

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ,
СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 577.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СВОЙСТВ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭНДОИНУЛИНАЗЫ,
ЭКЗОИНУЛИНАЗЫ, САХАРАЗЫ И α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ С

© 2022 г. О. А. Синицына^{1,*}, Е. А. Рубцова², Д. О. Осипов², Е. Г. Кондратьева², М. В. Семенова²,
А. И. Королев¹, Е. В. Ярошенко³, А. М. Рожкова², В. А. Немашкалов⁴, А. П. Синицын^{1,2}

¹Химический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

²Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные
основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

³ООО “ИстАгро Дон”, ИЦ Сколково, Москва, 143005 Россия

⁴Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
Российской академии наук, Московская область, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: oasinitsyna@gmail.com

Поступила в редакцию 08.12.2021 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принята к публикации 18.04.2022 г.

В результате клонирования генов *inuA*, *inu1*, *aglC* и *fopA*, кодирующих эндоинулиразу (эндоИНУ), экзоинулиразу (экзоИНУ), α -галактозидазу С (АГЛС) и сахаразу (САХ), в реципиентный штамм *Penicillium verrucosum* В1-537 (Δ *niaD*) получены рекомбинантные штаммы-продуценты, способные с высоким выходом продуцировать целевые рекомбинантные ферменты (32–50% от общего содержания внеклеточного белка). Получены и охарактеризованы ферментные препараты эндоИНУ, экзоИНУ, АГЛС и САХ. С помощью хроматографических методов выделены гомогенные (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) эндоИНУ, экзоИНУ, САХ и АГЛС с молекулярной массой 62, 56, 67 и 76 кДа соответственно. Гомогенная эндоИНУ имела высокую удельную активность по инулину топинамбура (56 ед/мг); экзоИНУ обладала активностью по инулину (17 ед/мг), сахарозе (850 ед/мг), раффинозе (41 ед/мг) и стахиозе (15 ед/мг); САХ – по сахарозе (10.5 ед/мг), раффинозе и стахиозе (3.8 и 1.4 ед/мг соответственно); АГЛС характеризовалась наличием активности по раффинозе и стахиозе (31 и 30 ед/мг соответственно), не проявляла сахаразной активности, но была высокоактивна по отношению к синтетическому субстрату *n*-нитрофенил- α -*D*-галактозиду (311 ед/мг). Определены кинетические параметры гидролитической активности гомогенных ферментов на соответствующих субстратах (k_{cat} и K_m). Температурный оптимум эндоИНУ составил 50–55°C, экзоИНУ – 55–65°C, АГЛС – 65°C, САХ – 35°C. ЭндоИНУ проявляла максимум активности при pH 6.5; экзоИНУ – при pH 4.5, АГЛС – при pH 4.5–5.0, а САХ – при pH 5.5–6.0. Изучена термостабильность ферментов при различной температуре. ЭндоИНУ эффективно гидролизовала инулин с образованием фруктоолигосахаридов со степенью полимеризации 3–8. ЭкзоИНУ количественно конвертировала инулин в глюкозо-фруктозный сироп (ГФС) с соотношением Глю : Фру = 1 : 3, а также сахарозу в ГФС с соотношением Глю : Фру примерно 1 : 0.63 (САХ гидролизовала сахарозу с таким же соотношением продуктов). Галактоолигосахариды сои (раффиноза и стахиоза) превращались в сахарозу и моносахариды (глюкозу, галактозу и фруктозу) под действием АГЛС, а совместное действие САХ и АГЛС приводило к полной конверсии до моносахаридов как раффинозы и стахиозы, так и сахарозы. Обработка галактоолигосахаридов ЭкзоИНУ приводила к такому же результату. Полученный фермент ЭкзоИНУ можно рассматривать в качестве перспективного для биотехнологического применения вследствие его широкой субстратной специфичности – он может быть использован как для получения ГФС из инулина и сахарозы, так и для деструкции галактоолигосахаридов сои.

Ключевые слова: эндоинулиаза, экзоинулиаза, α -галактозидаза, сахаразы, инулин, сахароза, галактоолигосахариды, *Penicillium verrucosum*

DOI: 10.56304/S0234275822020077

Список сокращений: GH (Glycosyl Hydrolase family) – семейство гликозилгидролаз; АГЛС – α -галактозидаза С; ВС – восстанавливающие сахара; Гал – галактоза; Глю – глюкоза; ГФС – глюкозо-фруктозный сироп; КЖ – культуральная жидкость; МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза; *n*НФГ – *n*-нитрофенил- α -*D*-галактозид; САХ – сахаразы; ФФС – фруктоолигосахариды; ФП – ферментный препарат; Фру – фруктоза; ЦБГ – целлобиогидролаза; ЭГ – эндоглюканаза; экзоИНУ – экзоинулиаза; эндоИНУ – эндоинулиаза; ЭСШ – экстрадированный соевый шрот; ЭФ-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле.

Ферменты находят широкое применение в пищевой промышленности для переработки продуктов сельского хозяйства [1, 2]. Среди них можно выделить группу карбогидраз, имеющих близкую групповую субстратную специфичность и гидролизующих α - и β -гликозидные связи в различных олиго- и полисахаридах. В эту группу входят эндоинулиназа (эндоИНУ), экзоинулиназа (экзоИНУ), сахараза (САХ) и α -галактозидаза С (АГЛС).

Эндоинулиназа (2,1- β -D-фруктанфруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7, семейство гликозилгидролаз 32, GH32) гидролизует по неупорядоченному механизму внутренние связи полифруктана (инулина) топинамбура, цикория, агавы и других инулинсодержащих растений с образованием в качестве основных продуктов фруктоолигосахаридов (ФОС), которые используются для получения продуктов функционального и лечебного назначения [3].

Экзоинулиназа (2,1- β -D-фруктанфруктогидролаза, КФ 3.2.1.80, GH32) гидролизует по процессивному механизму концевые β -2,1-фруктозидные связи инулина, а также сахарозу и применяется для производства из топинамбура, цикория, агавы и других инулинсодержащих растений фруктозы и глюкозо-фруктозных сиропов (ГФС) с повышенным содержанием фруктозы. Получаемые с помощью экзоИНУ сахара могут служить сырьем для производства широкого круга продуктов микробиологического синтеза: этанола, бутанола, молочной, лимонной и фумаровой кислот и др. [3, 4].

Сахароза (инвертаза, β -фруктофуранозидсаза, КФ 3.2.1.26, GH32) гидролизует 1,2- β -D-гликозидные связи сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы, а также катализирует гидролиз 1,2- β -гликозидных связей галактоолигосахаридов. САХ применяют для гидролиза (инверсии) сахарозы и получения ГФС [5].

