



Биолог. журн. Армении, 2 (68), 2016

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ 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 и предложены методы очистки изоферментов инулиназы из экстракта клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Показано, что два изофермента инулиназы I_1 и I_2 были очищены, из них I_1 до гомогенного состояния. В результате применения описанных методов очистки значение удельной активности ферментных препаратов I_1 и I_2 увеличилось в 21,9 и 2,48 раз, а общий выход составил 30,2 % и 20,1 % соответственно. Согласно результатам гель-фильтрации, изоферменты имеют молекулярную массу 60 кДа и 92 кДа. Полученные препараты изоинулиназы I_1 и I_2 проявляют максимальную активность в диапазоне pH 4,5 – 5,5, гидролизуют инулин и активны в отношении сахарозы.

Инулиназа – топинамбур (Helianthus tuberosus) – инулин

Նկարագրված են գետնախնձորի (*Helianthus tuberosus*) պալարների մզվածքից ստացված ինուլինազի իզոֆերմենտների մաքրման մեթոդները և ներկայացված են ուսումնասիրության արդյունքները: Ինուլինազի երկու իզոֆերմենտներ՝ I_1 և I_2 , անջատվել և մաքրվել են, ընդ որում I_1 հասցվել է հոմոգեն վիճակի: Նկարագրված մաքրման մեթոդների արդյունքում ֆերմենտային պատրաստուկների տեսակարար ակտիվությունն աճում է 21,9 և 2,48 անգամ, իսկ ակտիվության ընդհանուր ելույթը կազմում է 30,2 % և 20,1 % համապատասխանաբար: Ստացված իզոֆերմենտներն ունեն 60 կԴա և 92 կԴա մոլեկուլային զանգված և ցուցաբերում են առավելագույն ակտիվություն pH 4,5-5,5 տիրույթում: Նրանք հիդրոլիզում են ինուլին և ակտիվ են սախարոզի նկատմամբ:

Ինուլինազ – Գետնախնձոր (Helianthus tuberosus) – Ինուլին

The article presents the results of studies and methods of purification of inulinase isoenzymes from the extract of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*). It has been shown that two inulinase isoenzymes, I_1 and I_2 , were purified, and one of them, I_1 , to a homogeneous condition. As a result of the mentioned purification procedure, the value of the specific activity of preparations grows by 21,9 and 2,48 times, and the total yield makes up 30,2 % and 20,1 % respectively. According to the results of the gel filtration, the isoenzymes have a molecular weight of 60 kDa and 92 kDa, both show maximum activity in the range of pH 4.5-5.5, both hydrolyze inulin and are active towards sucrose.

Inulinase – Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus) – inulin

Инулиназы (2,1-β-D-фруктан фруктаногидролазы) – гидролитические ферменты, расщепляющие полифруктан-инулин и высокомолекулярные полисахари-

ды (со степенью полимеризации >10) на олигосахариды низкой степени полимеризации – фруктозу и глюкозу. Накопление инулина в подземной части некоторых растений (луковицы, клубни и корни) как резервного полисахарида определяет наличие в них и инулиназ, разлагающих инулин путем ферментативного гидролиза. Инулиназы микробного происхождения были выделены и изучены из различных источников: бактерий [7, 13, 20], дрожжей [6, 8, 14], грибов [2, 5, 18]. В последние годы опубликовано множество работ, посвященных получению, очистке и характеристике микробных инулиназ, в том числе генно-инженерных сверхпродуктивных штаммов [19]. Однако растительные инулиназы мало изучены и описаны всего в двух ранних работах [3, 12]. В первом исследовании [3] хроматографией белкового экстракта клубней топинамбура на ДЕАЕ-целлюлозе были получены три пика β -фруктофуранозидазной активности. Один из ферментов был охарактеризован как инвертаза, а два других как гидролазы А и В; последние два были абсолютно идентичны по своей способности к взаимодействию с рядом олигосахаридов и практически неактивны в отношении сахарозы, незначительно отличались по своим физическим характеристикам и способностью ингибироваться сахарозой в реакции с инулином. Три фруктофуранозидазы были разделены с помощью хроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой от растворимого белка, извлеченного из корней одуванчика [12]. Один фермент был охарактеризован как инвертаза, два других фермента - гидролазы, которые воздействовали на инулин и ряд олигосахаридов, оба имели одинаковый рН-оптимум и К_м. Ни одна из гидролаз не ингибировалась сахарозой в реакции с инулином.

