

Краткое сообщение

УДК 547.458.65:612.396.19

Т.А. КОВАЛЕВА*, М.Г. ХОЛЯВКА, А.С. ТАХА

Воронежский государственный университет, г. Воронеж, 394000

e-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru

Исследование некоторых параметров иммобилизованной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* как перспективного катализатора реакции гидролиза инулина

Ключевые слова: адсорбционная иммобилизация, инулиназа, синтетические полиэлектролиты.

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) — фермент, широко распространенный у высших растений и микроорганизмов. В биотехнологии он может применяться для получения фруктозы из растительного сырья, так как расщепляет инулин и другие фруктозосодержащие полимеры. Фруктозные сиропы широко используются в кондитерской промышленности, а также для профилактики сахарного диабета, кариееса и ожирения.

В настоящее время промышленное производство фруктозы ферментативным путем состоит из нескольких этапов и требует наличия трех различных ферментов: α-амилазы, глюкоамилазы и глюкозоизомеразы. При этом из крахмала получают 45%-ный фруктозный сироп. В случае применения инулиназы для расщепления инулинсодержащего сырья в одностадийном процессе получают конечный продукт — 95%-ный фруктозный сироп. Другой путь использования этого фермента — прямая ферментация инулина с образованием этанола, например, путем сбраживания сока топинамбура ферментными системами *Zygomonas mobilis* [1, 2] или сока георгина с использованием *Clostridium pasterianum* [3]. Перспективным является применение фермента и для синтеза олигосахаридов, которые обладают пребиотическими свойствами [4].

В течение последнего десятилетия происходит накопление данных о механизме синтеза инулиназы различными микроорганизмами [5–9], поиск наиболее перспективных ее продуцентов [10, 11], установление зависимости каталитической активности этого энзима от температуры, концентрации субстрата, pH среды, присутствия в реакционной смеси различных активаторов и ингибиторов [12–15]. Проводится исследование процесса гидролиза инулиназой химически чистого инулина, а также фруктоолигосахаридов, содержащихся в экстрактах топинамбура [16], цикория [17] и спаржи [18].

Известно, что иммобилизация ферментов — это способ получения на их основе гетерогенных катализаторов со всеми вытекающими отсюда технологическими преимуществами. При этом повышается устойчивость белковых препаратов к денатурирующим воздействиям внешней среды и появ-

ляется возможность многократного применения биокатализаторов в фармацевтической и пищевой промышленности. Особое внимание исследователи уделяют проблемам подбора и модификации носителей, разработке методов иммобилизации, изучению кинетики катализа гетерогенными ферментными препаратами.

Так, Allais J. et al [1] провели иммобилизацию инулиназы на хитине с помощью глутарового альдегида и получили катализатор для производства этанола из инулинсодержащего сырья. Workman [19] также использовал глутаровый альдегид для иммобилизации клеток дрожжей *Kluyveromyces fragilis*; была осуществлена адсорбция инулиназы *K. marxianus* NRRL Y-7571 на анионите Streamline DEAE [20]. Gurta et al [21] показали, что при включении в полиакриламидный гель фермент сохраняет более 45% исходной активности при температуре 45°.

В ряде работ показано, что дрожжи *K. marxianus* являются перспективными продуцентами инулиназы. Получены первые результаты исследований по иммобилизации данного фермента и целых клеток дрожжей на различных носителях [22–32].

Целью настоящей работы является иммобилизация инулиназы *K. marxianus* на различных носителях путем адсорбции и изучение физико-химических свойств иммобилизованных ферментных препаратов и кинетических характеристик реакции гидролиза инулина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследований является фермент инулиназа, выделенная из дрожжей *K. marxianus* Y-303, чистая культура которых была получена из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва). Особенности культивирования продуцента, методики выделения и очистки фермента, определения активности и содержания белка, подготовки носителей и иммобилизации энзима, а также способ статистической обработки подробно описаны в работе [33].