α -Галактозидаза С (КФ 3.2.1.22, GH36C) гидролизует концевые невосстанавливающие α -D-галактозидные связи природных галактоолигосахаридов, наиболее распространены из которых раффиноза α -D-Гал-*p*-(1 \rightarrow 6)- α -D-Глю-*p*-(1 \rightarrow 2)- β -D-Фру-*f* и стахиоза α -D-Гал-*p*-(1 \rightarrow 6)- α -D-Гал-*p*-(1 \rightarrow 6)- α -D-Глю-*p*-(1 \rightarrow 2)- β -D-Фру-*f*, а также синтетические субстраты. Галактоолигосахариды присутствуют в сое и других бобовых, используемых в качестве компонентов кормов животных и птицы, практически не усваиваются организмом животных и птицы, вызывают метеоризм, снижение усвояемости питательных веществ и гипертрофию кишечника. В связи с этим для увеличения питательной ценности кормов необходимо их удаления или деструкция — это и есть практическое применение АГЛС [6, 7].

На основе реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* В1-537 (*ΔniaD*) нами созданы высокоактивные штаммы-продуценты экзоИНУ, эн-

доИНУ, САХ и АГЛС. Представлялось целесообразным провести сравнительный анализ активности, состава и свойств ферментных препаратов (ФП), полученных с помощью этих штаммов-продуцентов, а также свойств выделенных в гомогенном состоянии соответствующих ферментов и определить возможности их использования в различных областях биотехнологии.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы

В качестве субстратов в работе использовали инулин топинамбура (“Реахим”, Россия), сахарозу, раффинозу, стахиозу, *n*-нитрофенил- α -D-Гал (*n*НФГ) (Sigma-Aldrich, США).

Для приготовления буферных растворов и ферментационных сред использовали реактивы марок хч, чда и осч производства “Хеликон” и “Реахим” (Россия), а также Pharmacia (Швеция) и Sigma-Aldrich.

Генетические конструкции

Все генетические конструкции были разработаны по единой схеме и состояли из последовательно соединенных нуклеотидных последовательностей, соответствующих промоторному региону гена *cbh1* целлюлогидролазы-1 *P. verruculosum*, полноразмерному целевому гену и терминаторной области этого гена. Регуляторные области гена *cbh1* были амплифицированы ранее [8] и на их основе разработаны базовые векторы серии рСВН1 для клонирования и экспрессии гетерологичных генов [8–12]. Нуклеотидные последовательности, соответствующие полноразмерным целевым генам эндо ИНУ А (*inuA*), экзоИНУ (*inuI*), САХ (*fopA*) и АГЛС (*aglC*), амплифицировали методом ПЦР; в качестве матрицы использовали геномные ДНК штаммов *Aspergillus* sp. Геномные ДНК этих штаммов выделяли с помощью набора фирмы QIAGEN (США) по стандартным протоколам. Амплифицированные целевые гены встраивали в вектор рСВН1 с использованием методики независимого лигирования [13]. Таким образом были получены четыре конструкции для трансформации реципиентного штамма, отсутствие мутаций в этих конструкциях подтвердили секвенированием по методу Сэнгера в обоих направлениях нуклеотидной последовательности [14].

Трансформация реципиентного штамма

Трансформацию штамма *P. verruculosum* 537 (*ΔniaD*) и получение протопластов проводили по методике, описанной ранее [8]. В качестве котрансформирующей использовали плазмиду рСТА10, несущую ген нитратредуктазы, который обеспечивал комплементацию дефектного гена *niaD* в ре-

ципиентном штамме, что позволяло вести отбор трансформантов на среде с нитратом натрия.

Полученные трансформанты проанализированы на наличие и уровень биосинтеза целевых ферментов, а также концентрацию внеклеточного белка в культуральной жидкости (КЖ) после ферментации в колбах Эрленмейера (по методике [15]). Отобранные наиболее продуктивные по целевой активности трансформанты использованы для наработки сухих ФП после ферментации в 1-литровых ферментерах фирмы “Проинтех” (Россия) по методике [15]. Сухие ФП получали на лиофильной сушилке Virtis Benchtop 9L Pro (SP Scientific, США).

Контролем служил сухой ФП, полученный с помощью реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (*ΔniaD*).

Определение активности ферментов

Активность ФП и гомогенных ферментов по отношению к инулину, раффинозе, стахиозе и сахарозе определяли по начальной скорости гидролиза этих субстратов при их концентрации в реакционной смеси 5 г/л, при 50°C и pH 5.0 (время реакции 10 мин). Активность выражали в международных единицах: 1 единица соответствует образованию 1 мкмоль продукта (восстанавливающих сахаров, ВС) за 1 мин при действии ферментов на соответствующий субстрат; ВС определяли методом Шомоди–Нельсона (см. в работе [16]).

Активность по отношению к *n*НФГ (0.9 мМ в реакционной смеси) определяли по скорости образования *n*-нитрофенола в качестве продукта при 50°C и pH 5.0 (время реакции 10 мин). Реакцию останавливали раствором 1 М Na₂CO₃. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 мин [16].

Содержание белка

Содержание белка в ФП определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта БСА [17].

Электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ-ПААГ)

Электрофорез в денатурирующих условиях проводили на приборе Miniprotean Tetra cell с источником питания Model 300Xi (Bio-Rad Laboratories, США) по протоколу производителя. Для окрашивания белков в геле использовали краситель Coomassie-Brilliant Blue R-250 (Fergak, Германия). В качестве маркеров молекулярной массы белков (20–120 кДа) использовали коммерчески доступную смесь (#26612, Thermo Fisher Scientific, США).

Идентификация ферментов

Идентификацию ферментов проводили методом пептидного картирования после расщепления белка, содержащегося в соответствующей полосе геля после ЭФ-ПААГ, с помощью трипсина (Promega, США). MALDI-масс-спектрометрию трипсинового гидролизата проводили на времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в Центре коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН (Россия). Полученные масс-спектры триптических пептидов анализировали с помощью программы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), а также сопоставляли с продуктами протеолиза белков *in silico*, полученными с использованием программы PeptideMass (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>), исходя из известных аминокислотных последовательностей целевых ферментов.

Состав ФП

Для определения состава ФП проводили денситометрический анализ электрофореграмм ФП с помощью программы GelAnalyzer 2010a.

pH-профиль активности

Определение pH-профиля активности гомогенных ферментов и ФП проводили, измеряя их активность в диапазоне значений pH от 2.5 до 7.5, с шагом 0.5 единиц pH (при 50°C) по соответствующим субстратам: инулину для экзоИНУ и эндоИНУ, сахарозе для САХ и *n*НФГ для АГЛС. Для приготовления буферных растворов с заданными значениями pH использовали 0.1 М цитрат-фосфатный буфер. Результаты измерений отображали в процентах от максимального значения активности в pH-оптimumе.