Целью данной работы являлось получение высокоочищенных препаратов инулиназ из клубней топинамбура и изучение их физико-химических свойств.

Материал и методика. В работе использовали следующие реактивы: ДЭАЭ-тойоперл 650 М и тойоперл-55F (Тоyo Soda, Япония), ДЕАЕ-целлюлоза, сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), 2-меркаптоэтанол и гидроксипатит (Serva, Германия), полиэтиленгликоль 35000 (LOBA Chemie, Германия). Все остальные реактивы марки х.ч. – коммерчески доступные, производства Армении и стран СНГ. Инулин, применяемый в качестве субстрата, был получен из клубней топинамбура в лаборатории биотрансформации НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Все этапы приготовления ферментного экстракта из клубней топинамбура, ионнообменная хроматография экстракта с получением трех препаратов (I₁, I₂, I₃), представляющих собой объединенные элюаты трех пиков инулиназной активности, описаны в работе [4]. Процесс индивидуальной доочистки препаратов проводился способами, включающими следующие стадии очистки.

Ионнообменная хроматография. Колонка (25x180 мм) содержала ДЕАЕ-целлюлозу, уравновешенную буфером I (20 мМ К,Na-фосфатный буфер рН 7,0 (содержащий 5 мМ меркаптоэтанол). Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0-1 М) в буфере I. Активные фракции собирали по 8-10 мл автоматическим коллектором “Isko” (США).

Колонка (25 x300 мм) содержала ДЭАЭ-тойоперл 650М, уравновешенный буфером I. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0-0,4М) в буфере I. Активные фракции собирали по 8-10 мл.

Адсорбционная хроматография. Колонка (25 x 75 мм) содержала гидроксипатит. Адсорбированные белки элюировали линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0-0,4 М), рН 7,0. Фракции собирали по 5 мл.

Гель-хроматография. Колонка (15 x 560 мм) содержала Sephadex G-50, уравновешенный буфером I. Элюцию проводили 0,1 М NaCl в буфере I. Фракции – по 3 мл.

Колонка (10 x 920 мм) содержала тойоперл 55F, уравновешенный буфером I. Элюцию проводили 0,1 М NaCl в буфере I. Фракции собирали по 1,45 мл. Калибровку колонки проводили, используя следующие белки: ферритин (450 кДа), каталаза (240 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), химотрипсिनоген А (25 кДа), цитохром С (12,4 кДа).

Концентрирование осуществляли на центрифужных микрофилтрах (MWCO 10000 Amicon Ultra Centrifugal Filters. EMD Millipore. USA) центрифугированием при 3000 об/мин в течение 60 мин. Фильтрат анализировали для определения инулиназной активности.

Все работы проводили при температуре 4°C.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Чистоту полученного препарата инулиназы, выделенного и очищенного из экстракта топинамбура, изучали с помощью нативного диск-электрофореза в пластинах 7,7%-ного полиакриламидного геля (ПААГ) с системой буферов Лаемли, согласно инструкции, предложенной фирмой Фармация ("Pharmacia", Швеция) [11]. Белковые зоны выявляли кумасси бриллиантовым синим R-250.

Измерение инулиназной активности. Инулиназную активность определяли инкубированием 0,1 мл раствора фермента с инулином (1 %), растворенным в 0,2 М Na-ацетатном буфере (pH 5,0) при температуре 37°C. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров определяли модифицированным методом Somogyi-Nelson [10, 16]. За единицу инулиназной активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль фруктозы в минуту в указанных условиях.