Ковалева Тамара Андреевна, Холявка Марина Геннадьевна, Таха Абдул Саттар.

* Автор для переписки.

В качестве носителей использовали катионит КУ-2 (Уральская химическая компания, Екатеринбург, Россия) и анионит АВ-17-2П (ОАО "Азот", Кемерово, Россия).

Сульфокатионит КУ-2 с активными группами $-C_6H_4-SO_3H$ синтезируется на основе стирола и дивинилбензола, обладает высокой термической и химической стабильностью, нерастворим в большинстве органических растворителей.

Сильноосновный анионит АВ-17-2П с активными группами $-N^+(CH_3)_3$ получают при взаимодействии хлорметилового сополимера стирола и дивинилбензола с триметиламином. Этот ионообменник характеризуется механической прочностью, химической и биологической устойчивостью, достаточной проницаемостью для молекул фермента и субстрата и поэтому широко используется для очистки сахарных сиропов в промышленности [34].

Для определения каталитической активности свободной и иммобилизованной инулиназы реакцию гидролиза инулина в концентрации 10^{-3} М осуществляли на установке, состоящей из термостата UTU-4 (Horyzont, Польша), соединенного с двумя лабораторными ферментерами, помещенными на магнитную мешалку. В одном ферментере проводили инкубацию инулиназы с субстратом (50 мл) в течение 20 мин при pH 4,7 и температуре 50°, в другом — вместо раствора фермента помещали такое же количество ацетатного буфера, pH 4,7. При анализе каталитической активности иммобилизованного ферментного препарата температура гидролиза субстрата составляла 70°.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что описано большое количество методов иммобилизации, выбор носителя остается во многом эмпирическим [35, 36], поэтому мы продолжили изучение условий связывания инулиназы с матрицей различных синтетических полимеров, а именно с катионитом КУ-2 и макропористой анионообменной смолой АВ-17-2П.

Эти полиэлектролиты применяют в качестве носителей для иммобилизации ферментов различных классов, так как они удовлетворяют производственным требованиям, соответствуют санитарно-химическим нормам и используются в промышленности для концентрирования и очистки пищевых продуктов.

Наши опыты показали, что КУ-2 и АВ-17-2П являются более перспективными носителями, чем те, которые были предложены нами ранее [33]. Инулиназа, иммобилизованная на катионите КУ-2, сохраняла 61,7% от активности нативного фермента, а при связывании с анионитом АВ-17-2П — 75,5% от исходной активности (рис. 1).

Нами была исследована зависимость каталитической активности свободной и иммобилизованной инулиназы от температуры гидролиза (рис. 2). Для инулиназы, адсорбционно иммобилизованной на ионитах КУ-2 и АВ-17-2П, оптимальная температура гидролиза субстрата смещается в сторону более высоких значений и максимальная активность достигается при 70°, что на 20° выше, чем для нативного фермента. Подобную закономерность мы наблюдали при иммобилизации инулиназы и на других носителях [37—39].

По нашим данным, оптимум pH для свободной и иммобилизованной на исследуемых ионитах инулиназы составляет 4,5—4,7 (рис. 3). Сохранение pH-оптимума наблюдается и для других препаратов инулиназы при иммобилизации на синтетических ионообменных смолах и волокнах [38, 39].