Температурный профиль активности

Определение температурного профиля активности гомогенных ферментов и ФП проводили, измеряя их активность по соответствующим субстратам (см. пункт “pH-профиль активности”) при различных температурах (в диапазоне 4–80°C, с шагом 5–10°C) при pH 5.0. Результаты измерений отображали в процентах от максимального значения активности в температурном оптимуме.

Стабильность ферментов

Для определения стабильности гомогенных ферментов и ФП их растворы инкубировали при различных значениях температуры (при pH 5.0), отбирая через заданные промежутки времени

(15–30 мин) аликвоты реакционной смеси. Активность ферментов оценивали на соответствующих субстратах, как указано выше.

Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности (в процентах от исходной) от времени инкубации при определенном значении температуры.

Кинетические параметры

Кинетические константы ферментов определяли, используя следующие концентрации субстратов в реакционной смеси: 1–10 г/л для инулина, 0.018–0.090 М для сахарозы, 0.45–8.10 М для *n*НФГ – и гомогенных ферментов: 0.034 мг/мл эндоИНУ, 0.28 мг/мл экзоИНУ, 0.36 мг/мл САХ и 0.12 мг/мл АГЛС. Эксперименты проводили при 50°C и pH 5.0. Значения констант уравнения Михаэлиса–Ментен получали в результате обработки экспериментальных данных в координатах Лайнуивера–Берка.

Ферментативный гидролиз инулина, сахарозы и галактоолигосахаридов сои

Гидролиз инулина (100 г/л в реакционной смеси) проводили при 50°C и pH 5.0 (0.1 М ацетатный буфер) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (250 об/мин). В предварительных экспериментах была подобрана оптимальная доза ферментов, которая составила: 5 единиц активности (ед) на 1 г субстрата для эндоИНУ и 0.5 ед/г субстрата для экзоИНУ.

Гидролиз сахарозы (200 г/л в реакционной смеси) проводили при 50°C и pH 5.0. pH контролировали с помощью лимонной кислоты при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (250 об/мин). В предварительных экспериментах было показано, что для САХ оптимальной является доза 25 ед/г субстрата.

В качестве источника галактоолигосахаридов использовали экструдированный соевый шрот (ЭСШ; ООО “Фуд Индастриз”, Россия), полученный с помощью двухшнекового экструдера (Werner & Pfleiderer Continua, Германия) при 120°C. В предварительных экспериментах были выбраны следующие условия ферментативной обработки ЭСШ: 40°C, pH 5.0, гидромодуль 1 : 1, периодическое перемешивание; при этом для экзоИНУ и АГЛС доза 5 мг белка на 1 г ЭСШ (по сухой массе) была оптимальной.

Анализ углеводов

Для анализа продуктов гидролиза инулина, сахарозы и галактоолигосахаридов использовали ВЭЖХ (Agilent Technologies, США) с электрохимическим детектором ESA Coulochem III (Conquer Scientific, США) и системой компьютерной

регистрации. В качестве неподвижной фазы использовался анионообменную колонку Carborapak PA100 (Thermo Fischer Scientific) со 100 мМ NaOH в качестве подвижной фазы. Элюирование проводили в градиенте концентраций ацетата натрия – от 0 до 500 мМ – в течение 20 мин. Калибровочные графики строили по глюкозе, галактозе, фруктозе, сахарозе, раффинозе, стахиозе (Sigma-Aldrich и Merck, Германия). Растворы, использовавшиеся в качестве элюентов для хроматографии, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, США) и тщательно дегазировали. Перед проведением хроматографического анализа пробы предварительно центрифугировали при 14 000 g в течение 4 мин.

Выделение ферментов в гомогенном виде

Для выделения целевых белков использовали жидкостную хроматографию на приборе NGC Chromatography Systems (Bio-Rad Laboratories) с УФ-детектором. Белок (100 мг в 10 мл) осаждали из раствора 80%-ным (от насыщения) раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, обессоливали на колонке с BioGel P4 (Bio-Rad Laboratories) и наносили на анионообменную колонку Source 15Q объемом 10 мл (Pharmacia), уравновешенную буфером 0.02 М Трис-НСl (pH 6.8). Связавшиеся с носителем белки элюировали в линейном градиенте концентраций NaCl (от 0 до 0.4 М) со скоростью 5 мл/мин. Во фракциях анализировали наличие целевой ферментативной активности и проводили ЭФ-ПААГ.

Далее фракции, содержащие целевые ферменты, подвергали гидрофобной хроматографии на колонке Source 15 Isopropyl объем 10 мл (Pharmacia). Образец предварительно “засаливали” $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации 1.7 М и наносили на колонку, уравновешенную 0.05 М Na-ацетатным буфером (pH 5.0), содержащим 1.7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Связавшиеся с носителем белки элюировали в обратном линейном градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – от 1.7 до 0 М – при скорости 1.5 мл/мин. Во фракциях анализировали наличие целевой ферментативной активности и проводили ЭФ-ПААГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение штаммов-продуцентов

Для получения рекомбинантных штаммов-продуцентов целевых ферментов в качестве реципиентного использовали штамм *P. verrucosum* В1-537 (*ΔniaD*). Для обеспечения экспрессии целевых генов генетические конструкции содержали целевые кодирующие последовательности, связанные с сильным индуцибельным промотором и терминатором гена *cbh1* – целлобиогидролазы-1, одного из основных ферментов, продуцируемых *P. verrucosum* [9].

