aeration on inulinase production from sugarbeet molasses in a bench-scale bioreactor / M. Germec, I. Turhan // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2021. – Vol. 13. – P. 4727–4739.
18. Das D. Optimization of inulinase production by a newly isolated strain *Aspergillus flavus* var. *flavus* by solid state fermentation of *Saccharum arundinaceum* / D. Das, R. Selvaraj, M. R. Bhat // Biocatalysis and agricultural Biotechnology. – 2019. – Vol. 22. – P. 101363.
19. da Silva W. B. Optimization strategy for inulinase production by *Aspergillus niger* URM5741 and its biochemical characterization, kinetic/thermodynamic study, and application on inulin and sucrose hydrolysis / W. B. da Silva, T. S. Porto, S. P. da Silva, R. L. de Oliveira // 3 Biotech. – 2023. – Vol. 13. – No 11. – P. 376.
20. Ковалева Т. А. Влияние маннозы и N-ацетилглюкозамина на ферментативную активность инулиназы / Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, М. Г. Калашникова, Д. Сливкин // Технологии живых систем. – 2011. – Т. 8. – № 1. – С. 60-63.
21. Coleman R. G. Finding and characterizing tunnels in macromolecules with application to ion channels and pores / R. G. Coleman, K. A. Sharp //

Biophysical journal. – 2009. – Vol. 96. – No 2. – P. 632-645.

22. Marques S. Role of tunnels and gates in enzymatic catalysis / S. Marques, J. Brezovsky, J. Damborsky // Understanding Enzymes: Function, Design, Engineering, and Analysis. – 2016. – P. 421-463.

23. Pravda L. Anatomy of enzyme channels / L. Pravda, K. Berka, R. Svobodová Vařeková, D. Sehnal, P. Banáš, R. A. Laskowski, J. Koča, M. Otyepka // BMC bioinformatics. – 2014. – Vol. 15. – No 1. – P. 1-8.

24. Kokkonen P. Engineering enzyme access tunnels / P. Kokkonen, D. Bednar, G. Pinto, Z. Prokop, J. Damborsky // Biotechnology advances. – 2019. – Vol. 37. – No 6. – P. 107386.

25. Макин С. М. Особенности взаимодействия эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* с моно-, ди- и полисахаридами / С. М. Макин, А. Н. Дубовицкая, Д. Ю. Богомолов, М. С. Кондратьев, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов // Биофизика. – Т. 68. – № 5. – С. 892-899.

26. Holyavka M. G. In silico design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase / M. G. Holyavka, M. S. Kondratyev, A. A. Samchenko, A. V. Kabanov, V. M. Komarov, V. G. Artyukhov // Computers in biology and medicine. – 2016. – Vol. 71. – P. 198-204.

*Воронежский государственный университет
Дубовицкая Анастасия Николаевна, аспирант
кафедры биофизики и биотехнологии, младший
научный сотрудник
e-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru*

*Макин Сергей Михайлович, аспирант кафе-
дры биофизики и биотехнологии
e-mail: integral_po_dx@mail.ru*

*Богомолов Даниил Юрьевич, аспирант кафе-
дры биофизики и биотехнологии
e-mail: danyabogomoloff@yandex.ru*

*Холявка Марина Геннадьевна, д.б.н., профес-
сор кафедры биофизики и биотехнологии
e-mail: holyavka@rambler.ru*

*Артюхов Валерий Григорьевич, д.б.н., профес-
сор, заведующий кафедрой биофизики и биотех-
нологии
e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Институт биофизики клетки РАН
Кондратьев Максим Сергеевич, д.ф.-м.н., за-
ведующий лабораторией структуры и динамики
биомолекулярных систем; старший научный со-
трудник кафедры биофизики и биотехнологии,
Воронежский государственный университет
e-mail: ma-ko@bk.ru*

*Voronezh State University
Dubovitskaya A. N., postgraduate student of the
Department of Biophysics and Biotechnology, junior
researcher
e-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru*

*Makin S. M., postgraduate student of the
Department of Biophysics and Biotechnology
e-mail: integral_po_dx@mail.ru*

*Bogomolov D. Yu., postgraduate student of the
Department of Biophysics and Biotechnology
e-mail: danyabogomoloff@yandex.ru*

*Holyavka M. G., DSci., Professor of Biophysics
and Biotechnology Department; Professor of Physics
Department, Sevastopol State University
e-mail: holyavka@rambler.ru*

*Artyukhov V. G., DSci., Full Professor, Head of
the Department of Biophysics and Biotechnology
e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Institute of Cell Biophysics of the RAS
Kondratiev M. S., PhD, Head of the Laboratory
of Structure and Dynamics of Biomolecular Systems;
Senior Researcher, Biophysics and Biotechnology
Department, Voronezh State University
e-mail: ma-ko@bk.ru*

