



УДК 577.325:577.112

Исследование закономерностей процесса термической инактивации иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus*

Холявка М.Г., Ковалева Т.А., Волкова С.А.,
Артюхов В.Г., Наквасина М.А.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 30.06.2014 г.

Изучены закономерности процесса термической инактивации иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus*. Установлено, что в условиях инкубации инулиназы при 50 и 60°C фермент инактивируется постепенно, сохраняя соответственно 84 и 81% каталитической способности после 60-минутного прогревания образцов. Резкое уменьшение ферментативной активности препарата (на 60%) происходит после 40 минут инкубации при 70°C. При 80 и 90°C процесс инактивации инулиназы протекает еще более интенсивно: через 1 час сохраняется соответственно 15 и 7% от первоначальной активности энзима.

Продемонстрировано, что, несмотря на различие в закономерностях протекания процесса термической инактивации иммобилизованных инулиназ дрожжевого и растительного происхождения, адсорбция на ионообменных смолах и волокнах позволяет увеличить диапазон значений температурного оптимума их функционирования и повышает термоустойчивость препаратов, что расширяет горизонты их практического применения в фармацевтической, пищевой промышленности, а также в аналитической практике.

Ключевые слова: инулиназа, иммобилизация, термическая инактивация, ионообменная смола КУ-2

Research of regularities for process of the thermal inactivation of the immobilized inulinase from *Helianthus tuberosus*

Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Volkova S.A.,
Artyukhov V.G., Nakvasina M.A.

Voronezh State University, Voronezh

Inulinases (EC 3.2.1.7) participate in a carbohydrate metabolism of the higher plants and microorganisms. They can be used in cycles of sugars production with various extent of polymerization, in particular, of inulin, fructose and inulooligo-saccharides. Heat stability is the major selection criterion for enzymes of industrial value therefore research of regularities a thermal inactivation process of the inulinase from *Helianthus tuberosus* immobilized on KU-2 was the purpose of this work.

The fractions of protein from *Helianthus tuberosus* tubers with inulinase activity, immobilized on ion-exchange KU-2 pitch, were objects of research (activity of heterogeneous preparation was ~ 80%). Protein content was determined by Lowry method, catalytic activity of enzyme was measured by rezortsin method.

It is established that at 50 and 60 °C the incubation of an inulinase doesn't lead to saltatory changes in catalytic activity of a preparation, enzyme is inactivated gradually, keeping respectively 84% and 81% of

catalytic ability at 60-minute warming up of samples. After 40 minutes of incubation at 70 °C sharp reduction of catalytic activity of a sample, which decreases to 40% at 60-minute warming up, is observed. At 80 °C process of an inactivation happens more intensively and after 60 minutes only 15% of preparation activity remain. High loss of catalytic ability is carried out at 90 °C: after 10 minutes of enzyme incubation in buffer solution the percent of activity preservation makes 59%, and after 60 minutes there are only 7% of initial activity were.

Despite distinction in the regularities of course for process of a thermal inactivation of immobilized inulinases from fungi and plants, adsorption on ion-exchange pitches and fibers not only allows to increase value of a temperature optimum of their functioning, stabilizes conformation of molecules, but also protects spatial structure of enzymes, increasing heat stability of preparations. The adsorptive enzyme becomes stable in relation to denaturant factors of environment that expands the horizons of its application in the pharmaceutical, food industry, and in analytical practice.

Keywords: inulinase, immobilization, thermal inactivation, ion-exchange resin KU-2

Введение

Инулиназы (инулазы, 2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролазы, КФ 3.2.1.7) участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов. Они могут быть использованы в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, в частности, инулина, фруктозы и инулоолигосахаридов – неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения.

Температура является одним из ключевых экологических факторов, от которого зависит эффективность протекания всех физиологических процессов, поддерживающих жизнедеятельность и обеспечивающих функционирование биосистем. Такой параметр как термоустойчивость – важнейший критерий отбора для ферментов промышленного значения, поэтому целью работы было исследование закономерностей процесса термоинактивации иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus*.

В ряде наших работ показано, что для дрожжевой инулиназы, адсорбционно иммобилизованной на ВИОН КН-1, АВ-17-2П и КУ-2, температурный оптимум смещается в сторону более высоких значений с максимальной активностью при 70°C, что на 20°C выше, чем для нативного фермента [1-3]. Иммобилизованные на КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П препараты инулиназы из *Helianthus tuberosus* проявляют максимальную каталитическую способность в диапазоне температур 60-70 °C [4].

Эксперимент

Объектами исследования были фракции белка, выделенные из клубней *Helianthus tuberosus*, проявляющие инулиназную активность, иммобилизованные на ионообменной смоле КУ-2 (степень сохранения активности гетерогенного препарата составляла ~80 %). Подробно методики очистки препарата и его иммобилизации изложены в работах [4, 5]. В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP biomedical из корней цикория с молекулярной массой 5000 Да.