Таблица 1. Активность ферментных препаратов
Table 1. The activity of enzyme preparations

Номер	Препарат	Белок, мг/г	Ферментативная активность, ед/мг				
			субстраты				
			инулин	сахароза	раффиноза	стахиоза	nНФГ
3.420Н	Контроль, В1-537	873 ± 15	39 ± 3	8 ± 0,5	17 ± 1	25 ± 2	26 ± 2
3.615.1	ЭндоИНУ	269 ± 10	12900 ± 100	78 ± 4	235 ± 10	72 ± 2	7 ± 1
3.413.1	ЭкзоИНУ	467 ± 12	29300 ± 200	59000 ± 300	36400 ± 200	9290 ± 50	137 ± 7
3.368.Н	САХ	405 ± 12	41 ± 3	4240 ± 50	1540 ± 20	550 ± 15	53 ± 4
3.518.3	АГЛС	399 ± 12	74 ± 4	25 ± 2	12400 ± 100	12100 ± 100	124300 ± 500

Таблица 2. Удельная активность ферментных препаратов
Table 2. Specific activity of enzyme preparations

Номер	Препарат	Удельная гидролитическая активность, ед/мг белка				
		субстраты				
		инулин	сахароза	раффиноза	стахиоза	nНФГ
3.420Н	Контроль, В1-537	0.04 ± 0.003	0.01 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.030 ± 0.002	0.030 ± 0.002
3.615.1	ЭндоИНУ	48 ± 3	0.29 ± 0.03	0.87 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.030 ± 0.002
3.413.1	ЭкзоИНУ	63 ± 4	126 ± 7	78 ± 5	20 ± 2	0.29 ± 0.03
3.368.Н	САХ	0.100 ± 0.005	11.0 ± 0.5	3.8 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.13 ± 0.01
3.518.3	АГЛС	0.19 ± 0.01	0.060 ± 0.004	31 ± 3	30 ± 3	312 ± 10

В результате трансформации реципиентного штамма плазмидой, содержащей гетерологичный ген эндоИНУ А (*inuA*) *Aspergillus niger* (62 кДа, рI 2.8), был создан высокоактивный штамм-производитель эндоИНУ – *P. verruculosum*-эндоИНУ. При культивировании этого штамма в лабораторных 1-литровых ферментерах в КЖ содержалось более 400 ед/мл эндоинулиназной активности, определенной при использовании инулина топинамбура в качестве субстрата.

Трансформация реципиентного штамма плазмидой, содержащей гетерологичный ген экзоИНУ-1 (*inu1*) *A. awamori* (экзоИНУ, 56 кДа, рI 4.3), привела к созданию высокоактивного штамма-производителя экзоИНУ *P. verruculosum*-экзоИНУ. При культивировании этого штамма в лабораторных 1-литровых ферментерах в КЖ содержалось более 2500 ед/мл экзоинулиназной активности (по инулину топинамбура).

С использованием плазмиды, содержащей гетерологичный ген *aglC* АГЛС *A. niger* (76 кДа, рI 4.8), был создан высокоактивный штамм-производитель АГЛС *P. verruculosum*-АГЛС, с помощью которого при культивировании в лабораторных 1-литровых ферментерах в КЖ получали около 28000 ед/мл α-галактозидазной активности,

определенной с использованием nНФГ в качестве субстрата.

Наконец, с использованием плазмиды, содержащей гетерологичный ген *fopA* САХ *A. oryzae* (67 кДа, рI 6.2), был создан высокоактивный штамм-производитель САХ *P. verruculosum*-САХ, при культивировании которого в лабораторных ферментерах получали около 400 ед/мл сахарозной активности в КЖ.

Активность ферментных препаратов

Лабораторные ФП представляли собой лиофильно высушенные КЖ, полученные с помощью соответствующих штаммов-производителей в 1-литровых ферментерах. Активности сухих ФП эндоИНУ, экзоИНУ, САХ, АГЛС, а также ФП, произведенного с помощью реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (*ΔniaD*) (контроль), представлены в табл. 1.

ФП эндоИНУ проявлял высокую гидролитическую активность при использовании в качестве субстрата инулина топинамбура и низкую по отношению к сахарозе, галактоолигосахаридам и nНФГ.

По сравнению с другими ФП экзоИНУ характеризовался наиболее высокой активностью по отно-

шению к инулину топинамбура, сахарозе, раффинозе и стахиозе и низкой относительно *n*НФГ.

ФП САХ с низкой эффективностью гидролизовал инулин топинамбура, с высокой — сахарозу и снижающуюся в ряду раффиноза, стахиоза, *n*НФГ.

ФП АГЛС проявлял высокую и практически одинаковую активность по отношению к раффинозе и стахиозе, крайне высокую к *n*НФГ и очень низкую к инулину топинамбура и сахарозе.

Отметим, что контрольный ФП, полученный с помощью реципиентного штамма, проявлял низкую активность по отношению к использованным для проверки активности рекомбинантных ФП субстратам.

В табл. 2 приведены удельные активности полученных ФП (ед/мг белка). Самая высокая удельная активность по отношению к инулину топинамбура зарегистрирована для ФП экзоИНУ, для ФП эндоИНУ она на 23% ниже. Самая высокая сахараз-

ная удельная активность зарегистрирована для ФП экзоИНУ среди исследуемых нами ФП, причем она заметно превышала таковую для ФП САХ. Кроме того, ФП экзоИНУ проявлял существенно более высокую удельную активность по отношению к раффинозе и стахиозе, чем ФП АГЛС. Удельная активность последнего была максимальна в отношении синтетического субстрата, *n*НФГ, среди исследованных ФП.

Состав ферментных препаратов

На рис. 1 приведены результаты анализа белкового состава ФП эндоИНУ, экзоИНУ, САХ, АГЛС с помощью ЭФ-ПААГ, а также контрольного ФП, полученного на основе реципиентного штамма. Электрофореграммы рекомбинантных ФП характеризуются наличием мажорных полос, соответствующих молекулярным массам целевых рекомбинантных ферментов (и существенно отличаются от электрофореграммы ФП реципиентного штамма).

Белковые полосы, соответствующие целевым ферментам, вырезали, обрабатывали трипсином, полученные гидролизаты исследовали с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Установлено, что полосы на электрофореграмме (рис. 1), соответствующие 62, 56, 67 и 76 кДа, принадлежат соответственно эндоИНУ, экзоИНУ, САХ и АГЛС (данные не приведены).

Компонентный состав сухих рекомбинантных и контрольного ФП, определенный методом денситометрического анализа электрофореграмм, полученных с помощью ЭФ-ПААГ, приведен в табл. 3. Отметим, что контрольный ФП, полученный на основе реципиентного штамма, содержал значительное количество целлюбиогидролаз (ЦБГ1 и ЦБГ2) — 60% от общего белка, в его состав входили также эндоглюканазы (ЭГ, 12%) и другие ферменты (28%). Состав рекомбинантных ФП существенно изменился по сравнению с контролем из-за наличия в них целевых рекомбинантных ферментов. Так, содержание эндоИНУ в соответствующем ФП составило около 40% (от общего белка), экзоИНУ в ФП — 50%, САХ в ФП — около 30%, АГЛС в ФП — 40%. Содержание собственных ферментов реципиентного штамма в рекомбинантных ФП было снижено (ЦБГ суммарно — до 40–45%, ЭГ суммарно — до 6–8%, других ферментов — до 3–20%). Изменение состава рекомбинантных ФП с точки зрения наличия в них значительного количества целевых ферментов хорошо коррелирует с уровнем их активности по специфическим субстратам.

