

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АДсорбЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ИНУЛИНАЗЫ НА МАТРИЦАХ ИОНИТОВ АВ-17-2П И КУ-2**Холявка М.Г.<sup>1</sup>, Кондратьев М.С.<sup>2</sup>, Самченко А.А.<sup>2</sup>, Кабанов А.В.<sup>2</sup>, Комаров В.М.<sup>2</sup>, Артюхов В.Г.<sup>1</sup><sup>1</sup> Воронежский государственный университет  
*Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394006, РФ*<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН  
*ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ*  
*e-mail: marinaholyavka@yahoo.com*

**Аннотация.** Определены значения аффинностей связывания инулиназы с носителями для иммобилизации – фрагментами матриц ионообменных смол КУ-2 и АВ-17-2П. Исследованы условия и механизмы иммобилизации: в расчетных данных при формировании комплекса инулиназы с матрицей смолы КУ-2 значительную роль играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и водородные связи, анионит АВ-17-2П не образует с инулиназой водородных связей, а формирует только ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

Установлено, что, несмотря на значительное совпадение аминокислотных остатков в контактной области комплекса фермент-носитель, которое для катионита КУ-2 составляет 60 % от общего числа аминокислот, участвующих в формировании связей при иммобилизации, а для анионита – 47 % от их числа, механизмы процесса адсорбции инулиназы на матрицах положительно и отрицательно заряженных лигандов существенно отличаются друг от друга.

**Ключевые слова:** компьютерное моделирование, инулиназа, иммобилизация, молекулярный докинг, КУ-2, АВ-17-2П

**THE MOLECULAR MECHANISM OF THE ADSORPTION IMMOBILIZATION OF INULINASE ON MATRICES OF ION-EXCHANGERS AV-17-2P AND KU-2**Holyavka M.G.<sup>1</sup>, Kondratyev M.C.<sup>2</sup>, Samchenko A.A.<sup>2</sup>, Kabanov A.V.<sup>2</sup>, Komarov V.M.<sup>2</sup>, Artyukhov V. G.<sup>1</sup><sup>1</sup> Voronezh State University  
*Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394006, Russia*<sup>2</sup> Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Science  
*Institutskaya st., 3, Pushchino, 142290, Russia*  
*e-mail: marinaholyavka@yahoo.com*

**Abstract.** We study the conditions and mechanisms of immobilization of inulinase with immobilization carriers (fragments of matrices of ion-exchanger KU-2 and AV-17-2P) and find their binding affinities. The calculated data show a significant role played by van der Waals interaction and hydrogen bonds in forming complexes of inulinase with a matrix of KU-2 resin, while AV-17-2P doesn't form hydrogen binding with inulinase, but forms only van der Waals interaction.

It is established that, despite considerable coincidence of the amino acid in contact area of enzyme-carrier complex (which constitutes 60% of total number of the amino acids participating in the immobilization bond for KU-2 and 47% for AV-17-2P), mechanisms of adsorption of inulinase on positive and negatively charged ligand matrices significantly differ from each other.

**Key words:** computer modeling, inulinase, immobilization, molecular docking, KU-2, AV-17-2P

В настоящее время разработка технологии получения пищевых продуктов диабетического и профилактического назначения приобретает все большую актуальность. В связи с этим возрос интерес к фруктозе, которая может быть использована в диетическом питании больных сахарным диабетом. Фруктозу, как правило, получают из крахмала путем многостадийного процесса, включающего расщепление его до глюкозы с последующей обработкой глюкозы глюкозоизомеразой и хроматографическим разделением фруктозы и глюкозы. Перспективным направлением является получение фруктозы из растительного инулинсодержащего сырья, в особенности топинамбура. В клубнях топинамбура содержание инулина достигает 20-25 %, а сироп при этом содержит не менее 70 % фруктозы.

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7), расщепляющая инулин и другие фруктозосодержащие полимеры до фруктозы, широко распространена среди высших растений и микроорганизмов и может применяться для промышленного получения фруктозы из растительного сырья. Однако возможности применения ферментов ограничены, по крайней мере, двумя причинами. Во-первых, они неустойчивы при хранении, а также при различных, особенно тепловых, воздействиях. Во-вторых, многократное использование энзимов затруднено из-за сложности их отделения от реагентов и продуктов реакции. К тому же, достаточно трудно однозначно прогнозировать поведение энзима и кинетику реакции в промышленных ферментерах. Подобные затруднения можно преодолеть путем получения иммобилизованных на нерастворимых носителях ферментных препаратов.