Адсорбционная иммобилизация, по-видимому, стабилизирует молекулу инулиназы, защищая ее от воздействия экстремальных значений pH, температуры, а также других денатурирующих агентов за счет уменьшения мобильности прост-

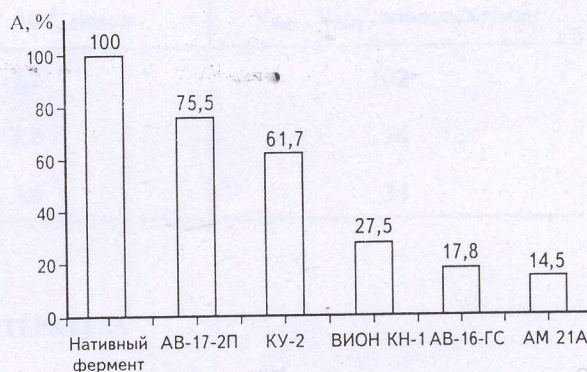


Рис. 1. Активность инулиназы (А) при адсорбционной иммобилизации на различных носителях, % от активности свободного фермента

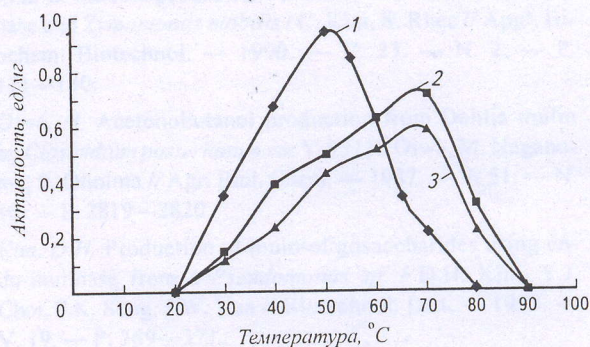


Рис. 2. Каталитическая активность свободной (1) и иммобилизованной на ионитах АВ-12-2П (2) и КУ-2 (3) инулиназы в зависимости от температуры

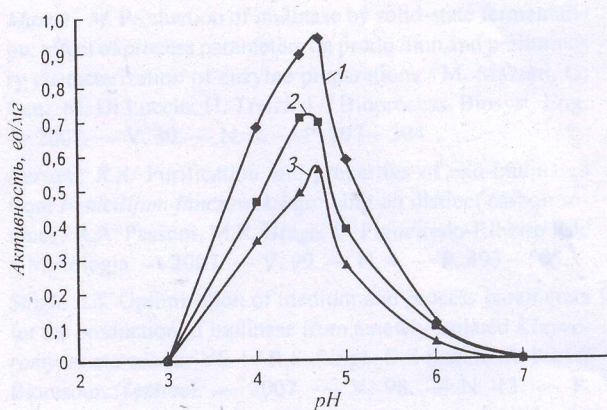


Рис. 3. Каталитическая активность свободной (1) и иммобилизованной на ионитах АВ-12-2П (2) и КУ-2 (3) инулиназы в зависимости от pH среды

ранственной структуры, ответственной за образование фермент-субстратного комплекса [37—40].

Нами установлено, что кинетика реакции гидролиза инулина свободной и иммобилизованной инулиназой не подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен (рис. 4). Наблюдаемая модификация кинетики ферментативного катализа в свя-

Значения K_m и V_{max} для реакции гидролиза инулина свободной и иммобилизованной инулиназой

Ферментный препарат	$K_m, K_m', 10^{-4}$, моль/л	V_{max}, V_{max}' , мкмоль/мг/мин
Свободная инулиназа	2,2	102
Инулиназа, иммобилизованная на АВ-17-2П	3,2	54
Инулиназа, иммобилизованная на КУ-2	3,6	34

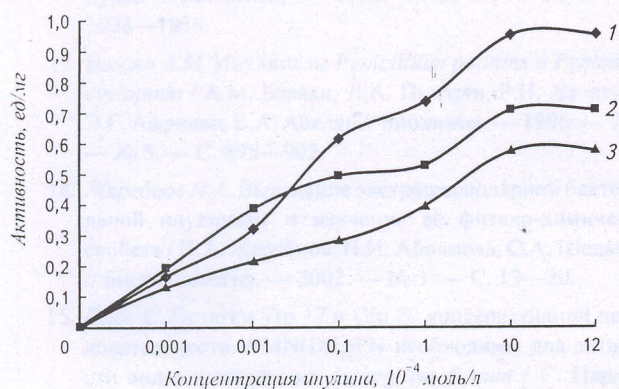


Рис. 4. Каталитическая активность свободной (1) и иммобилизованной на ионитах АВ-12-2П (2) и КУ-2 (3) инулиназы в зависимости от концентрации субстрата

зи с иммобилизацией может свидетельствовать о том, что при сорбции белка происходит лишь незначительное изменение конформации отдельных субъединиц, сказывающееся на кооперативности взаимодействия в процессе расщепления субстрата [41].

