



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.15:547.963.32

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11692

Об особенностях строения активного центра и четвертичной структуры инулиназы

Владимир Федорович Селеменев¹✉, Ирина Викторовна Шкутина²,
Наталья Владимировна Мироненко¹, Наталья Анатольевна Беланова¹,
Лилия Александровна Синяева¹, Анастасия Алексеевна Беланова³,
Людмила Николаевна Коломиец⁴

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, common@chem.vsu.ru✉

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

³Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

⁴Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва, Россия

Аннотация. В настоящее время многие исследователи стали обращать внимание на то, что не только традиционные сорбенты и ионообменники, но и ряд природных компонентов, содержащихся в растительных и животных организмах, обладают способностью поглощать другие органические молекулы и ионы, вступать в реакции комплексообразования с ионами металлов, проявлять каталитические свойства. К таким природным веществам, обладающим сорбционными и ионообменными свойствами, можно отнести аминополисахариды (хитин, хитозан), нуклеиновые и рибонуклеиновые кислоты, сапонины, ферменты. Приведенный перечень веществ можно отнести к высокомолекулярным соединениям, обладающим сорбционными, лигандными и каталитическими свойствами. В настоящей работе приводятся результаты исследования функциональных групп активного центра инулиназы и особенностей ее четвертичной структуры. Установлено, что фермент имеет четвертичную структуру, представленную двумя субъединицами с M_r 76900 Да и 10140 Да, обладающими каталитической активностью. В образовании фермент-субстратного комплекса принимают участие имидазольный радикал гистидина, SH-группы и карбоксильные группы. Целью данной работы явилось изучение функциональных групп активного центра и некоторых особенностей четвертичной структуры инулиназы.

В настоящей работе использован препарат инулиназы, выделенной из *Aspergillus awamori* Ц2250, очищенный методом ионообменной хроматографии на колонках с диэтиламиноэтилцеллюлозой (ДЭАЭ): $[-O-(CH_2)_2-N(C_2H_5)_2]$. Гомогенность препарата была подтверждена методом гель-электрофореза. Каталитическая активность инулиназы определялась на субстрате инулине (Spofa, Чехия) спектрофотометрически с помощью резорцина при $\lambda=540$ нм, а молекулярная масса – методом гель-хроматографии на Сефадексе G-200. Наличие электрофильных групп COO- устанавливали по методу Диксона, а также методом ИК-спектроскопии на приборе Vertex-70 в интервале частот 4000-400 cm^{-1} .

В состав активного центра фермента входят γ и δ -карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно. Ион водорода H^+ отщепляется от карбоксильной группы глутаминового остатка фермента и связывается с кислородом, соединяющим кольца А и Б субстрата. В результате связь кислорода с кольцом разрывается, а углерод, находящийся в положении I кольца А, образует карбониевый ион, который стабилизируется COO- группой аспарагинокислого остатка фермента. С карбониевым ионом взаимодействует OH-ион, доставляемый молекулой воды, а H^+ -ион воды фиксируется на место H^+ -иона, потерянного глутаминокислым остатком в инулиназе. После этого молекулы инулина покидают фермент, освобождая его для последующей реакции с субстратом. Однако данный механизм не является единственным. В образовании фермент-субстратного комплекса также



принимает участие имидазол гистидина. При взаимодействии с инулином имидазольная группа связывается водородной связью с кислородом, соединяющим кольца А и Б субстрата. Происходит также ориентация COO^- иона фермента относительно образующегося карбониевого иона в кольце А. В последующем ионы H^+ и OH^- из молекул воды фиксируются в инулиназе на место H^+ , потерянного Glu, а OH^- на карбониевом ионе инулина.

Ключевые слова: инулиназа, фермент, структура, ИК-спектроскопия.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект FZGU-2023-0009.

Для цитирования: Селеменев В.Ф., Шкутина И.В., Мироненко Н.В., Беланова Н.А., Синяева Л.А., Беланова А.А., Коломиец Л.Н. Об особенностях строения активного центра и четвертичной структуры инулиназы // *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2023. T. 23, № 5. С. 741-752.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11692>

Original article

Structural features of the active centre and quaternary structure of inulinase

Vladimir F. Selemenev¹✉, Irina V. Shkutina²,
Natalia V. Mironenko¹, Natalia A. Belanova¹, Liliya A. Sinyayeva¹,
Anastasiya A. Belanova³, Lyudmila N. Kolomiets⁴

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, common@chem.vsu.ru✉

²St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg

³Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia

⁴Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Now many researchers started to pay attention to the fact that not only traditional sorbents and ion exchangers, but also a number of natural components contained in plant and animal organisms have the ability to absorb other organic molecules and ions, enter into complex formation reactions with metal ions, and exhibit catalytic properties. Such natural substances with sorption and ion-exchange properties include aminopolysaccharides (chitin, chitosan), nucleic and ribonucleic acids, saponins, and enzymes. The provided list of substances can be classified as high-molecular compounds with sorption, ligand and catalytic properties. This study presents the results of the investigation of the functional groups of the active centre of inulinase and the features of its quaternary structure. It was established that the enzyme has a quaternary structure, represented by two subunits with Mr 76900 Da and 10140 Da, which have catalytic activity. The imidazole radical of histidine, SH groups and carboxyl groups take part in the formation of the enzyme-substrate complex. The purpose of this study was investigation of the functional groups of the active centre and some features of the quaternary structure of inulinase.