Особое внимание исследователи уделяют проблемам подбора и модификации носителей, разработке методов иммобилизации, изучению кинетических аспектов катализа гетерогенными ферментными препаратами [1-12]. В нашей лаборатории эмпирическим путем были разработаны адсорбционный и ковалентный способы иммобилизации инулиназы на ряде синтетических катионитов и анионитов, позволяющие сохранить до

80-85 % активности нативного фермента [13, 14]. Однако, несмотря на множество практических разработок в области иммобилизации карбогидраз, молекулярные механизмы этого процесса до конца не изучены. Имеются лишь данные ИК-спектроскопии и электронной микроскопии комплексов фермент-носитель, которые не позволяют составить полную картину о типах, числе и длине связей и взаимодействиях внутри комплекса иммобилизованного ферментного препарата и матрицы носителя. Результаты рентгеноструктурного анализа и молекулярного докинга представлены в открытой печати лишь для комплексов карбогидраз и их низкомолекулярных лигандов. В связи с этим целью работы было выявление механизма процесса адсорбционной иммобилизации инулиназы на полимерных матрицах ионообменных смол КУ-2 и АВ-17-2П: расчет значений аффинности фермента по отношению к носителям для иммобилизации, определение числа, типов и длин связей и взаимодействий между молекулой инулиназы и носителем.

#### Материалы и методы.

В качестве модели фермента, ставшей мишенью для докинга, в банке данных Protein Data Bank (PDB) нами была выбрана структура инулиназы из *Aspergillus ficuum* (код молекулы: 3SC7), которая была получена методом рентгеновской дифракции в 2011 году с разрешением 1.5 Å, что вполне подходит для компьютерных расчетов методом гибкого докинга [15].

В процессе подготовки к расчетам данная модель была «очищена» от молекул воды и других веществ. Важно отметить, что эта инулиназа была кристаллизована вместе с некоторыми органическими лигандами, в том числе с D-маннозой, которая является активатором фермента [16]. Известное местоположение этого сахара на поверхности фермента дало нам возможность прокалибровать выбранный пакет для докинга (Autodock VINA) на вполне конкретном примере комплекса маннозы и инулиназы. Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белка, а также выбрана ячейка для расчета докинга, размеры которой составили 68x58x60 Å. Центр молекулы белка (которая рассматривалась в жесткой форме) находился в точке с координатами ( $x = 37.044$ ;  $y = -36.997$ ;  $z = -5.365$ ). Эти же данные для мишени использовались нами и для последующих расчетов выбранного набора лигандов.

По результатам докинга, предсказанное программой место взаимодействия смоделированного лиганда хорошо согласуется с экспериментально установленной локализацией маннозы. Аффинность такого связывания составила  $-4,5$  ккал/моль.

Для полимеров была выбрана длина цепочки в 5 звеньев. Каждый из лигандов в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Заряды на молекуле лиганда расставлялись автоматически – в пакете MGLTools 1.5.6.rc3.

Объектами для проведения экспериментов были инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus*, гомогенные фракции которых получали в лаборатории кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета [17].

В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP biomedical, выделенный из цикория (молекулярная масса порядка 5000 дальтон). В качестве синтетических носителей для иммобилизации применяли ионообменные смолы КУ-2 и АВ-17-2П, подробное описание которых дано в работах [13, 18]. Для гидролиза субстрата мы использовали термостатируемый стеклянный реактор. Температура гидролиза – 70 °С, pH 4,5 [16].

Содержание белка в пробах определяли методом Лоури [19]. Каталитическую активность фермента измеряли спектрофотометрически резорциновым методом [16]. За единицу каталитической активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ фруктозы за 1 мин.

#### Результаты и их обсуждение.

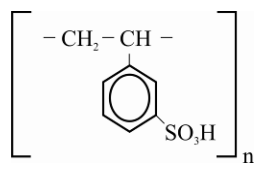
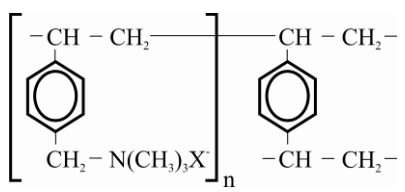
Выявленная нами в расчетах локализация мест связывания матриц для иммобилизации инулиназы дает объяснение крайне низкому снижению уровня каталитической активности фермента при связывании с подложкой: места сорбции инулиназы не затрагивают активный центр фермента, и даже, возможно, в некоторой степени ориентируют макромолекулу, более эффективно экспонируя ее активный центр к субстрату.