С помощью преобразования кривых зависимости V от S в координатах Лайнуивера-Берка, Хейнса и Иди-Хофсти были определены K_m и V_{max} реакции гидролиза инулина свободным ферментным препаратом и кажущиеся значения V_{max}' и K_m' для иммобилизованных образцов (таблица). Показано, что иммобилизация приводит к увеличению значений константы Михаэлиса и уменьшению максимальной скорости реакции по сравнению с нативным энзимом.

Величины K_m и V_{max} отличаются у ферментов, выделенных из различных источников. Константа Михаэлиса для инулиназы из *Clostridium acetobutylicum* составляет величину $1,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, а для фермента, выделенного из *Candida salmanticensis* она равна $17 \cdot 10^{-3}$ моль/л [42, 43]. У инулиназы из *Penicillium janczewskii* K_m по отношению к инулину имеет величину $4,3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, из *Kluyveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* — $3,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $4,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, соответственно [12, 44]. Значение K_m для инулиназы из *Aspergillus awamori* равно $1,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, а максимальная скорость реакции гидролиза инулина составляет 172 мкмоль/мг/мин [11].

Таким образом, сравнительный анализ значений основных кинетических параметров гидролиза инулина иммобилизованными препаратами инулиназы из *K. marxianus*, включая описанные ранее образцы [33, 39] показал, что наибольшую каталитическую активность проявляет инулиназа, адсорбированная на макропористой анионообменной смоле АВ-17-2П.

Получено 29.07.08

ЛИТЕРАТУРА

- Allais, J. Continuous production of ethanol with *Zymomonas mobilis* growing on *Jerusalem artichoke* juice / J. Allais, E. Torres // Biotechnol. Bioeng. — 1987. — V. 29. — N. 6. — P. 778—782.
- Kim, C. Ethanol production *Jerusalem artichoke* by inulinase and *Zymomonas mobilis* / C. Kim, S. Rhee // Appl. Biochem. Biotechnol. — 1990. — V. 23. — N. 2. — P. 171—180.
- Oiwa, H. Acetonebutanol production from Dahlia inulin by *Clostridium pasterianum* var Y-53 / H. Oiwa, M. Naganuma, S. Ohnima // Agr. Biol. Chem. — 1987. — V. 51. — N. 10. — P. 2819—2820.
- Kim, D.H. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. / D.H. Kim, Y.J. Choi, S.K. Song, J.W. Yun // Biotechnol. Lett. — 1997. — V. 19. — P. 369—371.
- Yuan, X.L. Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger* / X.L. Yuan, C. Goosen, H. Kools, M.J. van der Maarel, C.A. van den Hondel, L. Dijkhuizen, A.F. Ram // Microbiology. — 2006. — V. 152. — N. 10. — P. 3061—3073.
- Mazutti, M. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations / M. Mazutti, G. Ceni, M. Di Luccio, H. Treichel // Bioprocess. Biosyst. Eng. — 2007. — V. 30. — N. 5. — P. 297—304.
- Pessoni, R.A. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources / R.A. Pessoni, M.R. Braga, C. Figueiredo-Ribeiro // Mycologia. — 2007. — V. 99. — N. 4. — P. 493—503.
- Singh, R.S. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1 / R.S. Singh, B.S. Sood, M. Puri // Bioresour. Technol. — 2007. — V. 98. — N. 13. — P. 2518—2525.
- Yuan, X.L. Identification of InuR, a new Zn(II)2Cys6 transcriptional activator involved in the regulation of inulinolytic genes in *Aspergillus niger* / X.L. Yuan, J.A. Roubos, C.A. van den Hondel, A.F. Ram // Mol. Genet. Genomics. — 2008. — V. 279. — N. 1. — P. 11—26.
- Gern, R.M. Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase / R.M. Gern, S.A. Furlan, J.L. Ninow, R. Jo-