In this study, we used a preparation of inulinase isolated from *Aspergillus awamori* Ts2250, purified by ion exchange chromatography on columns with diethylaminoethylcellulose (DEAE): $[-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]$. The homogeneity of the drug was confirmed by gel electrophoresis [24-25]. The catalytic activity of inulinase was determined on the substrate inulin (Spofa, Czech Republic) spectrophotometrically using resorcinol at $\lambda = 540$ nm, and the molecular weight was determined by gel chromatography on Sephadex G-200. The presence of electrophilic groups COO^- was determined using the Dixon method [28], and also by IR spectroscopy on a Vertex-70 device (Bruker, Germany) in the frequency range $4000-400$ cm^{-1} .

The active centre of the enzyme includes γ and δ -carboxyl groups of aspartic and glutamic acid residues, respectively. Hydrogen ion H^+ splits off from the carboxyl group of the glutamine residue of the enzyme and binds to oxygen connecting rings A and B of the substrate. As a result, the oxygen bond with the ring is broken, and the carbon located in position I of ring A forms a carbonium ion, which is stabilized by COO^- group of the aspartic acid residue of the enzyme. An OH^- ion delivered by a water molecule interacts with carbonium ion, and H^+ ion of water is fixed in the place of H^+ ion lost by the glutamic acid residue in inulinase. After this, inulin molecules leave the enzyme, freeing it for subsequent reaction with the substrate. However, this mechanism is not the only one. Histidine imidazole also takes part in the formation of the enzyme-substrate complex. When interacting with inulin, the imidazole group is hydrogen bonded to the oxygen connecting rings A and

B of the substrate. There is also an orientation of the COO⁻ ion of the enzyme ion relative to the resulting carbonium ion in ring A. Subsequently, H⁺ and OH⁻ ions from water molecules are fixed in inulinase in place of H⁺, lost Glu, and OH⁻ is fixed on the carbonium ion of inulin.

Keywords: inulinase, enzyme, structure, IR spectroscopy.

Acknowledgments: the study was supported by the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the state assignment to universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project FZGU-2023-0009.

For citation: Selemenov V.F., Shkutina I.V., Mironenko N.V., Belanova N.A., Sinyaeva L.A., Belanova A.A., Kolomiets L.N. Structural features of the active centre and quaternary structure of inulinase. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(5): 741-752. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11692>

Введение

В настоящее время многие исследователи стали обращать внимание на то, что не только традиционные сорбенты и ионообменники, но и ряд природных компонентов, содержащихся в растительных и животных организмах, обладают способностью поглощать другие органические молекулы и ионы, вступать в реакции комплексообразования с ионами металлов, проявлять каталитические свойства. К таким природным веществам, обладающим сорбционными и ионообмен-

ролаза, КФ 3.2.1.7), которая способна отщеплять фруктозные остатки с нередуцирующего конца молекулы инулина.

Фермент инулиназа найден в растениях и микроорганизмах (бактериях, грибах, дрожжах) [7-8]. Из грибов *Penicillium* выделено три вида инулиназы, имеющих молекулярные массы 86000, 69000 и 66000 Да. По данным [9-14] активаторами фермента являются ионы Co²⁺ и Mn²⁺, ингибиторами – ионы Hg²⁺, Fe³⁺.

Инулиназа гидролизует инулин (рис.1) – полисахарид растений, состоящий из остатков D-фруктозы (около 95%) и

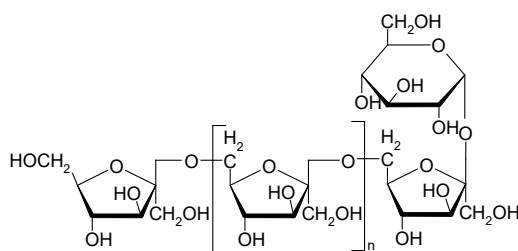


Рис. 1. Структурная формула инулина

Fig. 1. Structural formula of inulin

ными свойствами, можно отнести аминокислоты (хитин, хитозан), нуклеиновые и рибонуклеиновые кислоты, сапонины, ферменты. Приведенный перечень веществ можно отнести к высокомолекулярным соединениям, обладающим сорбционными, лигандными и каталитическими свойствами [1-3]. В частности, ферменты обладают как сорбционными свойствами, так и уникальной способностью вступать во взаимодействие с ионами металлов и проявлять высокую каталитическую активность [4-6]. Одним из таких ферментов является инулиназа (инулаза, 2,1-β-D-фруктан-фруктаногид-

D-глюкозы (около 5%) и представляющий собой неразветвленную цепь из 32-45 фруктанфуранозных фрагментов, соединенных β-2,1-гликозидными связями [15-17], к редуцирующему концу которой присоединена D-глюкопираноза через полуацетальный гидроксил.

Препарат инулиназы, полученный из штамма *Chrysosporium pahhor* АНИ 97000 [8], характеризуется молекулярной массой 58000 Да, изоэлектрической точкой pI=3.8, оптимальной активностью в диапазоне pH=6.8-7.0 при температуре 50°C.

