

Биол. журн. Армении, 4 (67), 2015

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНУЛИНАЗЫ ИЗ КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА (*HELIANTHUS TUBEROSUS*)

К. Г. ДЮКОВА, М. С. ИЗМАИЛЯН, Л. С. МАНУКЯН, В. Т. КОЧИКЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
karina_dukova@yahoo.com

Приведены результаты исследований по разработке оптимальных условий выделения инулиназы из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Выявлен наиболее эффективный экстрагент, способствующий максимальному переходу белков в раствор, осуществлено концентрирование экстракта растворимого белка с полным сохранением его ферментативной активности. Выделены три изофермента инулиназы с разной степенью очистки, гидролизующие инулин с активностью $I_1=0,0175$ Ед/мг, $I_2=0,0083$ Ед/мг, $I_3=0,00450$ Ед/мг.

Инулин – топинамбур (Helianthus tuberosus) – инулиназа

Աշխատանքում ներկայացված են գետնախնձորից (*Helianthus tuberosus*) ինուլինազի առաջատար համար օպտիմալ պայմանների որոշմանն ուղղված հետազոտության արդյունքները: Հետազոտության ընթացքում հայտնաբերվել է ամենաարդյունավետ էքստրագենտը, որը նպաստում է լուծույթում սպիտակուցների առավելագույն տարանջատմանը: Իրականացվել է լուծվող սպիտակուցի էքստրակտի խտացումը՝ ամբողջապես պահպանելով նրա ֆերմենտային ակտիվությունը: Տարանջատվել են մաքրման տարբեր աստիճաններով ինուլինազի երեք իզոֆերմենտ, որոնք ինուլինը ենթարկում են հիդրոլիզի հետևյալ ակտիվությամբ՝ $I_1=0,0175$ Միավոր/մգ, $I_2=0,0083$ Միավոր/մգ, $I_3=0,00450$ Միավոր/մգ:

Ինուլին – գետնախնձոր (Helianthus tuberosus) – ինուլինազ

The results of studies on the development of optimal conditions for the isolation of inulinase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) are presented. The most effective extragent has been identified, which promoted to the highest possible extraction of proteins in the solution. Three isoenzymes of the inulinase have been isolated with various degrees of purification that hydrolyzed inulin with the following activity $I_1 = 0,0175$ U/mg, $I_2 = 0,0083$ U/mg, $I_3 = 0,00450$ U/mg.

Inulin – Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus) – inulinase

Инулиназы (2,1-β-D-фруктан фруктаногидролазы) составляют важнейший класс ферментов для получения фруктозы, глюкозы и инуло-олигосахаридов, которые интенсивно используются в фармацевтической и пищевой индустрии. Описано три типа инулиназ, включая эндо-инулиназы, экзо-инулиназы и фруктофуранозидазы (инвертазы), которые не являются обычными катаболическими кар-

богидратазами. В основной ферментативной реакции участвуют главным образом два фермента, которые катализируют гидролиз инулина и их подразделяют на две группы по типу воздействия на инулин. Экзо-инулиназы (ЕС 3.2.1.80) отщепляют концевой фрагмент фруктозы от молекулы инулина; эндо-инулиназы (ЕС 3.2.1.7), в результате гидролиза внутренней связи в молекуле инулина образуют различные олигосахариды, которые являются растворимыми пищевыми волокнами и функциональными подсластителями [3, 11]. Инулиназы широко распространены среди высших растений и микроорганизмов. Процесс получения инулиназ из грибов, дрожжей и бактерий хорошо изучен и широко представлен в литературе [2, 5-7, 9]. В настоящее время существуют высокоактивные ферментные препараты инулиназ, способствующие превращению инулинсодержащего сырья во фруктозиды различной степени полимеризации. Растительные инулиназы менее изучены и результаты по их исследованию представлены лишь в двух ранних работах [4, 10]. В настоящее время физиологическая роль растительных инулиназ все еще окончательно не выяснена. Предполагается, что изменение углеводного состава клубней в процессе зимнего хранения происходит не без участия гидролитических ферментов – инулиназ.

Слабый интерес, проявляемый к растительным инулиназам, в основном обусловлен сложностью работы с растительными экстрактами и низким содержанием белка в растительном сырье.

Целью данной работы являлось определение оптимальных условий выделения инулиназы из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*).