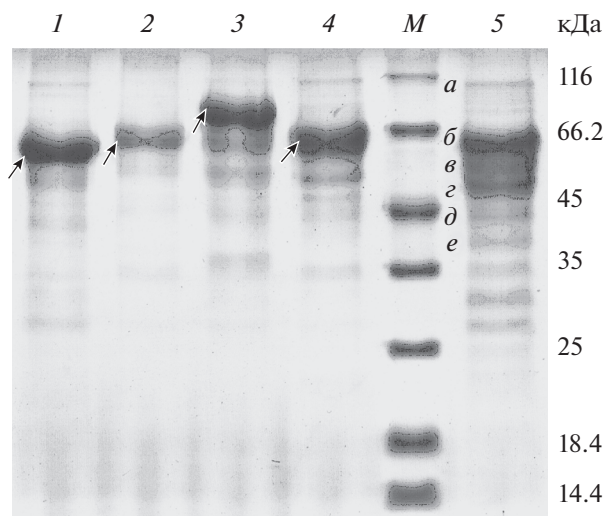


Рис. 1. Электрофоретический анализ ферментных препаратов. Электрофореграмма ФП: 1 — экзоИНУ, 2 — эндоИНУ, 3 — АГЛС, 4 — САХ, 5 — контроль (ФП, полученный в реципиентном штамме *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$)). М — маркеры молекулярной массы белков. На треках 1–4 стрелками отмечены целевые рекомбинантные ферменты. На треке 5: а — β -глюкозидаза; б — целлюбиогидролаза-1 (ЦБГ1, тяжелая форма); в — ЦБГ1 (легкая форма); г — ЦБГ2 (тяжелая форма); д — ЦБГ2 (легкая форма); е — эндоглюканаза-2 (ЭГ2).

Fig. 1. Electrophoretic analysis of enzyme preparations (EP). 1 — exoinulinase (exoINU), 2 — endoinulinase (endoINU), 3 — α -galactosidase C (AGLC), 4 — sucrose (SUC), 5 — control (EP produced by the recipient strain *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$)). M — protein molecular mass markers. Target recombinant enzymes are marked by arrows on tracks 1–4; on track 5: a — β -glucosidase; b — cellobiohydrolase-1 (CBH1, a heavy form); c — CBH1 (a light form); d — CBH2 (a heavy form); e — CBH2 (a light form); f — endoglucanase-2 (EG2).

Таблица 3. Содержание ферментов в различных ФП
Table 3. Enzyme content in various enzyme preparations

Штамм-производитель ФП	Содержание фермента, % от общего белка						
	эндоИНУ	экзоИНУ	САХ	АГЛС	ЦБГ	ЭГ	другие
<i>P. verruculosum</i> B1-537	—	—	—	—	60	12	28
<i>P. verruculosum</i> -эндоИНУ	38	—	—	—	45	6	13
<i>P. verruculosum</i> -экзоИНУ	—	50	—	—	40	7	3
<i>P. verruculosum</i> -САХ	—	—	32	—	40	8	20
<i>P. verruculosum</i> -АГЛС	—	—	—	40	40	7	13

Таблица 4. Удельная активность гомогенных ферментов
Table 4. Specific activity of the homogeneous enzymes

Фермент	Удельная гидролитическая активность*, ед/мг белка				
	субстраты				
	инулин	сахароза	раффиноза	стахиоза	<i>n</i> НФГ
ЭндоИНУ	56 ± 3	0	0	0	0
ЭкзоИНУ	17 ± 1	850 ± 20	41 ± 2	15 ± 1	0
САХ	0	78 ± 4	0	0	0
АГЛС	0	0	20 ± 1	27 ± 1	387 ± 11

*Примечание: Реакции проводили при 50°C и pH 5.0.

*Note: The reactions were carried out at 50°C and pH 5.0.

Выделение и свойства гомогенных ферментов

Гомогенные целевые ферменты выделяли из соответствующих ФП. На первой стадии проводили фракционирование предварительно обессоленных ФП на анионообменнике Source 15Q. Фракции, обладающие целевыми активностями, использовали для выделения гомогенных ферментов с помощью гидрофобной хроматографии на колонке Source 15 Isopropyl. В результате целевые ферменты были получены в гомогенном виде (рис. 2).

Удельная активность гомогенных ферментов по отношению к различным субстратам приведена в табл. 4. Удельная активность эндоИНУ по отношению к инулину топинамбура была примерно в 3 раза выше, чем таковая для экзоИНУ. Удельная активность экзоИНУ по сахарозе была в 50 раз выше, чем активность этого же фермента по инулину. Важно заметить, что удельная активность гомогенной САХ по сахарозе в 13 раз ниже, чем для экзоИНУ. Удельная активность экзоИНУ по раффинозе и стахиозе была сопоставима с таковой для АГЛС. Отметим также высокое значение удельной активности АГЛС по *n*НФГ. В целом, данные по удельной активности гомогенных ферментов находятся в полном соответствии с данными, приведенными в табл. 1 и 2, характеризующими активности соответствующих ФП.

В ходе исследования определены кинетические параметры гидролиза соответствующих субстратов гомогенными ферментами (табл. 5). Значение параметра k_{cat}/K_m , характеризующего эффективность гидролиза потенциального субстрата, для экзоИНУ по инулину было почти на порядок выше, чем для

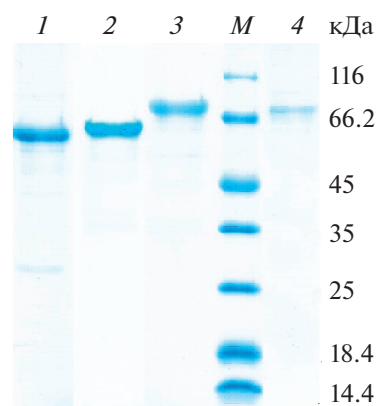


Рис. 2. Электрофоретический анализ гомогенности целевых белков. Электрофореграммы очищенных ферментов: 1 – экзоИНУ, 2 – эндоИНУ, 3 – АГЛС, 4 – САХ. М – белки-маркеры молекулярной массы.
Fig. 2. Electrophoretic analysis of homogeneous enzymes. Electropherograms of purified enzymes: 1 – exoINU, 2 – endoINU, 3 – AGLC, 4 – SUC. M – protein molecular mass markers.