В работах [8, 15] было сделано предположение о механизме ферментативного

Таблица 1. Аминокислотный состав инулиназы

Table 1. Amino acid composition of inulinase

Аминокислоты	Содержание аминокислот в белке, %
Глутаминовая кислота	15.53
Аспарагиновая кислота	11.49
Серин	8.02
Лейцин	6.97
Аргинин	6.49
Треонин	6.31
Глицин	6.29
Лизин	5.61
Аланин	5.59
Пролин	4.92
Тирозин	4.91
Фенилаланин	4.81
Валин	4.24
Изолейцин	3.77
Гистидин	3.38
Цистин	1.07
Метионин	0.60

действия инулиназы. Однако, в ряде публикаций [18-23] данные о структуре и строении активного центра фермента представлены весьма ограниченно. Поэтому целью данного сообщения явилось изучение функциональных групп активного центра и некоторых особенностей четвертичной структуры инулиназы.

Экспериментальная часть

В настоящей работе использован препарат инулиназы, выделенной из *Aspergillus awamori* Ц2250, очищенный методом ионообменной хроматографии на колонках с диэтиламиноэтилцеллюлозой (ДЭАЭ) – $[-O-(CH_2)_2-N(C_2H_5)_2]$.

Гомогенность препарата была подтверждена методом гель-электрофореза [24-25]. Каталитическая активность инулиназы определялась на субстрате инулине (Srofa, Чехия) спектрофотометрически с помощью резорцина при $\lambda=540$ нм, а молекулярная масса – методом гель-хроматографии на Сефадексе G-200 [26]. Аминокислотный состав фермента определяли путем гидролитического расщепления с последующим анализом на аминокислотном анализаторе ААА-339. Учитывая тот факт, что в состав активного

центра многих ферментов в качестве нуклеофильных групп входят -SH-группы цистеина и имидазольные группы гистидина [24-25, 27-28], в инулиназе проводили определение сульфгидрильных групп по модифицированной методике Бауэра и дисульфидных связей по [8, 15-17, 24-29], определение имидазольных групп осуществляли фотоокислением в 0.1 М ацетатном буфере (рН=4.7 в присутствии 50 мкМ метиленового синего) лампой дневного света на расстоянии 15 см. Наличие электрофильных групп СОО- устанавливали по методу Диксона [28], а также методом ИК-спектроскопии на приборе Vertex-70 (Bruker, Германия) в интервале частот $4000-400$ см⁻¹ [30].

Обсуждение результатов

Данные по исследованию аминокислотного состава фермента (табл. 1) показывают, что инулиназа содержит преимущественно полярные аминокислотные остатки (аспарагиновые и глутаминовые), а также имеет в своем составе имидазольные (гистидиновые) и S-S-группы (цистиновые).

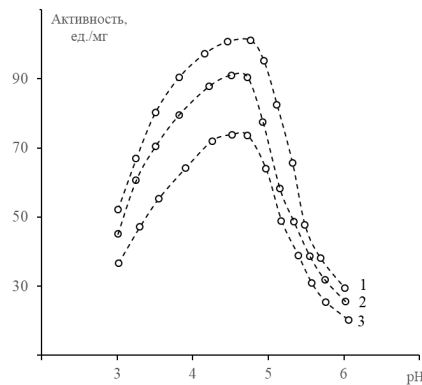


Рис. 2. Влияние рН субстрата на каталитическую активность инулиназы при различных концентрациях инулина: 1 – $5 \cdot 10^{-7}$ М; 2 – $4 \cdot 10^{-7}$ М; 3 – $3 \cdot 10^{-7}$ М.

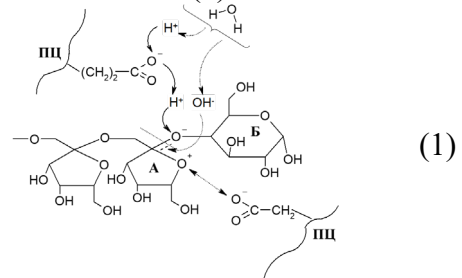
Fig. 2. The influence of substrate pH on the catalytic activity of inulinase at different inulin concentrations: 1 – $5 \cdot 10^{-7}$ M; 2 – $4 \cdot 10^{-7}$ M; 3 – $3 \cdot 10^{-7}$ M.

Следует заметить, что оптимальными условиями для функционирования фермента являются температура 50°C и концентрация инулина $5 \cdot 10^{-4}$ М. Однако, исследуемый фермент сохранял 22% активности даже при 70°C , что свидетельствует о его термостабильности [7, 27-28]. Анализируя зависимость скорости реакции катализа от рН среды, можно отметить, что наблюдается присущая многим ферментам [17, 24, 28] (рис. 2) колоколообразная кривая с максимумом при рН=4.7, сохраняющая форму при работе с различными концентрациями субстрата.

Заслуживает внимания тот факт, что в кислой области кривая имеет более пологий подъем, чем в щелочной. Подобное явление может свидетельствовать о том, что присутствие H^+ -ионов влияет на: а) протолиз функциональных групп активного центра; б) структуру каталитического центра инулиназы. Поэтому первоначально было исследовано влияние концентрации фермента на его активность при различных рН и определены значения основных кинетических параметров – K_m и V_{max} (табл. 2).

