

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ИНУЛИНАЗЫ *Saccharomyces
cerevisiae* ВГШ-2**

Г.П. Шуваева, Т.Р. Рутковская, О.С. Корнеева

ГОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия», г. Воронеж

Рецензент д-р биол. наук, профессор А.Т. Епринцев

Ключевые слова и фразы: гидролиз инулина; инактивация фермента; инулиназы; олигофруктозиды.

Аннотация: Определены оптимальные параметры каталитической активности дрожжевой эндо-инулиназы: рН 4,5–4,7; температура 45–47 °С при гидролизе инулина до олигофруктозидов. Исследована кислотная и термическая инактивация эндо-инулиназы. Установлено, что фермент проявляет наибольшую стабильность в зоне рН 4,0–5,0 и в интервале температур 30–40 °С.

Обозначения: *S.cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; гликозидазы – гликозидгидролазы.

В последние годы биокаталитические технологии становятся все более востребованными, так как количество ферментов, эффективно используемых в различных областях промышленности, растет очень быстро. Гликозидазы – одна из самых широко изучаемых групп ферментов. Эти ферменты катализируют расщепление гликозидных связей в олиго- и полисахаридах. Одними из представителей гликозидаз являются инулиназы – ферменты, расщепляющие фруктосодержащие олигосахариды и полимеры (фруктаны) до практически чистой фруктозы и фруктоолигосахаридов различной степени полимеризации.

Интерес к эндо-инулиназам вызван тем, что образующиеся в результате их каталитического действия фруктоолигосахариды обладают пребиотическими свойствами. Доказано, что инулин и олигофруктозиды избирательно стимулируют рост и метаболическую активность бифидо- и лактобактерий, не влияя на рост других бактерий и подавляя рост потенциально патогенных бактерий [1, 3]. Поскольку в последние годы инулиназы привлекли к себе внимание, вследствие их востребованности, современной

Шуваева Галина Павловна – кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология и биохимия»; Корнеева Ольга Сергеевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой «Микробиология и биохимия»; Рутковская Татьяна Ростиславовна – соискатель кафедры «Микробиология и биохимия», e-mail: taha2005@inbox.ru, ГОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия», г. Воронеж.

биотехнологии, производящей различные эндо- и экзо-гликозидазы для нужд пищевой промышленности, фармакологии, сельского хозяйства и других областей, фундаментальные знания об их структуре и свойствах необходимы для понимания многих процессов, происходящих в клетке.

Несмотря на многочисленные исследования инулиназы, данные по получению эндо-инулиназы и исследованию их физико-химических свойств немногочисленны [2, 4]. В связи с этим исследование физико-химических свойств эндо-инулиназы заслуживает внимания с прикладной точки зрения.

Объектом исследования служили селекционированные авторами дрожжи *S.cerevisiae* ВГШ-2, обладающие способностью к интенсивному биосинтезу эндо-инулазы [5]. Дрожжи культивировали жидкофазным способом на несменяемой среде (частота вращения 4 с^{-1} , уровень аэрации $1,4 \text{ г O}_2/\text{дм}^3$; температура $32\text{--}34 \text{ }^\circ\text{C}$; рН 4,8; объем питательной среды 100 см^3). По окончании выращивания (24 ч) дрожжи отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 мин, промывали водой, отпрессовывали до влажности 75 %.

Извлечение фермента осуществляли путем разрушения клеток дрожжей с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин в ледяной бане. Гомогенат использовали для получения водной вытяжки (10 %) путем настаивания в течение 20 мин при $(20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ и центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 мин *S.cerevisiae* охлаждали до $2\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$ и проводили очистку ферментного препарата. Очистка включала следующие стадии: осаждение из водной вытяжки изопропиловым спиртом в соотношении объемов 1:1,5 при температуре смеси $2\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$, ультрацентрифугирование и гель-фильтрации на сефадексе G-25 и G-100. Активность инулиназы определяли резорциновым методом по реакции Селиванова, используя в качестве субстрата инулин (Spofa, Прага).