Таблица 5. Значения кинетических параметров для гомогенных ферментов
Table 5. Values of kinetic parameters for the homogeneous enzymes

Параметр ^a	ЭндоИНУ (по инулину)	ЭкзоИНУ (по инулину)	ЭкзоИНУ (по сахарозе)	САХ (по сахарозе)	АГЛС (по <i>n</i> НФГ)
k_{cat}, c^{-1}	60 ± 3	82 ± 4	760 ± 30	0.34 ± 0.02	773 ± 18
$K_m, г/л, M^b$	39 ± 2	5.2 ± 0.3	0.10 ± 0.01	0.014 ± 0.001	0.001 ± 0.0001
$k_{cat}/K_m, л г^{-1} c^{-1}, M^{-1} c^{-1} c^c$	1.5 ± 0.1	15.8 ± 1.0	7600 ± 50	24.3 ± 1.5	773000 ± 500

Примечание: ^a Реакции проводили при 50°C и pH 5.0; ^b г/л – для гидролиза инулина, М – для гидролиза сахарозы и *n*НФГ; ^c л г⁻¹ с⁻¹ – для гидролиза инулина, М⁻¹ с⁻¹ – для гидролиза сахарозы и *n*НФГ.

Note: ^a The reactions were carried out at 50°C and pH 5.0, ^b g/L – for inulin hydrolysis, M – for sucrose and *p*NPhG hydrolysis, ^c (g/L)⁻¹ s⁻¹ – for inulin hydrolysis, M⁻¹ s⁻¹ – for sucrose and *p*NPhG hydrolysis.

Таблица 6. Оптимальные значения температуры и pH для гомогенных ферментов*
Table 6. Optimal temperature and pH values for the homogeneous enzymes*

Фермент	$T_{opt}, °C$	$T_{80}, °C$	pH _{опт}	pH ₈₀
ЭндоИНУ	50–55	40–60	6.5	6.0–7.0
ЭкзоИНУ	55–65	45–70	4.5	4.0–5.5
АГЛС	60	45–62	4.5–5.0	4.0–6.0
САХ	35	30–40	5.5–6.0	5.0–6.5

**Примечание:* Зависимость активности ферментов от температуры определяли при pH 5.0; зависимость от pH – при температуре 50°C. Субстраты: инулин для экзоИНУ и эндоИНУ, сахароза для САХ и *n*НФГ для АГЛС.

**Note:* The dependence of enzyme activity on temperature was determined at pH 5.0; dependence on pH was determined at 50°C. Substrates: inulin for exoINU and endoINU, sucrose for SUC, and *p*NPhG for AGLC.

эндоИНУ. При использовании сахарозы в качестве субстрата значение k_{cat}/K_m для экзоИНУ более чем в 300 раз превосходило таковое для САХ. Обращает на себя внимание очень высокое значение k_{cat}/K_m для АГЛС при использовании *n*НФГ в качестве субстрата.

Температурный оптимум эндоИНУ составил 50–55°C (табл. 6); значение T_{80} (диапазон температуры, в котором активность была не менее 80% от максимальной) составило 40–60°C. Температурный оптимум экзоИНУ наблюдали при 55–65°C (T_{80} 45–70°C), АГЛС – при 60°C (T_{80} 45–62°C), а самое низкое значение T_{opt} (35°C) зарегистрировано для САХ (T_{80} 30–40°C).

Все исследованные ферменты проявляли максимальную гидролитическую активность в нейтральной и слабокислой области. Наибольшую активность для эндоИНУ регистрировали при pH 6.5; значение pH₈₀ (диапазон pH, в котором активность была не менее 80% от максимальной) со-

ставляло 6.0–7.0. pH-оптимум экзоИНУ составил 4.5 (pH₈₀ 4.0–5.5); pH-оптимум для АГЛС находился в диапазоне 4.5–5.0 (pH₈₀ 4.0–6.0), для САХ – 5.5–6.0 (pH₈₀ 5.0–6.5).

Отметим, что значения температурных и pH-оптимумов, а также значения T_{80} и pH₈₀ для гомогенных ферментов и соответствующих ФП совпадали.

Таким образом, исследуемые гомогенные ферменты и соответствующие ФП характеризовались значениями T_{80} в близких диапазонах, это же касалось и значений pH₈₀ (за исключением САХ – фермента, для которого температурный оптимум был ниже, чем для других ферментов).

Нами изучена стабильность гомогенных ферментов при различной температуре (табл. 7). ЭндоИНУ проявляла относительно высокую стабильность: при инкубировании раствора фермента при температуре 40 и 50°C его активность практически не изменялась в течение 180 мин и умень-

Таблица 7. Стабильность гомогенных ферментов при различной температуре (pH 5.0)*
Table 7. Stability of the homogeneous enzymes at different temperatures (pH 5.0)*

Фермент	Температура, °С	Остаточная активность после 3 ч инкубации, %
ЭндоИНУ	40	100
	50	100
	60	40
	70	30
ЭкзоИНУ	40	100
	50	90
	60	65
	70	10
АГЛС	40	30
	50	20
	60	7
	70	—
САХ	40	30 (15 мин)
	50	5 (5 мин)
	60	—
	70	—

*Примечание: Субстраты для определения остаточной активности: инулин для экзоИНУ и эндоИНУ, сахароза для САХ и *p*НФГ для АГЛС.

*Note: Substrates for determination of residual activity: inulin for exoINU and endoINU, sucrose for SUC, and *p*NPhG for AGLC.

шалась до 40 и 30% от исходной при температуре 60 и 70°С соответственно. Активность экзоИНУ сохранялась практически на исходном уровне (90–100%) в течение 180 мин при 40–50°С и сни-

жалась до 65 и 10% от исходной при 60 и 70°С соответственно. Фермент АГЛС оказался менее стабильным: через 180 мин инкубации при температуре 40–50°С его активность снижалась до 30–20%

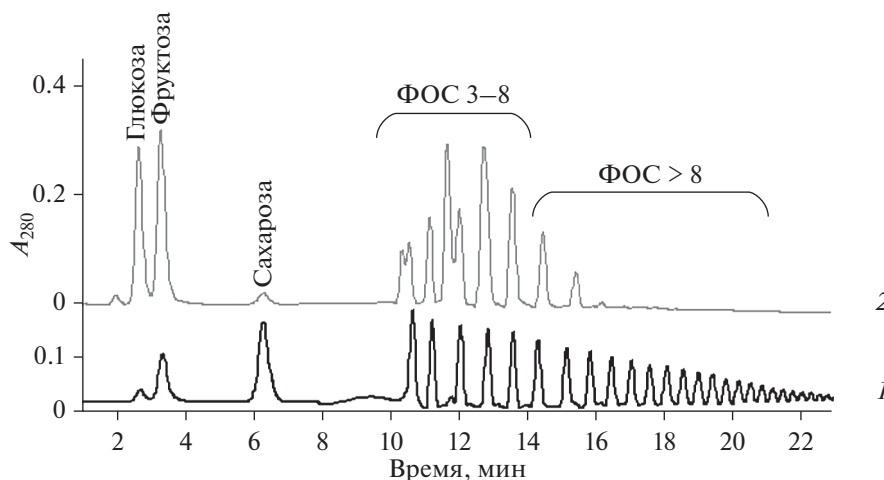


Рис. 3. ВЭЖХ-анализ продуктов реакции, образующихся из инулина топинамбура под действием гомогенной эндоИНУ. Реакционную смесь: 100 г/л инулина, 5 единиц активности эндоИНУ на 1 г субстрата – инкубировали при 50°С и pH 5.0 в течение 3 ч. 1 – инулин, 2 – продукты гидролиза инулина.