Графическая обработка экспериментальных данных в координатах $\lg V_{max}$, $\lg K_m$ и $\lg(V_{max}/K_m)$ от значений рН (рис. 3) позволила определить константы протолиза функциональных групп активного центра инулиназы (pK_{E1} и pK_{E2}).

Можно полагать, что в состав активного центра фермента входят γ и δ -карбоксыльные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно. В этом случае предполагаемый механизм действия инулиназы можно представить схемой (1):



Предполагается, что ион водорода H^+ отщепляется от карбоксыльной группы глутаминового остатка (Glu) I фермента и связывается с кислородом, соединяющим кольца А и Б субстрата (ПЦ-пептидные цепи инулиназы). В результате связь кислорода с кольцом разрывается, а углерод, находящийся в положении I кольца А, образует карбониевый ион, который стабилизируется COO^- -группой аспарагинокислого остатка (Asp) II. С карбониевым ионом взаимодействует OH^- -ион, доставляемый молекулой воды, а H^+ -ион воды фиксируется на место H^+ -иона, потерянного глутаминокислым остатком в инулиназе. После этого молекулы инулина покидают фермент, освобождая его для последующей реакции с субстратом. Однако, данные табл. 3 свидетельствуют,

Таблица 2. Величины константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости (V_{max}) для реакции гидролиза инулина

Table 2. The values of the Michaelis constant (K_m) and maximum rate (V_{max}) for the hydrolysis reaction of inulin

pH	$K_m \cdot 10^{-7}$, М	V_{max} , мкМ/(мг·мин)
3.0	2.96±0.09	65.80±1.06
3.5	2.19±0.1	120.18±0.07
4.0	2.19±0.01	135.14±1.0
4.5	2.01±0.1	135.45±1.36
4.7	1.86±0.06	136.90±0.5
5.0	3.00±0.06	135.30±1.1
5.5	2.79±0.2	100.69±1.5
6.0	3.47±0.2	42.30±4.08

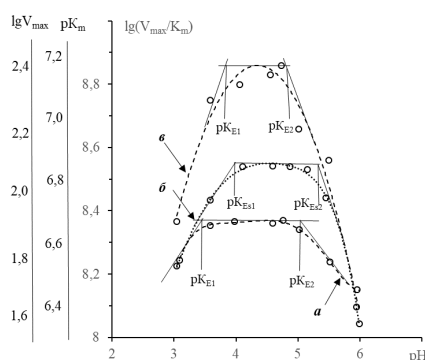


Рис. 2. Изучение pH-зависимостей ферментативной реакции гидролиза инулина:
 а – изменение lgV_{max} от pH; б – изменение pK_m от pH; в – изменение lgV_{max}/K_m от pH.

Fig. 3. Study of pH dependencies of the enzymatic reaction of inulin hydrolysis:
 a – change of lgV_{max} from pH; b – change of rK_m from pH; c – change of lgV_{max}/TO_m from pH.

что механизм (2) не является единственным.

Результаты по фотоокислению гистиридиновых радикалов инулиназы в присутствии метиленового синего позволяют утверждать, что в образовании фермент-субстратного комплекса принимает участие имидазол гистидина [27-28]. Возможный вариант такого взаимодействия можно представить схемой (2).

Карбоксильная группа Glu и имидазольная группа His ассоциированы в инулиназе водородной связью (I). Наличие таких ассоциатов подтверждается полосой при 2597 см^{-1} , характерной для водородных связей между $\equiv\text{N}\cdots\text{H}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ в системе имидазол-карбоксильная группа [30-31]. При взаимодействии с инулином (II) имидазольная группа связывается во-

дородной связью с кислородом, соединяющим кольца А и Б субстрата. Происходит также ориентация COO^- иона фермента относительно образующегося карбониевого иона в кольце А. В последующем ионы H^+ и OH^- из молекул воды фиксируются в инулиназе на место H^+ , потерянного Glu, а OH^- на карбониевом ионе инулина. Фермент снова принимает строение I.

Подобно гистиридиновому радикалу (схема 3) могут взаимодействовать с инулином и сульфгидрильные SH-группы фермента. Об этом свидетельствуют результаты табл. 3. При блокировании *n*-хлормеркурибензоатом SH-групп наблюдается инактивация фермента. В молекуле инулиназы содержится семь поверхностных и три глубинных группы SH-, обна-