Материал и методика. Клубни топинамбура (*Helianthus tuberosus*) были выращены в открытой почве в окрестностях г. Еревана (Армения), выкопаны в октябре-ноябре и хранились в течение недели в холодильнике при температуре 4-5⁰ С до момента использования. Инулин, применяемый в качестве субстрата, был получен из клубней топинамбура в лаборатории биотрансформации НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА. В работе использовали следующие реактивы: ДЕАЕ-целлюлоза, 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия). Все остальные реактивы марки х.ч. – коммерчески доступные, производства Армении и стран СНГ.

Приготовление грубого ферментного экстракта. Клубни топинамбура тщательно очищали, промывали под проточной водой и разрезали на мелкие кусочки с помощью ножа. Измельченные кусочки заливали экстрагирующим раствором в соотношении 1:3 и проводили гомогенизацию в стационарном блендере (Ufesa, Испания). Далее гомогенат инкубировали на термостатируемой круговой качалке со скоростью вращения 180 об/мин в течение 2 ч при температуре 37⁰С, после чего отфильтровывали через 6 слоев марли. Фильтрат центрифугировали при 4000 об/мин 40 мин (центрифуга К-26, Германия), а полученный супернатант пропускали через ацетатный фильтр на фарфоровой воронке под вакуумом для получения прозрачного экстракта. Полученный экстракт концентрировали путем пропускания его через разделительный ультрафильтрационный аппарат с полыми волокнами AP-02м (Россия) периодического действия. Рабочая смесь циркулировала по замкнутому контуру, омывая наружную поверхность волокна, а по его внутреннему каналу выводился фильтрат. Каждую порцию фильтрата анализировали на содержание белка и сахаров. В результате фильтрации получили максимально сконцентрированный белковый экстракт.

Все дальнейшие работы по выделению и очистке инулиназы топинамбура проводились при температуре 4⁰С.

Выделение и очистка инулиназы из клубней топинамбура (*H. tuberosus*). К полученному раствору концентрированного белкового экстракта добавляли кристаллы сульфата аммония до 90% насыщения и оставляли в холодильнике на час. Выпавший осадок центрифугировали 25 мин при 10000 об/мин (центрифуга К-24, Германия), растворяли в буфере I (20 мМ К₂Na-фосфатный буфер pH 7,0, содержащий 5 мМ меркаптоэтанол) и диализовали против 10 объемов буфера II (2 мМ К₂Na-фосфатный буфер pH 7,0, содержащий 5 мМ меркаптоэтанол) в течение суток, дважды меняя раствор буфера. Диализат фуговали и проводили выделение инулиназы.

Ионообменная хроматография. Колонка (25x310 мм) содержала ДЕАЕ-целлюлозу, уравновешенную буфером I. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0-1 М) в буфере I. Активные фракции собирали по 8-10 мл автоматическим коллектором “Isko” (США).

Измерение инулиназной активности. Для определения инулиназной активности к 0,9 мл 1 %-ного раствора инулина (0,2 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0) приливали 0,1 мл исследуемого раствора фермента, перемешивали и инкубировали при температуре 37⁰С в течение 10 ч. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров определяли модифицированным методом Шомоди-Нельсона [8, 12]. За единицу инулиназной активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль фруктозы в минуту.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда по поглощению комплексов фермент – кумасси бриллиантовый синий при длине волны 595 нм [1] с использованием в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Выход белка контролировали последовательным измерением оптической плотности элюатов колонн при 280 нм [13].

Результаты и обсуждение. В процессе выделения и очистки инулиназы нами сочетались методы экстракции (перевод белков в растворенное состояние 0,9 %-ным раствором хлористого натрия, который обеспечивает наряду с растворением стабилизацию белка); методы фугации, фильтрации и ультрафильтрации через полые волокна (для получения концентрированного белкового экстракта), методы высаливания и центрифугирования (образование осадка при 90% насыщения концентрированного экстракта клубней топинамбура сульфатом аммония (NH₄)₂ SO₄, растворения полученного осадка (в 20 mM K,Na-фосфатном буфере pH 7,0 с 5 mM меркаптоэтанолом), диализа (против 10 объемов 2 mM K,Na-фосфатного буфера pH=7,0 с 5 mM меркаптоэтанолом).