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 бычьего сывороточного альбумина.

Выход белка контролировали последовательным измерением оптической плотности элюатов колонн при 280 нм [17].

Определение pH оптимумов. Активность ферментов измеряли при разных pH в интервале от 3,5 до 8,5, используя 1 %-ный раствор сахарозы (два буферных раствора: 0,2 М ацетатный буфер для обеспечения pH 3,5-6,0 и 0,2 М фосфатный буфер для обеспечения pH 6,5-8,5).

Для ускорения расчетов и статистической обработки получаемых результатов в работе использованы программы, разработанные на языке Гаусс 4.0

Результаты и обсуждение. В результате ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе концентрированного белкового экстракта из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*) нами были получены три пика инулиназной активности, что предположительно может свидетельствовать о наличии в экстракте трех изоферментов инулиназы. Объединенные элюаты предположительно трех изоферментов инулиназ разной степени очистки, гидролизующих инулин с активностью $I_1=0,0175$ Ед/мг, $I_2=0,0083$ Ед/мг, $I_3=0,00450$ Ед/мг [4] были сконцентрированы отдельно друг от друга путем осаждения при 80 % насыщения сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, диализованы против 10 объемов буфера II (2 mM K,Na-фосфатный буфер pH=7,0 содержащий 5 mM меркаптоэтанол) и подвергнуты дальнейшей очистке.

Выделение инулиназы I_1 проводили следующим образом. Раствор диализата I_1 хроматографировали на колонне с ДЕАЕ-целлюлозой линейным градиентом концентрации хлористого натрия (0 – 0,8 М) в фосфатном буфере I. Фракции, обладающие инулиназной активностью, объединяли ($V=28$ мл), диализовали, концентрировали в диализном мешке до минимального объема ($V=2$ мл), помещая его в сухой бисер ПЭГ- 35000, и наносили на колонку с сефадексом G-50. Элюцию проводили 0,1 М NaCl в буфере I. Активные фракции ($V=9$ мл) собирали, обессоливали и концентрировали на центрифужных микрофилтрах центрифугированием до ($V = 1,5$ мл) и наносили на колонку с тойоперл 55 F. Элюцию проводили раствором 0,1 М хлористого натрия в буфере I. Элюаты, обладающие активностью, объединяли, обессоливали и концентрировали на центрифужных микрофилтрах до ($V=0,5$ мл). Полученный таким образом препарат изофермента инулиназы I_1 исследовали на гомогенность. Результаты трех стадий очистки суммированы в табл. 1.

Основываясь на полученных результатах, можно сказать, что в результате примененных 3-х этапов очистки удельная активность изофермента инулиназы I_1 увеличилась в 21,9 раз, а выход ферментативной активности составил 30,2 %.

Таблица 1. Результаты очистки инулиназы I₁ из экстракта клубней топинамбура

Этапы	Объем, мл	Общий белок, мг	Белок, мг/мл	Удельная активность, ммоль/мг мин	Общая активность, ммоль/мин	Выход, %
ДЕАЕ- целлюлоза	28	9,184	0.328	0.049	0,450	100
Сефадекс G-50	9	0,936	0.104	0.417	0,390	86.7
Тойоперл-55F	4,35	0,127	0.029	1.072	0,136	30.2

Чистота полученного белкового препарата была проверена методом нативного диск-электрофореза в 7,7 %-ном полиакриламидном геле (рис. 1). Было показано, что в геле присутствует одна основная полоса, соответствующая активности инулиназы I₁, доказанная измерением активности фермента в кусках разрезанного геля.