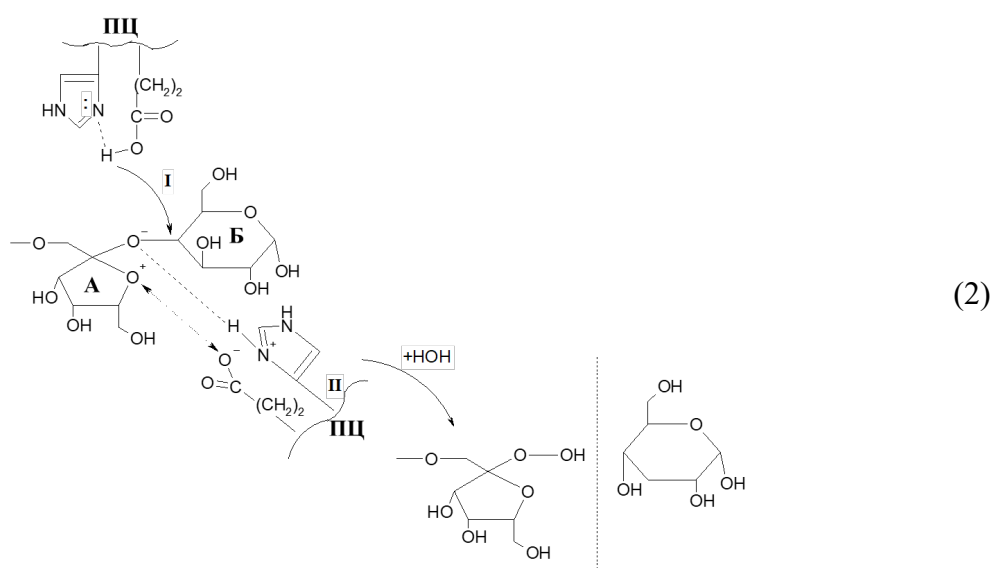


Таблица 3. Влияние фотоокисления в присутствии метиленового синего (МС) и блокирования SH-групп *n*-хлормеркурибензоатом (*n*-ХМБ) на каталитическую активность инулиназы

Table 3. Effect of photooxidation in the presence of methylene blue (MB) and blocking of SH groups *n*-chloromercuribenzoate (*n*-CMB) on the catalytic activity of inulinase

Концентрация инулина, $C \cdot 10^{-7} M$	Активность, ед/мг		
	Без МС	В присутствии МС	В присутствии <i>n</i> -ХМБ
1	48.50±1.2	0.04±0.001	0.02±0.001
2	72.68±0.6	0.04±0.004	0.08±0.001
3	87.50±0.9	0.04±0.005	0.1±0.003
4	97.20±0.5	0.04±0.005	0.1±0.002
5	102.00±0.7	0.06±0.001	0.1±0.003

руженные после обработки денатурирующими агентами (8М мочевины+10%-й раствор додецилсульфата натрия). На основании данных таблицы 3 можно полагать, что (как и в случае других тиолсодержащих ферментов) [26, 29] в гидролизе инулина участвуют совместно –SH, имидазольные нуклеофильные группы, а также карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Следует заметить, что конформационные изменения в ферменте приводят к вариациям его активности [26-28] и в ряде случаев помогают сделать выводы о структуре активного центра.

При инкубации инулиназы с додецилсульфатом натрия (рис. 4) при концентрациях $3.5 \cdot 10^{-4}$ - $3.5 \cdot 10^{-3}$ М имеет место ее полная денатурация. Воздействие $3.5 \cdot 10^{-6}$ М раствора додецилсульфата натрия приводит к увеличению полосы поглощения

при $\lambda=280$ нм по сравнению с контрольным раствором инулиназы. Можно полагать, что это вызвано разрывом или ослаблением водородных связей в пептидном остове фермента, и «спрятанные» радикалы ароматических аминокислот оказываются на внешней части молекулы инулиназы [26-28]. При использовании раствора додецилсульфата натрия с концентрацией $3.5 \cdot 10^{-5}$ М происходит расщепление полосы при 280 нм на 270 и 287 нм, что может быть обусловлено димерной конформацией инулиназы, а также влиянием различных хромофоров. Предположение о наличии двух субъединиц в молекуле фермента подтверждается данными, полученными гель-хроматографией (рис. 5) и ИК-спектроскопией (рис. 6).

Химизм процессов с участием ферментов в большинстве случаев связан с присоединением или выделением молекул

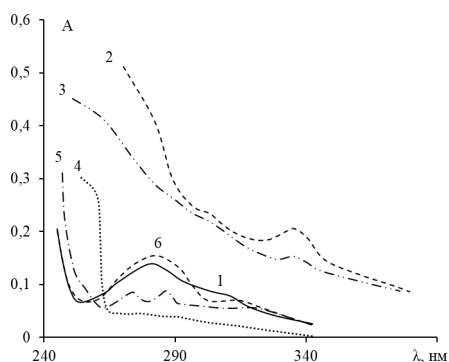


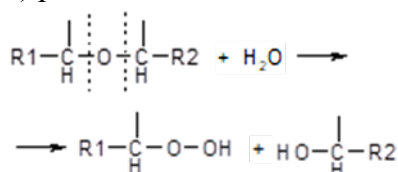
Рис. 4. УФ- спектры поглощения инулиназы при воздействии додецилсульфата натрия:

1, 2 – нативная инулиназа и $3.5 \cdot 10^{-4}$ М раствор додецилсульфата натрия; 3, 4, 5, 6 – фермент после воздействия $3.5 \cdot 10^{-3}$, $3.5 \cdot 10^{-4}$, $3.5 \cdot 10^{-5}$, $3.5 \cdot 10^{-6}$ М раствора додецилсульфата натрия соответственно.

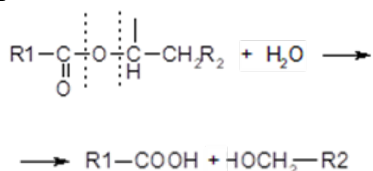
Fig. 4. UV absorption spectra of inulinase when exposed to sodium dodecyl sulphate: 1, 2 – native inulinase and $3.5 \cdot 10^{-4}$ M sodium dodecyl sulphate solution; 3, 4, 5, 6 – enzyme after exposure to $3.5 \cdot 10^{-3}$, $3.5 \cdot 10^{-4}$, $3.5 \cdot 10^{-5}$, $3.5 \cdot 10^{-6}$ M sodium dodecyl sulphate solution, respectively.