Fig. 3. HPLC analysis of products formed from topinambur inulin treated with homogeneous endoINU. The reaction mixture, 100 g/L inulin and 5 units of endoinulinase activity per 1 g substrate, was incubated at 50°С and pH 5.0 for 3 h. 1 – inulin, 2 – products of inulin hydrolysis.

Таблица 8. Состав сахаров в ферментативных гидролизатах ЭСШ под действием гомогенных ферментов
Table 8. The composition of sugars in enzymatic hydrolysates of extruded soybean meal (ESM) under the action of homogeneous enzymes

Ферменты	Содержание сахаров, мг/г ЭСШ ^a			
	моносахариды ^b	сахароза	раффиноза	стахиоза
Контроль	9.9	75.8	17.2	58.1
АГЛС	86.6	90.5	0.3	0.8
АГЛС + САХ	186.1	0.2	0.1	0.3
САХ	89.0	0.2	17.1	58.0
ЭкзоИНУ	186.3	0.2	0.1	0.3

Примечание: ^a Расчет проведен по сухой массе; ^b глюкоза, галактоза, фруктоза.

Note: ^a The calculation was carried out on a basis of dry weight (in mg per 1 g of ESM); ^b glucose, galactose, fructose.

от исходной, при 60°C – до 7%, а при 70°C наблюдалась полная инактивация. Фермент САХ проявлял очень низкую стабильность: при инкубировании в течение 15 мин при 40°C сохранялось 30% исходной активности, после 5 мин при 50°C – 5% активности, а при более высоких температурах фермент был нестабилен.

Отметим, что параметры, характеризующие термостабильность гомогенных ферментов и соответствующих ФП, совпадали.

При обработке инулина топинамбура (100 г/л) гомогенным ферментом эндоИНУ (5 ед/г субстрата) при 50°C и pH 5.0 в течение 3 ч происходил полный гидролиз субстрата. По данным ВЭЖХ, продуктами гидролиза были преимущественно ФОС со степенью полимеризации 3–8 и в меньшем количестве ФОС с более высокой степенью полимеризации. Кроме того, в реакционной смеси идентифицировали сахарозу (в невысокой концентрации), фруктозу и глюкозу (рис. 3). Исходный субстрат содержал ФОС, сахарозу, фруктозу и глюкозу в низкой концентрации.

При 50°C и pH 5.0 гомогенный фермент экзоИНУ (0.5 ед/г субстрата) за 3 ч количественно гидролизировал инулин топинамбура (100 г/л) с образованием ГФС с соотношением Глю : Фру примерно 1 : 3 (данные ВЭЖХ не приведены). В тех же условиях проведения реакции при использовании в качестве субстрата сахарозы (200 г/л) фермент экзоИНУ (25 единиц сахарозной активности на 1 г субстрата) количественно конвертировал сахарозу в ГФС с соотношением Глю : Фру примерно 1 : 0.63 (данные ВЭЖХ не приведены). Таким образом, ГФС, полученный из инулина, был существенно обога-

щен фруктозой по сравнению с продуктом, полученным из сахарозы.

Гомогенный фермент САХ, как и экзоИНУ, количественно конвертировал сахарозу (200 г/л, 25 единиц сахарозной активности на 1 г субстрата, 50°C, pH 5.0) в течение 3 ч с получением ГФС, аналогичного по составу полученному под действием экзоИНУ (из-за меньшей термостабильности САХ процесс проводили при температуре ниже, чем в случае экзоИНУ; кроме того, расход САХ по массе был примерно в 11 раз выше, чем экзоИНУ из-за различий в удельной сахарозной активности двух ферментов; см. табл. 4).

Для исследования возможностей использования соответствующих гомогенных ферментов для конверсии галактоолигосахаридов сои в качестве сырья был использован ЭСШ (обработку ЭСШ проводили в течение 6 ч при 40°C и pH 5.0 при концентрации каждого фермента 5 мг/г субстрата). Продукты ферментативной обработки ЭСШ анализировали методом ВЭЖХ.

Исходный образец ЭСШ содержал в своем составе стахиозу, раффинозу, сахарозу, а также моносахариды (глюкозу и фруктозу) (табл. 8). Обработка ЭСШ ферментом АГЛС приводила к практически полной деструкции раффинозы и стахиозы, образованию моносахаридов (глюкозы, фруктозы и галактозы) и значительного количества сахарозы (АГЛС не обладает сахарозной активностью, см. табл. 4). Совместное применение АГЛС и САХ приводило к полной конверсии до моносахаридов как раффинозы и стахиозы, так и сахарозы (табл. 8). Отметим, что использование только САХ приводило к гидролизу сахарозы, но не меняло содержания

в ЭСШ раффинозы и стахиозы, так как САХ не гидролизует эти олигосахариды (табл. 4). Наконец, обработка ЭСШ только экзоИНУ давала тот же результат, как и совместное действие АГЛС и САХ: полная деструкция раффинозы, стахиозы и сахарозы до моносахаридов (табл. 8).