На стадии экстракции инулиназы из клубней топинамбура нами были проведены эксперименты по выявлению наиболее эффективного экстрагента, способствующего максимальному переходу белков в раствор. Одной из основных трудностей выделения растительных белков является полное экстрагирование белков из ткани растений. Поскольку белки находятся внутри отдельных растительных клеток, через оболочки которых они не могут диффундировать в окружающий раствор, то при экстракции белков требуется полное разрушение клеток. Такое разрушение клеток топинамбура мы проводили, используя в качестве гомогенизатора блендер, а в качестве экстрагирующих растворов 9 %-ный раствор хлористого натрия, дистиллированную воду и 0,2 М ацетатный буфер pH 4,6. Один из гомогенатов, где в качестве экстрагента использовалась дистиллированная вода, подвергался дополнительной обработке ультразвуком (Labsonic 2000, B Braun, Германия). Так как в топинамбуре содержание активных полифенолоксидаз (РРО) и их субстратов достаточно велико, то при экстракции белков для подавления РРО активности использовали защитную добавку в виде 5 mM раствора диэтилдитиокарбамата натрия [14].

Таблица 1. Содержание растворенного белка в экстрактах топинамбура

Экстрагирующий раствор	0,2 М ацетатный буфер pH 4,6	9 %-ный раствор хлористого натрия	Дистиллированная вода, ультразвук
Концентрация белка, мг/мл	0,0405	0,262	0,148

Основываясь на полученных результатах, приведенных в табл. 1, можно сделать вывод, что разрушение клеток посредством блендера и экстракция ацетатным буфером малоэффективны для полного извлечения белка из клубней топинамбура.

Дополнительное разрушение клеток посредством ультразвука эффективно даже в случае экстракции обычной дистиллированной водой. Однако наилучшего эффекта разрушения можно достичь в сочетании гомогенизации и плазмолиза клеток, используя в качестве экстрагента высокие концентрации соли, так как максимальное количество растительного глобулярного белка легче выделяется именно в солевой раствор. Таким образом, из трех представленных экстрагирующих растворов наилучшим для использования является 9 %-ный раствор хлористого натрия.

Экстракт из клубней топинамбура представлял собой густой солевой раствор, содержащий малое количество белка и большое количество балластных веществ: фенолов, полисахаридов, пектина, фруктозы и т.д. Концентрирование белкового раствора с применением таких методов, как вакуумное упаривание и осаждение органическими растворителями было неприемлемо вследствие того, что в первом случае балластные вещества концентрировались вместе с белком, а во втором совместно осаждались. Мы посчитали целесообразным применить для очистки и концентрирования белкового раствора метод ультрафильтрации через полые волокна, основываясь на большой разнице молекулярных масс концентрируемых белков и подлежащих удалению балластных составляющих и соли. Дважды в систему вводили по литру дистиллированной воды, что позволило существенно снизить остаточное количество соли и сахаров в концентрате. При концентрировании экстракта его начальный объем уменьшился в 14,5 раз, а содержание белка по сравнению с исходным раствором повысилось во столько же раз, при этом полностью сохранилась его ферментативная активность. Благодаря тому, что в фильтрат ушла основная масса соли и балластных веществ, мы получили возможность провести осаждение белка высаливанием при 90 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Таким образом применение ультрафильтрации позволило не только сконцентрировать растительный белковый раствор с полным сохранением его ферментативной активности, но и добиться значительной степени его очистки от сопутствующих низкомолекулярных примесей.

Следующим этапом работы явилось фракционирование диализата на колонке (25 x 310 мм) с ДЕАЕ-целлюлозой. Фракции были последовательно исследованы на содержание сахаров, белка и инулиназную активность.

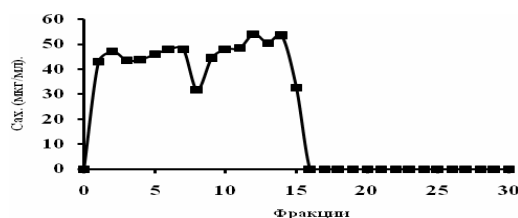


Рис.1. Хроматография диализата – препарата растворимого белка из экстракта клубней топинамбура на ДЕАЕ-целлюлозе. Профиль выхода сахаров.

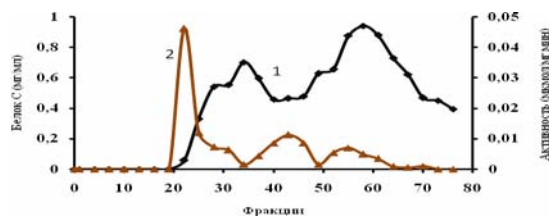


Рис. 2. Хроматография диализата – препарата растворимого белка из экстракта клубней топинамбура на ДЕАЕ-целлюлозе. Профили выхода 1– белка и 2 – изменения инулиназной активности.