воды и преобразованием оксосоединений. Ферменты, относящиеся к группе гидролаз, относятся к кислотно-основным катализаторам, которые ускоряют следующие процессы [25, 30]:

а) расщепление гликозидной связи:



б) гидролиз сложноэфирных связей карбоновых кислот:



в) гидролиз пептидной связи:

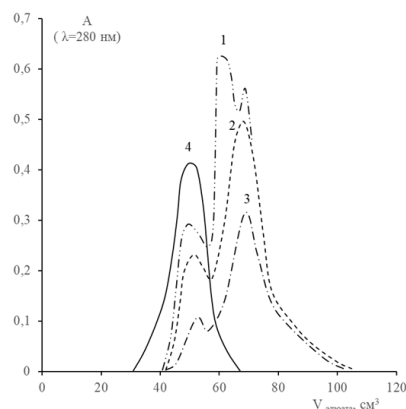
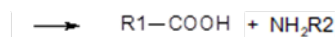


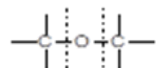
Рис. 5. Выходные кривые десорбции инулиназы из Сефадекса G-200 после воздействия на фермент различных концентраций додецилсульфата натрия:

1 – фермент после воздействия $3.5 \cdot 10^{-3}$ М, 2 – $3.5 \cdot 10^{-4}$ М; 3 – $3.5 \cdot 10^{-5}$ М; 4 – $3.5 \cdot 10^{-6}$ М соответственно.

Fig. 5. Desorption curves of inulinase from Sephadex G-200 after exposure of the enzyme to various concentrations of sodium dodecyl sulphate: 1 – enzyme after exposure to $3.5 \cdot 10^{-3}$ M, 2 – $3.5 \cdot 10^{-4}$ M; 3 – $3.5 \cdot 10^{-5}$ M; 4 – $3.5 \cdot 10^{-6}$ M accordingly.



Следовательно, возможно расщепле-

ние связи , которая соединяет пиранозное и фуранозное кольца активного центра фермента (схема 1). Характерной чертой рассматриваемого процесса является участие в нём не только ионов H^+ , но и ионов гидроксила OH^- . Присутствие последних в системе можно объяснить исключительно наличием молекул воды, диссоциирующих с образованием H^+ и OH^- -ионов [31]. Предложенная в работе схема 1 экспериментально подтверждается анализом ИК-спектров фермента (рис. 6).

Максимум в области 3468 см^{-1} , соответствующий колебаниям $\nu \text{ H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ с

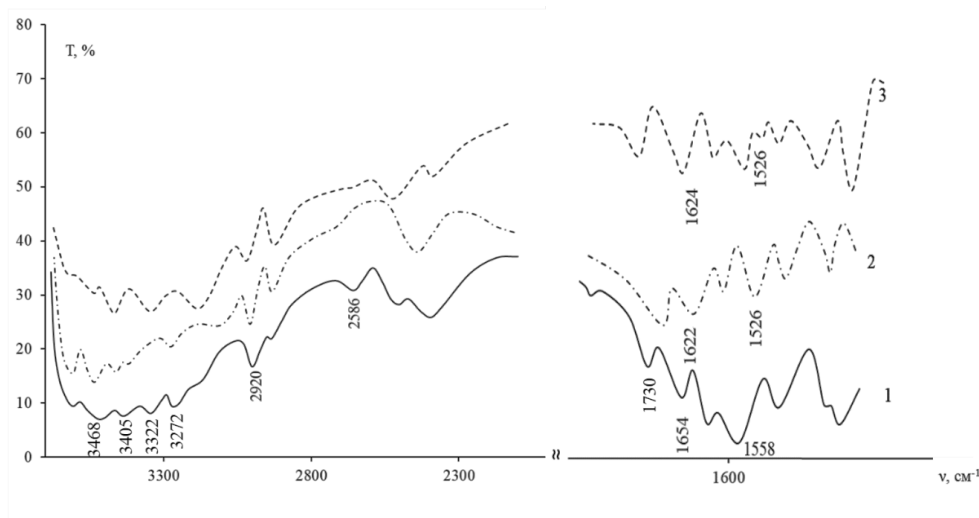


Рис. 6. ИК-спектры нативной инулиназы (1), субъединицы 1 (2) и субъединицы 2 (3).
 Fig. 6. IR spectra of native inulinase (1), subunit 1 (2) and subunit 2 (3).

2- и 3-мя водородными связями, смещается в длинноволновую область на 8 см^{-1} (по сравнению с литературными данными – 3460 см^{-1}) [30-32]. Полоса в ИК-спектре при 3405 см^{-1} , в отличие от литературных данных на – 3400 см^{-1} , характеризует валентные колебания $\nu \text{ H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ с 4-мя водородными связями [32-33]. Полоса поглощения 1657 см^{-1} (деформационные колебания $\sigma \text{ H}_2\text{O}$), смещается к 1654 см^{-1} [32-33]. Наблюдаемые смещения волновых чисел свидетельствуют об ослаблении водородных связей между молекулами воды.