THE ROLE OF INTERNAL STRUCTURES IN THE FORMATION OF COMPLEXES OF ENDOINULINASE FROM *ASPERGILLUS FICUUM* WITH MONO-, DI- AND POLYSACCHARIDES

A.N. Dubovitskaya¹, S.M. Makin¹, D.Yu. Bogomolov¹, M.S. Kondratyev^{1,2},
M.G. Holyavka^{1,3}, and V.G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

³Sevastopol State University

Abstract. This work reveals the role of internal structures of protein molecules, such as internal cavities and tunnels, in the binding of a polypeptide chain to ligands. The contribution of these structures to the functioning of enzymes is examined using specific examples of interaction between endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* and mono-, di- and polysaccharides such as glucose, fructose, mannose, sucrose, and inulin. Particular attention is paid to the results of single-point molecular docking and the analysis of the composition of the internal structures of these complexes. According to the obtained data, all of the presented ligands are capable of forming hydrogen bonds with individual amino acid residues, as well as participating in physical interactions with them. The analysis of the presented results showed that there is a pattern of forming certain types of interactions between individual amino acids in the protein and ligands. In particular, Thr288 has a tendency to form hydrogen bonds with the presented ligands and is usually found in the structure of adjacent to them tunnels. Phe352, which is also detected in these structures, predominantly participates in physical interactions with carbohydrates. The pattern is also traced in the case of Ile270: this amino acid residue is primarily participate in formation of the nearest internal cavity and forms physical interactions with a number of the considered ligands. Particular attention is paid to the active involvement of amino acids that make up the walls of internal structures adjacent to ligands in direct interaction with mono-, di- and polysaccharides. The maximum involvement of these amino acid residues in ligand binding was detected in the complex of inulinase with inulin, with about 50% of all amino acids surrounding the nearest internal cavities and tunnels participating in the formation of the complex with the polysaccharide. Prospects for using the proposed ideas about the internal structures of proteins in the development of new technological solutions are discussed. A deeper study of the molecular structure of both endo- and exo-inulinases allows identifying potential sites for binding various ligands to them, which opens up new prospects for the commercial use of these enzymes, making a significant contribution to the development of biotechnology.

Keywords: inulinase, molecular docking, internal structures, tunnels, internal cavities

REFERENCES

1. Mathur A. Inulinase: Microbial origin to food applications / A. Mathur, D. Sadana // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 10. – No 4. – P 360-374.
2. Holyavka M. Structural and functional properties of inulinases: a review / M. Holyavka, V. Artyukhov, T. Kovaleva // Biocatalysis and Biotransformation. – 2016. – Vol. 34. – No 1. – P. 1-17.
3. Kovaleva T. A. Study on immobilization inulinase ionic and nonionic media / T. A. Kovaleva, M. G. Holyavka, A. S. Taha // Sorption and chromatographic processes. – 2007. – Vol. 7. – No 5. – P. 804-810.
4. Singh R. S. Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications / R. S. Singh, T. Singh, M. Hassan, J. F. Kennedy // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 193-210.
5. Ojwach J. Oligosaccharides production from coprophilous fungi: An emerging functional food with potential health-promoting properties / J. Ojwach, A. I. Adetunji, T. Mutanda, S. Mukaratirwa // Biotechnology Reports. – 2022. – Vol. 33. – P. e00702.
6. Singh R. S. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks / R. S. Singh, T. Singh, C. Larroche // Bioresource technology. – 2019. – Vol. 273. – P. 641-653.
7. Holyavka M. G. Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix / M. G. Holyavka, M. S. Kondratyev, A. N. Lukin, B. L. Agapov, V. G. Artyukhov // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 138. – P. 681-692.