Расчетные значения аффинности носителей по отношению к инулиназе и экспериментально определенный процент сохранения активности фермента при иммобилизации представлены в таблице.

Ранее нами было установлено непосредственное участие сульфогруппы в процессе сорбции инулиназы на матрице КУ-2. Определенный вклад в формирование комплекса фермент-носитель вносят водородные связи [20]. Расчеты показали, что сульфогруппы катионита КУ-2 образуют две водородные связи с остатком Asn 42 (3.06 и 3.22 Å) и одну водородную связь с остатком Gly 68 (3.05 Å). Кроме того, формируется ряд ван-дер-ваальсовых взаимодействий между сульфогруппами и углеродной матрицей носителя и остатками Trp 40, Glu 43, Asn 61, Val 66, Trp 67, Glu 97, Phe 99, Tyr 128, Arg 175, Asn 176, Glu 233, Val 318, Gly 323.

Расчеты показали, что между молекулой инулиназы и матрицей АВ-17-2П присутствуют только ван-дер-ваальсовы взаимодействия, причем в образовании этих взаимодействий со стороны носителя участвуют как атомы углерода, так и атомы азота, а со стороны белка – аминокислотные остатки Trp 40, Asn 42, Glu 43, Gln 59, Trp 67, Glu 97, Phe 99, Tyr 128, Thr 130, Gln 133, Val 166, Glu 233, Val 234, Thr 255, Asn 265, Asp 298, Asn 320, Gly 323, Lys 332.

Таблица 1 – Значения аффинности и процента сохранения активности инулиназы при иммобилизации

Носитель	Структура элементарного звена	Аффинность, ккал/моль	Процент сохранения активности инулиназы	
			из <i>Kluyveromyces marxianus</i> [13, 16]	из <i>Helianthus tuberosus</i> [18]
КУ-2, катионит		-7.3	61.7	80.4
АВ-17-2П, анионит		-6.8	75.5	22.5

Следует отметить, что многие аминокислотные остатки на поверхности инулиназы (в частности, Trp 40, Asn 42, Gln 43, Trp 67, Glu 97, Phe 99, Tyr 128, Gly 233, Gly 323) формируют контактную область при сорбции фермента как на катионите КУ-2 (9 совпадающих с анионитом аминокислотных остатков из 15 остатков в составе контактной области), так и на анионите АВ-17-2П (9 совпадающих с катионитом аминокислотных остатков из 19 остатков в составе контактной области).

#### Заключение.

В процессе исследования на модели фермента инулиназы, а также моделях ее лигандов – фрагментах матриц для иммобилизации КУ-2 и АВ-17 2П, были определены значения аффинностей связывания фермента с носителем.

Установлено, что, несмотря на значительное совпадение аминокислотных остатков в контактной области комплекса фермент-носитель, которое для катионита КУ-2 составляет 60 % от общего числа аминокислот, участвующих в формировании связей при иммобилизации, а для анионита – 47 % от их числа, механизмы процесса адсорбции инулиназы на матрицах положительно и отрицательно заряженных лигандов отличаются друг от друга.

Приведенные в статье материалы могут быть использованы для более глубокого изучения молекулярных механизмов взаимодействия инулиназы с матрицей ряда синтетических ионитов; их необходимо принимать во внимание при разработке новых способов оценки и регулирования структурного состояния белковых молекул в условиях их иммобилизации на различных типах носителей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-33-50037 мол\_нр.