Наряду с этим, усиливаются водородные связи между молекулами H_2O и COO^- : $\nu \text{ COO}^- \cdots \text{H}_2\text{O}$ (3272 см^{-1}), что соответствует смещению в коротковолновую область на 10 см^{-1} по сравнению с литературными источниками – 3282 см^{-1} [32-34]. Аналогичный эффект проявляется и для связи $\nu \text{ } \begin{matrix} \text{---C} \\ \text{---C} \end{matrix} \text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ (3322 см^{-1}), где имеет место коротковолновое смещение на 4 см^{-1} по сравнению с литературными данными (3326 см^{-1}) [30-33].

При воздействии $3.5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ раствора додецилсульфата натрия (рис. 5) наблюдается выход фермента одним пиком. Появление двух максимумов на хроматограмме имеет место с $3.5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ раство-

ром додецилсульфата натрия. Следовательно, для изучения четвертичной структуры инулиназы достаточной концентрацией является $3.5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ раствор реагента. Установлено, что четвертичная структура (табл. 4) фермента представлена двумя субъединицами с молекулярными массами 76900 и 10140, обладающими каталитической активностью меньшей, чем исходная инулиназа.

Следует отметить, что полученные ИК-спектры рассматриваемых субъединиц в значительной степени отличаются от ИК-спектров нативного фермента (рис. 6). Во-первых, максимум 2586 см^{-1} , характерный для водородных связей между атомом имидазольного цикла гистидина и COOH аспарагинового (или глутаминокислого) радикала с участием молекул воды, четко проявляется в ИК-спектре нативного фермента [30-31]. Однако в ИК-спектрах субъединиц 1 и 2 этот пик отсутствует. Последнее может свидетельствовать о том, что разрушение четвертичной структуры инулиназы сопровождается изменениями в ее вторичной и третичной структурах и, соответственно, приводит к нарушению активного центра (схема 3), в котором имидазольные и карбоксильные группы играют существенную роль (табл. 3). Об изменениях в полипептидных цепях исходного фермента

Таблица 4. Определение молекулярной массы и каталитической активности инулиназы и ее субъединиц

Table 4. Determination of the molecular weight and catalytic activity of inulinase and its subunits

Вещество	Внешний объем колонки, см ³	Объем элюата, см ³	Молекулярная масса	Каталитическая активность, ед/мг
Инулиназа исх.	27.5	48.9	87700	102.0±0.7
Субъединица 1		50.5	76900	3.2±0.2
Субъединица 2		75.0	10140	4.8±0.2

можно судить также по полосам Амид-I (1654 см⁻¹) и Амид-II (1558 см⁻¹), характерных для α-спирали в ферменте [30]. При переходе к субъединицам 1 и 2 можно наблюдать, что интенсивность рассматриваемых полос (по сравнению с исходным ферментом) уменьшается, но при этом возрастает интенсивность максимумов 1622 и 1526 см⁻¹, характерных колебаниям Амид-I и Амид-II в полипептидных фрагментах β-формы (почти вытянутые цепочки) [32]. Последнее соответствует конформационным изменениям в активном центре инулиназы.

Заключение

Таким образом, обсуждая полученные результаты можно говорить о том, что в

расщеплении гликозидных связей инулина важную роль играет электрофильно-нуклеофильная система карбоксил-имидазол. При этом роль нуклеофильной группы выполняет азот кольца имидазола, а роль электрофильной группы – COOH-группа глутаминокислого или аспарагинокислого радикала.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Zherebtsov N.A., Popova T.N., Artyukhov V.G. *Biokhimiya*. Voronezh, VGU, 2002, 696 p. (In Russ.)
2. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G. Issledovanie struktur nykhosobennostei inulinaz iz razlichnykh produktentov metodom IR-spektrofotometrii. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii*. 2011; 1: 3-7. (In Russ.)
3. Mironenko N.V., Selemenev V.F., Artyukhov V.G., Lavrinenko I.A. Saponiny. Voronezh, Izdatel'sko-poligraficheskii tsentr «Nauchnaya kniga», 2019, 205 p. (In Russ.)
4. Lenindzher A. *Biokhimiya*. Molekulyarnye osnovy struktury i funktsii kletki. M., Mir. 1976; 957 p. (In Russ.)
5. Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Grechkina M.V., Ostankova I.V., Artyukhov

V.G. Osobennosti struktury inulinaz razlichnogo proiskhozhdeniya. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2014; 1: 17-24. (In Russ.)

6. Tyukavkina N.A. *Bioorganicheskaya khimiya*. M., Drofa, 2004, 544 p. (In Russ.)

7. Ettalibi M. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. *Agric. Biol. Chem.* 1990; 54: 61-68.

8. Thannhauser T.W., Konishi Y., Scheraga H.A. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Analytical biochemistry*. 1984; 138(1): 181-188.