На профиле элюции показано влияние ступенчатого возрастания ионной силы раствора элюента на разделение. Как видно из рис. 1, с 1-16 фракцию элюировались все сахара, далее, начиная с 18 фракции, элюировались белки. Исследование фракций на способность к гидролизу инулина показало наличие 3-х последовательных пиков инулиназной активности. В табл. 2 суммированы результаты предварительной очистки инулиназ из клубней топинамбура.

Таблица 2. Результаты предварительной очистки инулиназы из клубней топинамбура

Этапы	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность, Ед/мин	Выход активности, %	Общее сод. редуц. сахаров, мг
Экстракция, фугация, фильтрация	4000	0,262	0,00266	100	323
Концентрирование	275	3,61	0,00273	96.4	9,3
(NH ₄) ₂ SO ₄ (90%), диализ	140	4,7	0,00381	90.17	3,2
Хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе.					
I ₁ (18-34)	134	0,357	0,01750		0
I ₂ (35-49)	128	0,910	0,00830		0
I ₃ (50-64)	112	1,076	0,00450		0
				84.44	

Анализ результатов, представленных в табл. 2, показал, что содержание редуцирующих сахаров значительно сокращается (в 35 раз) в результате процесса ультрафильтрации по сравнению с исходным и снижается до нуля после этапа ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе. В результате предварительной очистки среднее значение удельной инулиназной активности (среднее арифметическое трех пиков) увеличивается в 3 раза, а общий выход активности фермента составляет 84,44 %.

Результаты нативного электрофореза в 7,7 %-ном полиакриламидном геле образцов объединенных фракций каждого пика с определением инулиназной активности в кусках разрезанного геля показали, что мы имеем три изофермента инулиназы с разной степенью очистки, электрофоретически гетерогенные, гидролизующие инулин с активностью I₁ = 0,0175 Ед/мг, I₂=0,0083 Ед/мг, I₃=0,00450 Ед/мг и отличающиеся друг от друга по электроподвижности (данные не приведены), которые нуждаются в дальнейшей очистке для использования в экспериментах по изучению их физико-химических свойств.

Фракции каждого пика инулиназной активности были объединены, сконцентрированы путем осаждения при 80 %-ном насыщении сульфатом аммония (NH₄)₂SO₄, диализованы и подвергнуты дальнейшей очистке отдельно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, p. 248-254, 1976.
2. Cazzeta M.L., Martins P.M., Monti R. and Contiero J.Y. (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Journal of Food Engineering, 66, p. 301-305, 2005.

К.Г. ДЮКОВА, М.С. ИЗМАИЛЯН, Л.С. МАНУКЯН, В.Т. КОЧИКЯН

-
3. Cho Y.J., Yun J.W. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Process Biochemistry*, 37, p. 1325-1331, 2002.
 4. Edelman J. and Jefford T.G. The metabolism of fructose polymers in plants. 4. B-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochem. J.*, 93, p. 148-161, 1964.
 5. Ettalibi M., Baratti J.C. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. *Agric. Biol. Chem.*, 54, p. 61-68, 1990.
 6. Gill P.K., Manhas R.K. and Singh P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource. Technology*, 97, p. 894-902, 2006.
 7. Kushi R.T., Monti R. and Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire., 25, p. 63-69, 2000.
 8. Nelson N. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, p. 357-380, 1944.
 9. Onodera S., Shiomi N. Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Agr. Biol. Chem.*, 52, p. 2569-2576, 1998.
 10. Rutherford P.P. and Deacon A.C. B-fructofuranosidases from Roots of dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *Biochem. J.*, 126, p. 569-573, 1972.
 11. Singh P. and Gill P.K. Production of Inulinases: recent advances. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, (2), p. 151-162, 2006.
 12. Somogyi M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, p. 19-23, 1952.
 13. Warburg O., Christian W. Isolierung und cristallisation des Garungs-ferments endolase. *Biochem. Z.*, 310, p. 384, 1941.
 14. Ziyen E., Pekyardimci S. Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk. J. Chem.*, 27, p. 217-225, 2003.

Поступила 21.01.2015