8. Park S. Trp17 and Glu20 residues in conserved WMN (D/E) PN motif are essential for *Aspergillus ficuum* endoinulinase (EC 3.2. 1.7) activity / S. Park, Y. Han, H. Kim, S. Song, T. B. Uhm, K. S. Chae // *Biochemistry (Moscow)*. – 2003. – Vol. 68. – P. 658-661.
9. Vandamme A. M. Asparagine 42 of the conserved endo-inulinase INU2 motif WMNDPN from *Aspergillus ficuum* plays a role in activity specificity / A. M. Vandamme, C. Michaux, A. Mayard, I. Housen // *FEBS Open Bio*. – 2013. – Vol. 3. – P. 467-472.
10. Kovaleva T. A. Study of the structural features of inulinases from various producers using IR spectrophotometry / T. A. Kovaleva, M. G. Holyavka // *Vopr. Biol. Med. Farm. Khim*. – 2011. – No 1. – P. 3-7.
11. Redondo-Cuenca A. Inulin extraction from common inulin-containing plant sources / A. Redondo-Cuenca, S. E. Herrera-Vázquez, L. Condezo-Hoyos, E. Gómez-Ordóñez, P. Rupérez // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 170. – P. 113726.
12. Meng Q. Efficient biosynthesis of exopolysaccharide from Jerusalem artichoke using a novel strain of *Bacillus velezensis* LT-2 / Q. Meng, C. Lu, H. Gao, G. Chen, L. Wu, J. Wu, S. Li, B. F. He // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 320. – P. 124346.
13. Zhang L. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris* / L. Zhang, C. Zhao, W. Y. Ohta, Y. Wang // *Process Biochemistry*. – 2005. – Vol. 40. – No 5. – P. 1541-1545.
14. Corona R. I. Substrates' and products' inhibition in fructanase production by a new *Kluyveromyces marxianus* CF15 from *Agave tequilana* fructan in a batch reactor / R. Corona, A. Morales-Burgos, C. Pelayo, J. A. Arias, J. P. García-Sandoval // *Bioprocess and biosystems engineering*. – 2019. – Vol. 42. – P. 1779-1791.
15. Guzmán-Lagunes F. Production of polyhydroxybutyrate by coupled saccharification-fermentation of inulin / F. Guzmán-Lagunes, L. Martínez-dlCruz, P. Wongsirichot, J. Winterburn, C. Montiel // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2023. – P. 1-11.
16. Germec M. Predicting the experimental data of the substrate specificity of *Aspergillus niger* inulinase using mathematical models, estimating kinetic constants in the Michaelis-Menten equation, and sensitivity analysis / M. Germec, I. Turhan // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2021. – Vol. 13. – P. 10641-10652.
17. Germec M. Effect of pH control and aeration on inulinase production from sugarbeet molasses in a bench-scale bioreactor / M. Germec, I. Turhan // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2021. – Vol. 13. – P. 4727-4739.
18. Das D. Optimization of inulinase production by a newly isolated strain *Aspergillus flavus* var. *flavus* by solid state fermentation of *Saccharum arundinaceum* / D. Das, R. Selvaraj, M. R. Bhat // *Biocatalysis and agricultural Biotechnology*. – 2019. – Vol. 22. – P. 101363.
19. da Silva W. B. Optimization strategy for inulinase production by *Aspergillus niger* URM5741 and its biochemical characterization, kinetic/thermodynamic study, and application on inulin and sucrose hydrolysis / W. B. da Silva, T. S. Porto, S. P. da Silva, R. L. de Oliveira // *3 Biotech*. – 2023. – Vol. 13. – No 11. – P. 376.
20. Kovaleva T. A. The effect of mannose and N-acetylglucosamine on the enzymatic activity of inulinase / T. A. Kovaleva, M. G. Holyavka, M. I. Kalashnikova, D. A. Slivkin // *Tekhnol. Zhivikh Sistem*. – 2011. – Vol. 8. – No 1. – P. 60-63.
21. Coleman R. G. Finding and characterizing tunnels in macromolecules with application to ion channels and pores / R. G. Coleman, K. A. Sharp // *Biophysical journal*. – 2009. – Vol. 96. – No 2. – P. 632-645.
22. Marques S. Role of tunnels and gates in enzymatic catalysis / S. Marques, J. Brezovsky, J. Damborsky // *Understanding Enzymes: Function, Design, Engineering, and Analysis*. – 2016. – P. 421-463.
23. Pravda L. Anatomy of enzyme channels / L. Pravda, K. Berka, R. Svobodová Vařeková, D. Sehnal, P. Banáš, R. A. Laskowski, J. Koča, M. Otyepka // *BMC bioinformatics*. – 2014. – Vol. 15. – No 1. – P. 1-8.
24. Kokkonen P. Engineering enzyme access tunnels / P. Kokkonen, D. Bednar, G. Pinto, Z. Prokop, J. Damborsky // *Biotechnology advances*. – 2019. – Vol. 37. – No 6. – P. 107386.
25. Makin S. M. The Specificity of Interactions between Endoinulinase from *Aspergillus ficuum* and Mono-, Di-, and Polysaccharides / S. M. Makin, A. N. Dubovitskaya, D. Yu. Bogomolov, M. S. Kondratyev, M. G. Holyavka, and V. G. Artyukhov // *Biophysics*. – Vol. 68. – No 5. – P. 892-899.
26. Holyavka M. G. In silico design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase / M. G. Holyavka, M. S. Kondratyev, A. A. Samchenko, A. V. Kabanov, V. M. Komarov, V. G. Artyukhov // *Computers in biology and medicine*. – 2016. – Vol. 71. – P. 198-204.