Содержание белка определяли методом Лоури, активность фермента измеряли спектрофотометрически резорциновым методом на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Россия) [6]. За единицу каталитической активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ фруктозы за 1 мин.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

Обсуждение результатов

С целью изучения воздействия различных температур на функциональные свойства молекул иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus* нами были проведены эксперименты по исследованию термостабильности данного препарата. Для этого растворы белков инкубировали в интервале времени 10-60 мин при различных температурах (50-90 °С) с последующим определением каталитической активности. На рис. показана динамика процесса инактивации иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus* (активность иммобилизованного фермента без предварительного нагревания была принята за 100 %).

Установлено, что при 50 и 60°С инкубация инулиназы не приводит к скачкообразным изменениям каталитической активности препарата, фермент инактивируется постепенно, сохраняя соответственно 84 и 81 % каталитической способности при 60-минутном прогревании образцов. После 40 минут инкубации при 70°С наблюдается резкое уменьшение каталитической активности образца, которая снижается до 40 % при 60-минутном прогревании. При 80°С процесс инактивации происходит интенсивнее и через 60 минут сохраняется лишь 15% активности препарата. Высокая потеря каталитической способности отмечается при 90°С: уже после 10 минут инкубации энзима в буферном растворе процент сохранения активности составляет 59%, а через 60 минут – лишь 7% первоначальной активности.

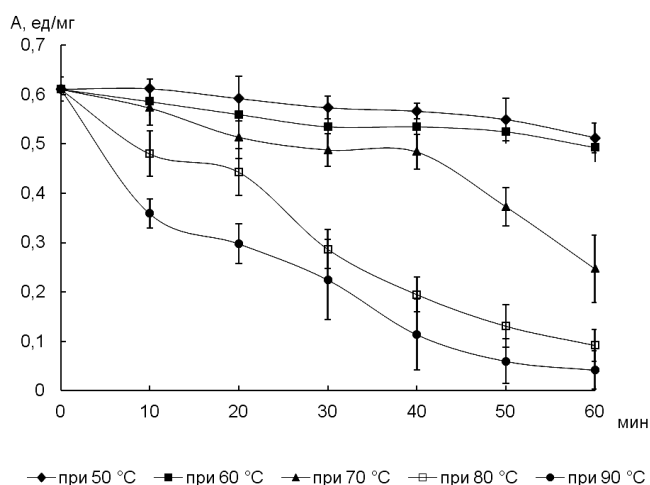


Рис. 1. Зависимость каталитической активности (А) иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus* от времени термической инактивации

Ранее нами был исследован процесс термической инактивации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 в свободном состоянии и после адсорбционной иммобилизации на катионнообменном волокне ВИОН КН-1. Показано, что инкубация свободного фермента при температурах от 30 до 37 °С в физиологическом растворе в отсутствие субстрата не подавляет ее каталитической способности. При 50 °С процесс инактивации происходит достаточно интенсивно и через 60 минут прогревания сохраняется лишь 33 % каталитической способности. Инкубация иммобилизованного препарата в течение 1 часа при температурах 50-80 °С не приводит к полной инактивации фермента, лишь нагревание раствора

при 90 °С в течение 60 минут лишает инулиназу способности гидролизовать инулин [7].

Заключение

Несмотря на различие в закономерностях протекания процесса термической инактивации иммобилизованных инулиназ дрожжевого и растительного происхождения, адсорбция на ионообменных смолах и волокнах не только позволяет увеличить диапазон значений температурного оптимума их функционирования, стабилизирует конформацию молекул [8-13], но также защищает пространственную структуру ферментов, повышая термоустойчивость препаратов. Адсорбционно-связанный энзим становится более стабильным по отношению к денатурирующим факторам внешней среды, чем фермент в свободном состоянии, что расширяет горизонты его применения в фармацевтической, пищевой промышленности, а также в аналитической практике.

*Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России
в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности
на 2014-2016 годы. Проект №1090*

Список литературы

1. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Takha A.S. Development of a Heterogenous Biocatalyst on the basis of Immobilized Inulinase Preparation from *Kluyveromyces marxianus* // *Biotechnology in Russia*. 2007. No 3. pp. 106-116.
2. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Takha A.S. Study on a Few Characteristics on Immobilized Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* as a Perspective Catalyst for Inulin Hydrolysis // *Biotechnology in Russia*. 2009. No 2. pp. 73-80.
3. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. Исследование иммобилизации инулиназы на ионогенных и неионогенных носителях // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7. Вып. 5. С. 804-810.
4. Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A. et al. Design of a heterogeneous enzymatic preparation on the basis of immobilized inulinase from *Helianthus tuberosus* // *Biotechnology in Russia*. 2012. No 6, pp. 31-41.
5. Холявка М.Г. Ковалева Т.А., Хрупина Е.А. и др. Разработка методики выделения и очистки инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* и анализ ее физико-химических и кинетических свойств // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 9. С. 43-52.
6. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987, 429 с.
7. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G. et al. Thermal Inactivation of Free and Immobilized Inulinase // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010. Vol. 46. No 4, pp. 385-389.
8. Холявка М.Г., Беленова А.С., Макарова Е.Л. и др. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 7. С. 29-36.
9. Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Bogdanova S.S. Inulinase Immobilization on Macroporous Anion-Exchange Resins by Different Methods // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009., Vol. 148. № 1. pp. 39-41.
10. Singh R.S., Dhaliwal R., Puri M. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. Vol. 17. No 5. pp. 733-738.
11. Kim B., Kim H., Nam S. Continuous production of fructose-syrups from inulin by

immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnol. Bioprocess Eng. 1997. Vol. 2. pp. 90-93.