Таким образом, можно заключить, что экзоИНУ, вследствие широкой специфичности и высокой гидролитической активности, представляет собой наиболее ценный с точки зрения применения в биотехнологии ферментный препарат. Экзоинулиназа эффективно гидролизует инулин, а также проявляет высокую α -галактозидазную и сахаразную активность. В связи с этим фермент может быть с одинаковым успехом использован для получения глюкозо-фруктозного сиропа из инулина, для инверсии сахарозы, а также для деструкции галактоолигосахаридов сои и борьбы с антипитательными факторами кормов сельскохозяйственных животных и птиц.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание № 0104-2019-0009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Handbook of Food Enzymology. Eds J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong. N.Y.: CRC Press, 2002, 1108 p.
<https://doi.org/10.1201/9780203910450>
- Chi Z.-M., Zhang T., Cao T.-S., et al. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Biores. Tech.*, 2011, 102(6), 4295–4303.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.086>
- Волков П.В., Сеницына О.А., Федорова Е.А. и др. Выделение и свойства рекомбинантных инулиназ *Aspergillus* sp. *Биохимия*, 2012, 77(5), 611–621.
<https://doi.org/10.1134/S0006297912050094>
- Холявка М.Г. Исследование физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирования ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения. Дис. д-ра биол. наук, Воронежский государственный университет, Воронеж, 2018.
- Quenteau Y., Jarosz S., Lewandowski B., Fitremann J. Sucrose chemistry and applications of sacrochemicals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2007, 61, 217–292.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(07\)61005-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(07)61005-1)
- Сеницына О.А., Федорова Е.А., Вакар И.М. и др. Выделение и свойства β -галактозидаз *Penicillium sa-*
nescens. *Биохимия*, 2008, 73(1), 127–138.
<https://doi.org/10.1134/S000629790801015x>
- Soybean and Nutrition. Ed. H.A. El-Shemy. Croatia: InTech, 2011, 486 p.
<https://doi.org/10.5772/1008>
- Сеницын А.П., Сеницына О.А., Рожкова А.М. Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы гриба *Penicillium verrucosum*. *Биотехнология*, 2020, 36(6), 17–34.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-17-34>
- Сеницын А.П., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Penicillium verrucosum* (варианты) и способ получения ферментного препарата и его использование (варианты). Патент RU 2646136 С2, Опубл. 01.03.2018.
- Сеницын А.П., Рожкова А.М., Сеницына О.А. и др. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках мицелиального гриба *Penicillium verrucosum*, используемого в качестве хозяина, способ получения штамма гриба *Penicillium verrucosum* и способ получения ферментного препарата. Патент RU 2378372 С2, Опубл. 10.01.2010.
- Volkov P.V., Gusakov A.V., Rubtsova E.A., et al. Properties of recombinant GH49 family dextranase heterologously expressed in two recipient strains of *Penicillium* species. *Biochimie*, 2019, 157, 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.010>
- Volkov P.V., Rubtsova E.A., Rozhkova A.M., et al. Properties of recombinant endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* and its application in the pustulan hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, 2021, 499, 108211.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108211>
- Aslanidis C., de Jong, P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18, 6069–6074.
<https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6069>
- Sanger F., Coulson A. R., Barrell B. G., et al. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.*, 1980, 143, 161–178.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90196-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90196-5)
- Сеницын А.П., Рубцова Е.А., Шашков И.А. и др. Получение и свойства новых биокатализаторов, предназначенных для разрушения некрахмальных растительных полисахаридов. *Катализ в промышленности*, 2017, 17(4), 331–338.
<https://doi.org/10.18412/1816-0387-2017-4-331-338>
- Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. В сб.: Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. Москва: ВИНТИ, 1990, 25, 30–37.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. Москва: Мир, 1991, 544 с.

Comparative Analysis of Properties of Recombinant Endoinulinase, Exoinulinase, Sucrase and Alpha-Galactosidase C

O. A. Sinitsyna^{a, #}, E. A. Rubtsova^b, D. O. Osipov^b, E. G. Kondratieva^b, M. V. Semenova^b, A. I. Korolev^a, E. V. Yaroshenko^c, A. M. Rozhkova^b, V. A. Nemashkalov^d, and A. P. Sinitsyn^{a, b}

^aFaculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^bFundamentals of Biotechnology” Federal Research Centre,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^cEastAgroDon LLC, IC, Skolkovo, Moscow, 143005 Russia

^dG.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Russian Academy of Sciences, Moscow Oblast, Pushchino, 142290 Russia

[#]e-mail: oasinitsyna@gmail.com

Abstract—As a result of cloning of the *inuA*, *inuI*, *aglC*, and *fopA* genes encoding endoinulinase (endoINU), exoinulinase (exoINU), α -galactosidase C (AGLC) and sucrase (SUC), respectively, into the recipient strain *Penicillium verruculosum* B1-537 (Δ *niaD*), recombinant producer strains were obtained, capable of producing the target recombinant enzymes with a high yield (32–50% of the total extracellular protein). Enzyme preparations of endoINU, exoINU, AGLC and SUC were obtained and characterized. Using chromatographic methods, endoINU, exoINU, SUC and AGLC with a molecular weights of 62, 56, 67 and 76 kDa, respectively, were isolated in a homogeneous form (according to polyacrylamide gel electrophoresis). The homogeneous endoINU had a high specific activity against Jerusalem artichoke inulin (56 U/mg). ExoINU was active towards inulin (17 U/mg), sucrose (850 U/mg), raffinose (41 U/mg), and stachyose (15 U/mg). SUC decomposed sucrose (10.5 U/mg), raffinose, and stachyose (3.8 and 1.4 U/mg, respectively). AGLC was characterized by the presence of raffinase and stachyase activities (31 and 30 U/mg, respectively), exhibited no activity in relation to sucrose, but showed high activity toward the synthetic substrate, *p*-nitrophenyl- α -*D*-galactoside (311 U/mg). The kinetic parameters (k_{cat} and K_m) of the hydrolysis of the corresponding substrates by homogeneous enzymes were determined. The temperature optimum was 50–55°C for endoINU, 55–65°C for exoINU, 65°C for AGLC, and 35°C for SUC. EndoINU, exoINU, AGLC and SAC exhibited maximal activity at pH 6.5, 4.5, 4.5–5.0, and 5.5–6.0, respectively. The thermal stability of the enzymes was studied at different temperatures. EndoINU exhaustively hydrolyzed inulin with the formation of fructooligosaccharides C with a degree of polymerization of 3–8. ExoINU quantitatively converted inulin into glucose-fructose syrup (GFS) with a Glu : Fru ratio of 1 : 3, and sucrose into GFS with a Glu : Fru ratio of about 1 : 0.63 (SAC provided the same results in the sucrose hydrolysis). Soy galactooligosaccharides (raffinose and stachyose) were converted into sucrose and monosaccharides (glucose, galactose and fructose) under the action of AGLC. The combined action of SUC and AGLC resulted in a complete conversion of raffinose, stachyose and sucrose to monosaccharides. The same result was achieved using ExoINU. This enzyme can be considered as promising for biotechnological applications due to its broad substrate specificity, which allows it be used both for the production of GFS from inulin and sucrose, and for the destruction of soybean galactooligosaccharides.

Keywords: endoinulinase, exoinulinase, α -galactosidase, sucrase, inulin, sucrose, galactooligosaccharides, *Penicillium verruculosum*