- nas // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — V. 55. — N. 5. — P. 632—635.
11. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. — Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета, 2001. — 184 с.
 12. Абелян В.А. Характеристика экзонуклаз *Kluyveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* / В.А. Абелян, Л.С. Манукян // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 6. — С. 1028—1036.
 13. Балаян А.М. Инулиназы *Penicillium palitans* и *Penicillium cyclospium* / А.М. Балаян, Л.А. Пивазян, Р.Н. Хачатурян, Э.Г. Африкян, В.А. Абелян // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 5. — С. 895—902.
 14. Жеребцов Н.А. Выделение экстрацеллюлярной бактериальной инулиназы и изучение ее физико-химических свойств / Н.А. Жеребцов, Н.И. Абрамова, С.А. Шеламова // Биотехнология. — 2002. — № 3. — С. 13—20.
 15. Парк С. Остатки Trp 17 и Glu 20 консервативной последовательности WMN(D/E)PN необходимы для активности эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* / С. Парк, И. Хен, Х. Ким, С. Сонг, Т. Ум, К. Че // Биохимия. — 2003. — Т. 68. — № 6. — С. 805—809.
 16. Голубев В.Н. Биотехнологические аспекты переработки топинамбура / В.Н. Голубев, В.П. Кулев // Пищевая Промышленность. — 1991. — № 9. — С. 52—53.
 17. Park, J.P. Enzymatic production of inulo-oligosaccharides from chicory juice / J.P. Park, D.H. Kim, D.S. Kim, J.W. Yun // Biotechnol. Lett. — 1998. — V. 20. — N. 4. — P. 385—388.
 18. Singh, R.S. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup / R.S. Singh, D. Rajesh, P. Munish // J. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 17. — N. 5. — P. 733—738.
 19. Workman, W.E. Enzymatic hydrolysis of inulin to fructose by glutaraldehyde fixed yeast cells / W.E. Workman, D.F. Day // Biotechnol. Bioeng. — 1984. — V. 8. — P. 905—910.
 20. Makino, Y. Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on Streamline DEAE resin / Y. Makino, P.S.C. Lima, F.M. Filho, M.I. Rodrigues // Braz. J. Chem. Eng. — 2005. — V. 22. — N. 4. — P. 539—545.
 21. Gurta, A.K. Production, thermal stability and immobilization of inulinase from *Fusarium oxysporum* / A.K. Gurta, P. Rathore, N. Kaur, R. Singh // J. Chem. Technol. Biotechnol. — 1990. — V. 47. — N. 3. — P. 245—257.
 22. Bajpai, P. Continuous ethanol productions from *Jerusalem artichoke* stalks using immobilized cell of *Kluyveromyces marxianus* / P. Bajpai, A. Margaritis // Proc. Biochem. — 1986. — V. 21. — P. 86—89.
 23. Cazetta, M.L. Yacon (*Polimnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* / M.L. Cazetta, P.M.M. Martins, R. Monti, J. Contiero // J. Food Engineering. — 2004. — V. 1. — P. 129—138.
 24. Kalil, S.J. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design / S.J. Kalil, R.S. Mauri, F. Filho, M.I. Rodrigues // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2001. — V. 94. — N. 3. — P. 257—264.
 25. Kushi, R. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* / R. Kushi, R. Monti, J. Contiero // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — V. 25. — P. 6381.
 26. Laloux, O. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424 / O. Laloux, J.P. Cassart, J. Delcour, J. Van Beeumen, J. Vandenhoute // Fed. Eur. Biochem. Soc. — 1991. — V. 289. — N. 1. — P. 64—68.
 27. Parekh, S. Production of inulinase (β -fructanhydrolase) by *Kluyveromyces marxianus* / S. Parekh, A. Margaritis // Agric. Biol. Chem. — 1986. — V. 50. — P. 1085—1087.
 28. Pessoa, A. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. Culture medium composition and enzyme extraction / A. Pessoa, M. Vitolo // Braz. J. Chem. Eng. — 1999. — V. 16. — N. 3. — P. 324—340.
 29. Rouwenhorst, R.J. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 / R.J. Rouwenhorst, L.E. Visser, A.A. van der Baan, W.A. Scheffers, J.P. van Dijken // Appl. Environ. Microbiol. — 1988. — V. 54. — N. 5. — P. 1131—1137.
 30. Rouwenhorst, R.J. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species / R.J. Rouwenhorst, W.S. Ritmeester, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken // Appl. Environ. Microbiol. — 1990. — V. 56. — N. 11. — P. 3329—3336.
 31. Rouwenhorst, R.J. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 / R.J. Rouwenhorst, M. Hensing, J. Verbakel, W.A. Scheffers, J.P. van Duken // Appl. Environ. Microbiol. — 1990. — V. 56. — N. 11. — P. 3337—3345.
 32. Selvakumar, P. Comparative studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture / P. Selvakumar, A. Pandey // Biores. Technol. — 1999. — V. 69. — P. 123—127.
 33. Ковалева Т.А. Разработка гетерогенного катализатора реакции гидролиза инулина на основе иммобилизованного препарата инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* / Т.А. Ковалева, М.Г. Холявка, А.С. Таха // Биотехнология. — 2007. — № 3. — С. 80—87.
 34. Лурье А.А. Сорбенты и хроматографические носители. — М.: Химия, 1972. — 320 с.
 35. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы: в 2т. [под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинек]. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — Т. 1. — 296 с.
 36. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. — М.: Мир, 1983. — 213 с.
 37. Ковалева Т.А. Влияние иммобилизации на процесс термической инактивации инулазы / Т.А. Ковалева, О.М. Кожокина, Л.А. Битюцкая, Е.С. Машкина, Т.Г. Меньшикова, В.Ф. Селеменев // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2002. — Т. 2. — № 3. — С. 360—366.
 38. Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобили-