Для выращивания дрожжей *S.cerevisiae* использовали питательную среду, %: дрожжевой экстракт – 2; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,8, фруктоза – 3; начальное значение рН среды 5,0; температура культивирования $30 \text{ }^\circ\text{C}$; продолжительность 30 ч.

Ранее нами было установлено, что дрожжи *S.cerevisiae* ВГШ-2 синтезируют внутриклеточную эндо-инулиназу. Изучение физико-химических свойств ферментов требует их высокой степени очистки. В результате очистки был получен ферментный препарат со степенью очистки 88,9 и удельной активностью 378,75 ед./г белка.

Важнейшими факторами, влияющими на устойчивость фермента в средах и имеющими значение в практическом использовании ферментов, являются рН и температура. Во многих случаях устойчивость ферментов к этим факторам является доминирующей перед их активностью. Эта характеристика имеет важное значение при применении ферментативного катализа, связанного с фактором времени.

Эксперименты по исследованию влияния температуры и рН на каталитическую активность инулиназы (рис. 1) показали, что температурный оптимум действия фермента лежит в пределах $43\text{--}46 \text{ }^\circ\text{C}$. Кривая рН-активности имеет характерную для многих ферментов колоколообразную форму с максимумом $4,5\text{--}4,7$.

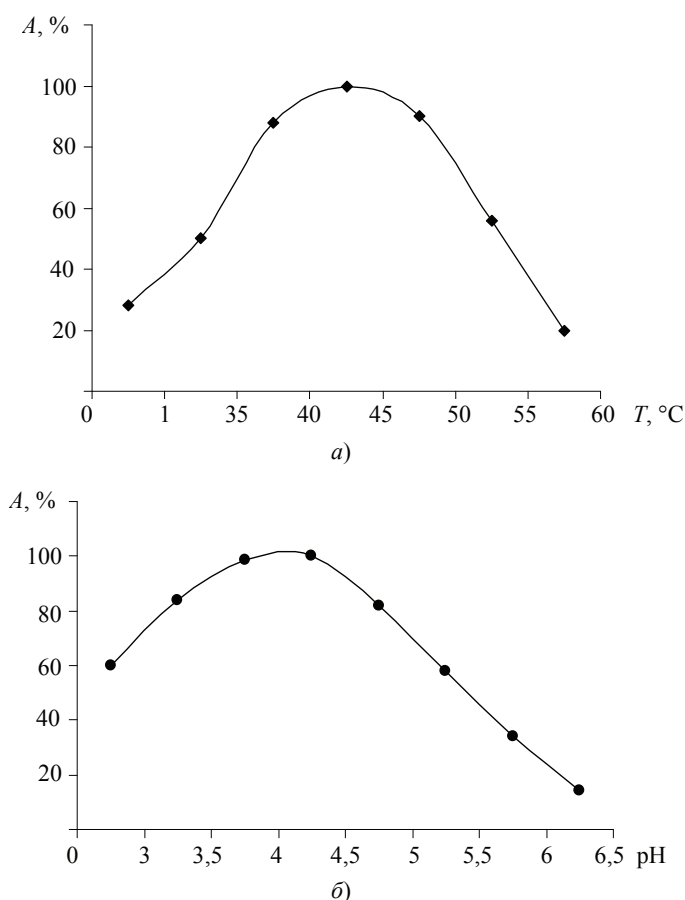


Рис. 1. Влияние на каталитическую активность инулиназы дрожжей *S.cerevisiae*: а – температуры; б – рН

В изучении механизма инактивации инулиназы можно получить ценную информацию по совместному действию на фермент температуры и рН среды. Инактивацию инулиназы *S.cerevisiae* ВГШ-2 исследовали в интервале рН 3,0–7,0 в 0,1 М ацетатном буфере. Раствор фермента инкубировали при 30–60 °С и через определенные промежутки времени определяли остаточную активность (табл. 1). Анализ экспериментальных данных показал, что при 40 °С и рН 4,0 в течение 48 ч сохранялось 80 % активности фермента, что свидетельствует о кислотоустойчивости инулиназы. При температуре 50 °С и рН 4,0 остаточная активность составляла около 80 % после 1 ч инкубации, на основании чего можно говорить и о достаточной термоустойчивости дрожжевой инулиназы *S.cerevisiae* ВГШ-2. Повышение температуры до 60 °С приводило к более резкой инактивации фермента.