12. Gupta A.K., Rathore P., Kaur N. et al. Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum* // J.

Chem. Technol. Biotechnol. 1990. Vol. 47. No 3. pp. 245-257.

13. Letca D., Hemmerling C., Walter M. et al. Immobilization of recombinant inulase II from a genetically modified *Escherichia coli* strain // Roum. Biotechnol. Lett., 2004. Vol. 9., No 5. pp. 1879-1886.

References

1. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Takha A.S. Development of a Heterogenous Biocatalyst on the basis of Immobilized Inulinase Preparation from *Kluyveromyces marxianus*, Biotechnology in Russia, 2007, No 3, pp. 106-116.

2. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Takha A.S. Study on a Few Characteristics on Immobilized Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* as a Perspective Catalyst for Inulin Hydrolysis, Biotechnology in Russia, 2009, No 2, pp. 73-80.

3. Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Takha A.S. Issledovanie immobilizatsii inulinazy na ionogennykh i neionogennykh nositelyakh [Research of inulinase immobilization on ionogenic and nonionogenic carriers], Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy, 2007, Vol. 7, No. 5, pp. 804-810.

4. Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A. et al. Design of a heterogeneous enzymatic preparation on the basis of immobilized inulinase from *Helianthus tuberosus*, Biotechnology in Russia, 2012, No 6, pp. 31-41.

5. Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A. et al. Razrabotka metodiki vydeleniya i ochistki inulinazy iz klubnei *Helianthus tuberosus* i analiz ee fiziko-khimicheskikh i kineticheskikh svoystv [Development of extraction and purification procedure for inulinase from *helianthus tuberosus* tubers and analysis of its physicochemical and kinetical properties], Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii, 2013, No 9, pp. 43-52.

6. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P. Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii [The methods of biochemical research of plants]. L.: Agropromizdat, 1987. 429 p.

7. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G. et al. Thermal Inactivation of Free and Immobilized Inulinase, Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, Vol. 46, no 4, pp. 385-389.

8. Kholyavka M.G., Belenova A.S., Makarova E.L., Kovaleva T.A., Artyukhov V.G. Immobilizatsiya gidrolaz kak odin iz putei regulirovaniya i stabilizatsii ikh aktivnosti [Immobilization of hydrolases as one of regulation ways and stabilization of their activity], Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii, 2013, No 7, pp. 29-36.

9. Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Bogdanova S.S. Inulinase Immobilization on Macroporous Anion-Exchange Resins by Different Methods, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2009, Vol. 148, No 1, pp. 39-41.

10. Singh R.S., Dhaliwal R., Puri M. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup, J. Microbiol. Biotechnol., 2007, Vol. 17, No 5, pp. 733-738.

11. Kim B., Kim H., Nam S. Continuous production of fructose-syrups from inulin by immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnol. Bioprocess Eng., 1997, Vol. 2, pp. 90-93.

12. Gupta A.K., Rathore P., Kaur N., Singh R. Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 1990, vol. 47, no 3, pp. 245-257.

13. Letca D., Hemmerling C., Walter M. et al. Immobilization of recombinant inulase II from a genetically modified *Escherichia coli* strain, Roum. Biotechnol. Lett., 2004. Vol. 9., No 5. pp. 1879-1886.

Холявка Марина Геннадьевна – к.б.н., старший научный сотрудник, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел.:+7(473)2208586

Ковалева Тамара Андреевна – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, доктор биологических наук, Воронежский государственный университет, Воронеж

Волкова Светлана Анатольевна – студентка, Воронежский государственный университет, Воронеж

Артюхов Валерий Григорьевич – д.б.н., зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, профессор, Воронежский государственный университет, Воронеж

Наквасина Марина Александровна – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Holyavka Marina G. – Senior researcher, Cand.Biol.Sci., Voronezh State University, Voronezh, e-mail: holyavka@rambler.ru

Kovaleva Tamara A. – Professor of biophysics and biotechnology department, doctor of biological science, Voronezh State University, Voronezh

Volkova Svetlana A. – student, Voronezh State University, Voronezh

Artyukhov Valeriy G. – Head of biophysics and biotechnology department, professor, doctor of biological science, Voronezh State University, Voronezh

Nakvasina Marina A. – Professor of biophysics and biotechnology department, doctor of biological science, Voronezh State University, Voronezh