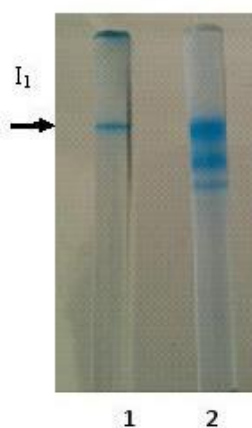


Рис. 1. Результаты нативного электрофореза препарата инулиназы I₁ из экстракта клубней топинамбура в 7,7 %-ном полиакриламидном геле: 1 – 5 мкг очищенного препарата I₁; 2 – 30 мкг препарата I₁ после хроматографии на сефадексе G-50.

Результаты определения молекулярной массы инулиназы I₁ методом гель-фильтрации на тойоперл 55 F приведены на рис. 2, из которого следует, что фермент имеет молекулярную массу ~ 60 кДа.

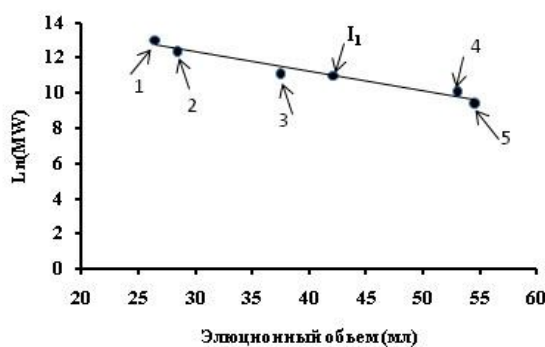


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости логарифмов молекулярных масс белков от величины их элюционных объемов: 1 - ферритин (450 кДа), 2 - каталаза (240 кДа), 3 - бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 4 - химотрипсिनоген А (25 кДа), 5 - цитохром С (12,4 кДа), инулиназа I₁

Для выделения инулиназы I_2 применили иную схему очистки, которую осуществляли следующим образом. Диализат I_2 хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-тойоперл 650 М градиентом концентрации хлористого натрия (0-0,4 М) в фосфатном буфере I. Фракции, обладающие инулиназной активностью, объединяли, упаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 35°C , диализовали и наносили на колонку с гидроксиапатитом. Адсорбированные белки элюировали линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0-0,4 М), pH 7,0. Активные фракции объединяли, диализовали, концентрировали на центрифужных микрофилтрах центрифугированием до ($V=1$ мл) и наносили на колонку, содержащую тойоперл 55 F. Элюцию проводили раствором 0,1 М хлористого натрия в буфере I. Полученные в результате гель-филтрации (рис. 3) элюаты фракций были объединены ($V_{28,29}=2,9$ мл), ($V_{30-34}=7,3$ мл), обессолены и сконцентрированы на центрифужных микрофилтрах центрифугированием до объемов ($V=0,5$ мл).

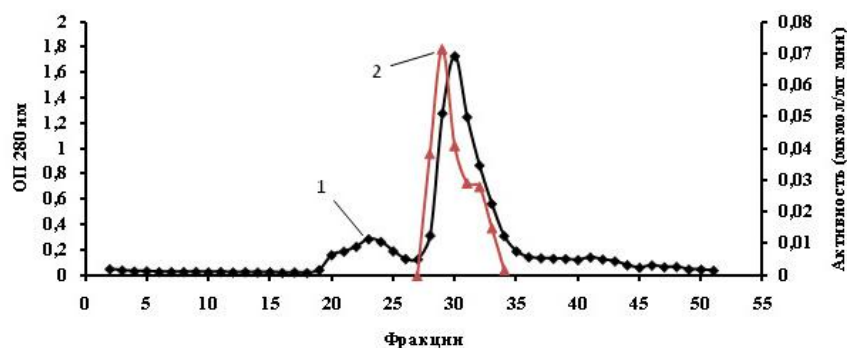


Рис. 3. Гель-филтрация инулиназы I_2 на тойоперл – 55 F. Профили элюатов колонны: выход белка (1) и изменение инулиназной активности (2).

Препарат изофермента инулиназы I_2 представлял из себя сконцентрированный элюат фракций 28+29. В табл. 2 суммированы результаты всех перечисленных этапов.