9. Singh R.S., Chauhana K., Kennedy J.F. A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 96: 312-322.



10. Treichel H., Oliveira D., Lerin L., Astolfi V., Mazutti M.A., Di Luccio M., Oliveira J.V. A review on the production and partial characterization of microbial inulinases. *Global Journal of Biochemistry*. 2012; 3: 1-13.
11. Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Polikarpov I. Crystal structure of exoinulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J. Mol. Biol.* 2004; 344 (11): 471-480.
12. Wen T., Liu F., Huo K., Li Y.-Y. Cloning and analysis of the inulinase gene from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS4857. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2003; 19: 423-426.
13. Adawiyah S.R., Shuhaimi M., MohdYazid A.M., Abdul Manaf A., Rosli N., Sreeramanan S. Molecular cloning and sequence analysis of an inulinase gene from an *Aspergillus sp.* *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 27: 2173-2185.
14. Ji Y., Zhao X. Purification and properties of inulinases from *Aspergillus niger* M89. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 1998; 38 (2): 120-125.
15. Shiomi N., Onodera S., Chatterton N.J., Harrison P.A. Separation of fructooligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. *Agric Biol Chem*. 1991; 55: 1427-1428.
16. Karrer P. Kurs organicheskoi khimii. Leningrad, Khimicheskaya literatura, 1962, 1216 p.
17. Kim K.Y. Role of the N-terminal domain of endoinulinase from *Arthrobacter sp.* S37 in regulation of enzyme catalysis. *J. Biochem.* 2005; 138: 27-33.
18. Ji Y., Zhao X. Purification and properties of inulinases from *Aspergillus niger* M89. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 1998; 38 (2): 120-125.
19. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G., Perpète E.A., Wouters J., Housen I., Michaux C. First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endoactivity. *Biochimie*. 2012; 94 (11): 2423-2430.
20. Gao J., Xu Y.Y., Yang H.M., Xu H., Xue F., Li S., Feng X.H. Gene cloning, expression, and characterization of an exoinulinase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014; 173: 1419-1430.
21. Zhang S., Yang F., Wang Q., Hua Y., Zhao Z.K. High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase. *Process Biochemistry*. 2012; 47: 151-155.
22. Wang L., Huang Y., Long X., Meng X., Liu Z. Cloning of exoinulinase gene from *Penicillium janthinellum* strain B01 and its high-level expression in *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 111: 1371-1380.
23. Kim K.Y., Rhee S., Kim S.I. Role of the N-terminal domain of endoinulinase from *Arthrobacter sp.* S37 in regulation of enzyme catalysis. *J. Biochem.* 2005; 138: 27-33.
24. Kushi R.T., Monti R., Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 2000; 25: 63-69.
25. Диксон М., Уэбб Е. Ферменты. Vol. 1. М., Мир, 1970, 252 p.
26. Детерман Г. Гель-хроматография. М., Мир, 1970, 252 p.
27. Mustafaev R.M. Avtoref. diss. kand. tekhn. nauk. Voronezh, 1991, 24 p.
28. Кеleti Т. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, 1990, 347 p.
29. Торчинский Ю.М. Сера в белках. М., Наука, 1977, 302 p.
30. Полторак О.М., Чухранов Е.С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М., Высшая школа, 1971, 360 p.
31. Тсундел' Г. Гидратация и межмолекулярное взаимодействие. М., Мир, 1972, 404 p.
32. Декхант И., Дантс Р. Инфракрасная спектроскопия полимеров. М., Химиya, 1976, 471 p.



33. Kazicina L.A., Kupletskaja N.B. *Primenenie UF-, IK- i JMR-spektroskopii v organicheskoy himii. M., Vysshaja shkola, 1971, 264 p. (In Russ.)*

34. Ugljanskaja V.A., Chikin G.A., Selemenev V.F., Zav'jalova T.A. *Infrakrasnaja spektroskopija ionoobmennyh materialov. Voronezh, Izd-vo VSU, 1989, 208 p. (In Russ.)*

Информация об авторах / Information about the authors

В.Ф. Селеменев – д.х.н., проф. каф. аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

И.В. Шкутина – к.б.н., доцент кафедры общей и медицинской химии им. проф. В.В. Хорунжего, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Н.В. Мироненко – к.х.н., ассистент каф. аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Н.А. Беланова – к.х.н., ст. преп. каф. аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Л.А. Синяева – к.х.н., ведущий инженер центра коллективного пользования научным оборудованием, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.А. Беланова – студент, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», Воронеж, Россия

Л.Н. Коломиец – к.х.н., старший научный сотрудник, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

V.F. Selemenev – DSc in chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: common@chem.vsu.ru

I.V. Shkutina – PhD in Biology, Associate Professor of the Department of General and Medical Chemistry named after Prof. V.V. Khorunzhy, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia, e-mail: irn55@mail.ru

N.V. Mironenko – PhD in Chemistry, Assistant Professor of the Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia, E-mail: natashamir@yandex.ru

A.A. Belanova – PhD in Chemistry, the assistant of the Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia; e-mail: belanovana@mail.ru

L.A. Sinyaeva – PhD in Chemistry, the senior engineer of the VSU Centre for the Collective Use of Scientific Equipment, Voronezh State University, Russia; e-mail: liliya.sinyaevavsu@mail.ru

A.A. Belanova – student, Burdenko Voronezh State Medical University, Russia, e-mail: anastasiyabelanova@mail.ru

L.N. Kolomiets – researcher, Ph.D. Frumkin Institute of Physical and Electrochemistry, Moscow, Russia; e-mail: kolom_moscow@mail.ru

Статья поступила в редакцию 15.06.2023; одобрена после рецензирования 30.08.2023; принята к публикации 06.09.2023.

The article was submitted 15.06.2023; approved after reviewing 30.08.2023; accepted for publication 06.09.2023.