- зованными амилазами: Дис. ... д-ра биол. наук. — Воронеж: Воронежский государственный университет, 1998. — 421 с.
39. 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.
40. Ковалева Т.А. Воздействие мочевины, γ и УФ-излучения на физико-химические свойства свободной и иммобилизованной инулазы / Т.А. Ковалева, О.М. Кожокина, О.Д. Трофимова // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2000. — Т. 40. — № 1. — С. 23—27.
41. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1990. — 350 с.
42. Efstathiou, I. A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8 / I. Efstathiou, G. Reysset, N. Truffaut // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1986. — V. 5. — P. 143—149.
43. Vandamme, E.J. Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications / E.J. Vandamme, D.G. Derycke // Advan. Appl. Microbiol. — 1983. — V. 29. — P. 139—176.
44. Pessoni, R.A. Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) / R.A. Pessoni, R.C. Figueiredo-Ribeiro, M.R. Braga // J. Appl. Microbiol. — 1999. — V. 87. — P. 141—147.

T.A. KOVALEVA, M.G. HOLYAVKA, and A.S. TAKHA*

The Voronezh State University, 394000, Voronezh Russia

e-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru

Study on a Few Characteristics of Immobilized Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* as a Perspective Catalyst for Inulin Hydrolysis

Key words: adsorption immobilization, inulinase, synthetic polyelectrolyte.

* Author for correspondence.