Таблица 2. Результаты очистки инулиназы I_2 из экстракта клубней топинамбура

Этапы	Объем, мл	Общий белок, мг	Белок, мг/мл	Удельная активность, Ед/ мин	Общая активность, ммоль/мин	Выход, %
ДЭАЭ – тойоперл 650 М	180	36,0	0,2	0,0276	0,994	100
Гидроксиапатит	50	19,55	0,391	0,0442	0,864	86,9
Гель-филтрация						
Фр. 28+29	2,9	2,93	1,01	0,0685	0,2	20,1
Фр. 30+34	7,25	5,629	0,78	0,0175	0,0985	9,9

В результате примененных 3-х этапов очистки удельная инулиназная активность I_2 возросла в 2,5 раз, а выход ферментативной активности составил $\sim 20\%$. Чистота полученного белкового препарата была проверена методом нативного диск-электрофореза в 7,7 %-ном полиакриламидном геле. Однако полученный препарат электрофоретически гетерогенен (рис. 4).

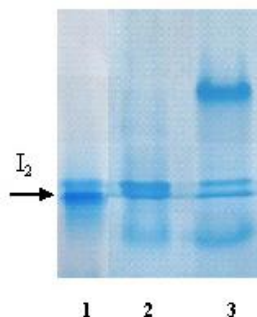


Рис. 4. Результаты нативного электрофореза препарата инулиназы I_2 в 7,7 %-ном полиакриламидном геле: 1-10 мкг очищенного препарата I_2 , 2-50 мкг препарата I_2 после хроматографии на гидроксипатите, 3-50 мкг препарата I_2 после хроматографии на ДЭАЭ – тойоперл 650 М.

Из приведенных на рис. 4 данных следует, что в геле, кроме основной полосы, соответствующей активности I_2 , доказанной измерением активности фермента в кусках разрезанного геля, присутствует еще одна минорная белковая полоса. На основании результатов, представленных в табл. 2 и рис.4 диск-электрофореза, гомогенность полученного препарата нами оценивается более чем в 80 %.

Результаты определения молекулярной массы инулиназы I_2 методом гель-фильтрации на тойоперл – 55 F приведены на рис. 5, из которого следует, что фермент имеет молекулярную массу 92 кДа.

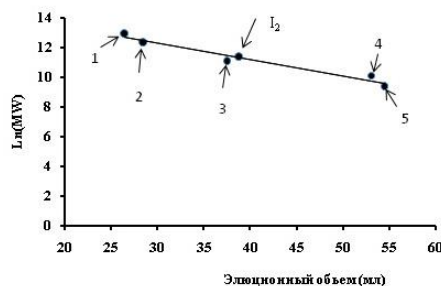


Рис. 5. Калибровочная кривая зависимости логарифмов молекулярных масс белков от величины их элюционных объемов: 1 - ферритин (450 кДа), 2 - каталаза (240 кДа), 3 - бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 4 - химотрипсиноген А (25 кДа), 5 - цитохром С (12,4 кДа), инулиназа I_2 фракции (28+29).

Результаты экспериментов по определению рН оптимумов изоферментов инулиназы I_1 и I_2 представлены на рис. 6 и свидетельствуют о наибольшей активности белков в диапазоне рН 4,5-5,5.

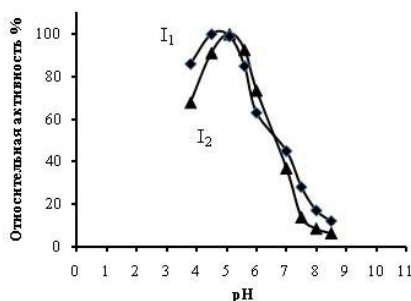


Рис. 6. Влияние рН на активность очищенных изоферментов инулиназы (I_1 , I_2) из клубней топинамбура.