#### Список литературы / References:

1. Letca D., Hemmerling C., Walter M., Wullbrandt D., Buchholz K. Immobilization of recombinant inulase II from a genetically modified *Escherichia coli* strain. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 2004, vol. 9, no. 5, pp. 1879-1886.
2. Makino Y., Lima P.S., Filho F.M., Rodrigues M.I. Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on Streamline DEAE resin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2005, vol. 22, no. 4, pp. 539-545.
3. Barranco-Florido E., Garcia-Garibay M., Gomez-Ruiz L., Azaola A. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cell in barium alginate for inulin hydrolysis. *Process Biochemistry*, 2001, vol. 37, no. 5, pp. 513-519.
4. Kalil S.J., Maugeri F., Rodrigues M.I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, pp. 581-586.
5. Singh R.S., Dhaliwal R., Puri M. Production of high fructose syrup from *Asparagus* inulin using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol. 34, no. 10, pp. 649-655.
6. Manso J., Mena M.A., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M. Bionzyme amperometric biosensor using gold nanoparticle-modified electrodes for the determination of inulin in foods. *Anal. Biochem.*, 2008, vol. 375, no. 2, pp. 345-353.
7. Trytek M., Fiedurek J., Podkościelna B., Gawdzik B., Skowronek M. An efficient method for the immobilization of inulinase using new types of polymers containing epoxy groups. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 42, no. 7, pp. 985-996.
8. Mohamed T.M., El-Souod S.M., Ali E.M., El-Badry M.O., El-Keiy M.M., Aly A.S. Immobilization and characterization of inulinase from *Ulocladium atrum* on nonwoven fabrics. *J. Biosci.*, 2014, vol. 39, no. 5, pp. 785-794.
9. Garlet T.B., Weber C.T., Klaic R., Foletto E.L., Jahn S.L., Mazutti M.A., Kuhn R.C. Carbon nanotubes as supports for inulinase immobilization. *Molecules*, 2014, vol. 19, no. 9, pp. 14615-14624.

10. Altunbas C., Uygun M., Uygun D.A., Akgol S., Denizli A. Immobilization of inulinase on concanavalin A-attached super macroporous cryogel for production of high-fructose syrup. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, vol. 170, no. 8, pp. 1909-1921.
11. de Oliveira Kuhn G., Rosa C.D., Silva M.F., Treichel H., de Oliveira D., Oliveira J.V. Synthesis of fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* commercial inulinase immobilized in montmorillonite pretreated in pressurized propane and LPG. *Appl Biochem Biotechnol.*, 2013, vol. 169, no. 3, pp. 750-760.
12. Santa G.L., Bernardino S.M., Magalhaes S., Mendes V., Marques M.P., Fonseca L.P., Fernandes P. From inulin to fructose syrups using sol-gel immobilized inulinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011, vol. 165, no. 1, pp. 1-12.
13. 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.
14. 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.
15. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G., Perpete 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 endo-activity. *Biochimie*, 2012, vol. 94, pp. 2423-2430.
16. 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.
17. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Grechkina M.V., Ostankova I.V., Artyukhov V.G. Inulinases from various producers: the features of their permolecular organization. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014, vol. 50, no. 1, pp. 10-16.
17. Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A., Volkova S.A., Artyukhov V.G. design of a heterogeneous enzymatic preparation on the basis of immobilized inulinase from *Helianthus tuberosus*. *Biotechnology in Russia*, 2012, no. 6, pp. 31-41.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, pp. 265-275.
20. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Karpov S.I., Seredin P.V., Artyukhov V.G. Investigation of mechanisms of interaction between inulinase from *Kluyveromyces marxianus* and the matrices of ion-exchange resins and fiber. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 222-228.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ КРАСИТЕЛЕЙ

Барановский С.Ф.<sup>1</sup>, Чернышев Д.Н.<sup>1</sup>, Бучельников А.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия

e-mail: sfbar@yandex.ru

**Аннотация.** Методом спектрофотометрии изучена ассоциация разнородных молекул красителей в водном растворе и предложена схема оценивания структурных параметров молекулярных комплексов. Проведено разложение спектра поглощения смеси красителей на индивидуальные компоненты.

**Ключевые слова:** ассоциация, поглощение, краситель, димер, структурные параметры, квантовая механика.

#### STUDY OF THE ASSOCIATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE DYES MOLECULES

Baranovskiy S.F.<sup>1</sup>, Chernyshev D.N.<sup>1</sup>, Buchelnikov A.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Sevastopol National University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

<sup>2</sup> Belgorod National Research University

Pobedy str., 85, Belgorod, 308015, Russia

**Abstract.** The association of heterogeneous dye molecules in aqueous solution has been studied by means of spectrophotometry. Using the method of structural parameters of molecular complexes is suggested. The absorption spectrum of dye mixture was decomposed onto individual components.

**Keywords:** association, absorption, dyes, dimer, structural parameters, quantum mechanics.

Многие биологически активные гетероциклические молекулы способны образовывать в водном растворе однородные и разнородные светопоглощающие ассоциаты, в частности, димеры с абсорбционными свойствами, отличными от свойств молекул в мономерном состоянии. Одним из наиболее чувствительных методов исследования нековалентного связывания молекул является электронная спектроскопия, позволяющая оценить структурные параметры образующихся ассоциатов [1-5].