Поскольку инактивация многих ферментов подчиняется реакции первого порядка [6], константу скорости инактивации (K) рассчитывали по формуле.

$$K = \frac{2,303}{\tau} \lg \frac{[E_0]}{[E]}, \quad (1)$$

Таблица 1

Изменение активности инулиназы под действием pH и температуры

$t, ^\circ\text{C}$	$\tau, \text{ч}$	pH			
		3,0	4,0	5,0	6,0
30	48	271	400	338	200
40	48	136	340	192	130
50	1,0	246	328	313	246
60	1,0	56	162	103	33

Таблица 2

Влияние температуры и pH на константу скорости инактивации (K) очищенной инулиназы *S. cerevisiae* ВГШ-2

$t, ^\circ\text{C}$	$K, \text{ч}^{-1}$ при pH			
	5,0	4,0	3,0	6,0
30	0,009	0,004	0,006	0,011
40	0,017	0,007	0,013	0,029
50	0,180	0,075	0,110	0,340
60	1,860	0,885	1,090	2,380

где $[E_0]$ – исходная активность инулиназы, принятая нами за 100 %; $[E]$ – активность фермента в момент времени τ , % от исходной.

Величину K находили как среднее из четырех-пяти определений. Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что инактивация инулиназы *S.cerevisiae* ВГШ-2 – типичная реакция первого порядка. Среднеквадратичная ошибка определений находилась в пределах от 1,0 до 2,5 %. Максимальное отклонение среднеарифметических значений величин K от ее частных значений не превышало 15 %, что вполне допустимо в исследованиях кинетики химических, тем более биохимических реакций. Данные (см. табл. 2) свидетельствуют о том, что наибольшую стабильность фермент проявлял в зоне pH 4,0–5,0 и в зоне температур 30–40 °С.

На основании полученных данных, можно сделать заключение о том, что по своим каталитическим свойствам эндо-инулиназа *S.cerevisiae* ВГШ-2 отличается от известных дрожжевых и бациллярных эндо-инулиназ большей кислото- и термоустойчивостью, что перспективно для ее практического применения.

Список литературы

1. Delzenne, N.M. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism / N.M. Delzenne, N. Kok // Am. J. Clin. Nutr. – 2001. – No. 73. – P 456–458.
2. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis / A.A. Kulminskaya [and others] // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – No. 1650. – P. 22–29.

3. Menne, E. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans / E. Menne, N. Guggenbuhl, M. Roberfroid // J. Nutr. – 2000. – No. 130. – P. 1197–1199.

4. Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications / A. Pandey [and others] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1999. – No. 81. – P. 35–52.

5. Пат. 21470034 Российская Федерация, МПК С 12 N1/16 ; С 12 R 1:865. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ВГШ-2 для бродильных производств / Шуваева Г.П., Гармонова Е.Л., Мальцева О.Ю. ; заявитель и патентообладатель Воронеж. гос. технолог. акад. – № 98121097/13 ; заявл. 23.11.1998 ; опубл. 27.03.2000, Бюл. № 9. – 233 с.

Investigation of Physical-Chemical Properties of Inulinase from *Saccharomyces cerevisiae* VGSH-2

G.P. Shuvaeva, T.R. Rudkovskaya, O.S. Korneeva

Voronezh State Technological Academy, Voronezh

Key words and phrases: enzyme inactivation; inulin hydrolysis; inulinase; oligosaccharides.

Abstract: Optimal parameters of yeast inulinase catalytic activity during inulin hydrolysis to oligosaccharides is determined: pH 4,5–4,7 and temperature 45–47 °C. Acid and thermal inactivation of endo-inulinase is studied. The maximal enzyme stability is detected at pH 4,0–5,0 and temperature 30–40 °C.

© Г.П. Шуваева, Т.Р. Рутковская,
О.С. Корнеева, 2010