Определение температурных оптимумов изоферментов инулиназы I_1 и I_2 в данной работе не проводилось, однако выявлено, что при температуре 4-5⁰ С оба изофермента продолжают гидролизовать инулин, при этом их активность в 3 раза ниже, чем при температуре 37⁰ С.

Таким образом, из экстракта клубней топинамбура (*H.tuberosus*) были выделены и очищены два изофермента инулиназы I_1 и I_2 , один из которых I_1 до гомогенного состояния. Схемы очистки для каждого фермента были подобраны индивидуально в зависимости от удельной активности исходного материала и содержания сопутствующих белков. В результате применения описанных нами методов очистки значение удельной активности ферментных препаратов I_1 и I_2 увеличилось в 21,9 и 2,48 раз, а общий выход составил 30,2 % и 20,1 % соответственно. Согласно результатам гель-фильтрации, изоферменты имеют молекулярную массу ~ 60 кДа и ~ 92 кДа. Для сравнения микробные инулиназы, выделенные из различных источников (бактерии, грибы, дрожжи), имеют молекулярную массу в диапазоне 50 ÷ 250 кДа [9, 15]. Полученные препараты изоинулиназ I_1 и I_2 проявляют максимальную активность в диапазоне рН 4,5-5,5, гидролизуют инулин и активны в отношении сахарозы.

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. Chen H.Q., Chen X.M., Chen T.X., Xu.X. M., Jin Z.Y. Extraction optimization of inulinase obtained by state fermentation of *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, Carbohydrate Polymers, 85, p. 446-451, 2011.
3. Edelman J. and Jefford T.G. The metabolism of fructose polymers in plants. 4. B-o-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. Biochem. J., 93, p. 148-161, 1964.
4. Дюкова К.Г., Измаилян М.С., Манукян Л.С., Кочикян В.Т. Разработка оптимальных условий выделения инулиназы из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*) Биолог. журн. Армении, 67, 4, 11-16, 2015.
5. Ertan F., Ekinci F., Actac T. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*, Pakistan Journal of Biological Sciences, 150, 6, p. 1332-1335, 2003b.
6. Gong F., Zhang T., Chi Z., Sheng J., Li J., Wang X. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by purified inulinase, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13, p. 533-539, 2008.
7. Kang S.I., Chang Y.J., Oh S.J., Kim S.I. Purification and properties of endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp., Biotechnology letters, 20, 10, p. 983-986, 1998.
8. Kushi R.T., Monti R., Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 25, p. 63-69, 2000.
9. Neagu C., Bahrum G. Inulinases – a versatile tool for biotechnology. Innovative Romanian Food Biotechnology, 9, p. 1-11, 2011.
10. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153, p. 357-380, 1944.
11. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Laboratory Techniques), Pharmacia Fine Chemicals – Upsala, 1983.
12. Rutherford P.P. and Deacon A.C. B-fructofuranosidases from Roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). Biochem. J., 126, p. 569-573, 1972.
13. Sharma A.D., Kainth S., Gill p.K. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp., Journal of Food Engineering, 77, p. 486-491, 2006.

14. Sheng J., Chi Z., Gong f., Li J. Purification and characterization of axtracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 144, p. 111-121, 2008.
15. Singh P., Gill P.K. Production of inulinases: resent advances. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, p. 151-162, 2006.
16. Somogyi M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, p. 19-23, 1952.
17. Warburg O., Christian W. Izolierung und cristallisation des Garungs-ferments endolase. *Biochem. Z.*, 310, p. 384, 1941.
18. Xiao R., Tanida M., Takao S. Inulinase from *Chrysosporum pannorum*, *Journal of Fermentation Technology*, 66, 5, p. 553-558, 1988.
19. Yu X., Guo N., Chi Z., Gong F., Sheng J., Chi Z. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal*, 43, p. 266-271, 2009.
20. Zhrebtsov N.A., Shelamova S.A., Abramova I.N. Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38, 6, p. 634-638. 2002.

Поступила 11.12.2015