

УДК 577.325

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОИНУЛИНАЗЫ ИЗ *Aspergillus ficuum* С МОНО-, ДИ- И ПОЛИСАХАРИДАМИ

© 2023 г. С.М. Макин*, А.Н. Дубовицкая*, Д.Ю. Богомолов*, М.С. Кондратьев* **, М.Г. Холявка*, ***, #, В.Г. Артюхов*

*Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

**Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

***Севастопольский государственный университет, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

#E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 16.08.2023 г.

Целью работы был анализ особенностей пространственной организации молекулы эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* после связывания с моно-, ди- и полисахаридами. Изучены изменения объема и количества внутренних полостей при связывании инулиназы с моно- (глюкоза, фруктоза), ди- (сахароза, манноза) и полисахаридами (инулин), описаны преобразования в количестве и длине туннелей и пор, проанализирована реорганизация состава и локализации скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы фермента. Показано, что в моделях инулиназы в комплексе с сахарозой (вторым субстратом) и маннозой (активатором) наблюдаются одинаковые типы внутренних структур. Аналогичная закономерность выявлена и при образовании комплексов с продуктом реакции – фруктозой и ингибитором – глюкозой. Кроме того, установлено, что состав как заряженных, так и гидрофобных скоплений не претерпевает значительных изменений после связывания инулиназы с моно-, ди- и полисахаридами, т.е. взаимодействие с рядом названных углеводов отражается преимущественно на внутренних структурах фермента. Изученные особенности связывания инулиназ с различными лигандами необходимо учитывать при разработке на их основе современных промышленных биокатализаторов.

Ключевые слова: инулиназа, катализ, полости, туннели, компьютерное моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302923050083, EDN: PGZZTE

Благодаря своей способности гидролизовать инулин фермент инулиназа играет важную роль в пищевой промышленности в области производства фруктозы и фруктоолигосахаридов из экстрактов инулиносодержащих растений [1]. Различают экзо- и эндоинулиназы. Экзоинулиназы в качестве продуктов образуют в основном моносахариды, эндоинулиназы – преимущественно олигосахариды [2, 3], т.е. эндоинулиназа действует на внутренние β -2,1-гликозидные связи инулина с образованием фруктоолигосахаридов различной длины цепи [4, 5].

Известно, что растительное сырье, богатое инулином, представляет собой смесь сахаров [4] и может включать, помимо инулина, такие углеводы как сахароза и манноза. При этом фруктоза и глюкоза, являясь продуктами гидролиза инулина, оказывают на фермент ингибирующее воздействие [6–8]. Основным субстратом фермента является инулин, однако сахароза также способна выступать в качестве минорного субстрата [9, 10]. В работе [11] было показано, что отношение активности к сахарозе и инулину обычно значи-

тельно выше для инвертаз (≥ 1500) и ниже для инулиназ (≤ 10). Установлено, что соотношение этих типов активностей зависит от pH, температуры и метода определения ферментативной активности [12]. Существуют данные об активаторном действии маннозы на инулиназу [13, 14]. Таким образом, сахара, содержащиеся в растительном сырье, способны оказывать различное влияние на инулиназную активность. Именно поэтому важно изучать механизмы взаимодействия различных сахаров с молекулами ферментов методами молекулярного докинга и 3D-моделирования [15, 16].

Известно, что свойства и функции различных ферментов определяются их пространственной структурой, обусловленной аминокислотной последовательностью и ее пространственной укладкой, выражающейся в определенной третичной структуре [17]. Даже небольшое изменение размеров той или иной макромолекулы в пределах нескольких ангстрем, может повлечь за собой существенное изменение ее свойств, вплоть до полной потери каталитической активности [18, 19]. Со-

временные методы компьютерного моделирования пространственных структур белков позволяют прогнозировать влияние различных факторов на их свойства и функции [20, 21].

Внутренние полости, туннели и поры являются важными элементами пространственной организации белка. Они участвуют в таких процессах, как распознавание и связывание лигандов, перенос малых молекул, а также меж- и внутримолекулярный перенос энергии [22–24]. Данные элементы пространственной структуры ферментов принимают участие в образовании специфического микроокружения, необходимого для осуществления биохимических реакций, и обеспечивают транспорт различных соединений к активному и субстратсвязывающему центрам белка.

Белок-субстратные взаимодействия возникают только в непосредственной близости субстрата и активного центра. Большинство ферментов (>60%) имеют каталитические центры, расположенные в глубоких внутренних полостях [17, 25]. Отсюда следует, что структура молекулы фермента нуждается в особых путях, идущих через молекулу белка для обеспечения каталитического взаимодействия. Такими путями выступают туннели, через которые осуществляется транспорт субстратов, кофакторов, растворителей и продуктов к активному центру и от него [26].

Туннели тяжело поддаются анализу из-за большого количества их промежуточных форм, но именно благодаря разнообразию вариаций структур и размеров туннелей, состава выстилающих их аминокислотных остатков, а также обусловленной туннелями конформационной динамичности в белковых молекулах данные структурные элементы принимают участие в обеспечении доступа предпочтительного субстрата к активному центру фермента и в то же время ограничении такового для нежелательных молекул путем соединения внутреннего пространства биомакромолекул с внешним пространством, позволяя стерически комплементарным субстратам перемещаться внутрь и/или выходить из активных центров ферментов; обеспечении доступа лигандов с различными физико-химическими свойствами к регуляторным центрам; поддержании стабильности белков; обеспечении термодинамической и кинетической составляющих реакций, требующих отсутствия водного окружения [19, 27, 28].

Полости белковых молекул считаются энергетически невыгодными элементами пространственной структуры, так как в некоторых случаях они могут быть заполнены водой, из-за чего конформация всей молекулы оказывается менее стабильной [29]. Тем не менее, данные структуры часто являются эволюционно консервативными, так как играют важную роль в формировании пространственной организации ферментов. Так, полости зачастую обеспечивают необходимую

конформационную подвижность биомакромолекул и участвуют в различных механизмах их денатурации [21, 24]. Помимо постоянно существующих, есть полости, которые формируются на весьма краткий период. Примером такой структуры могут служить полости, образующиеся в результате флип-флоп перехода ароматического кольца фенилаланина. Это в очередной раз напоминает о том, что молекулы ферментов являются динамичными, а не статичными системами, и что для функционирования им необходима определенная конформационная подвижность.

В связи с вышесказанным целью работы было выявить особенности взаимодействий эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* с моно-, ди- и полисахаридами, учитывая параметры туннелей, полостей и пор, которые образуются в ходе этих взаимодействий, а именно их объемы (в нм³) и протяженность (в Å).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования была выбрана пространственная структура эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7). Отрисовка молекул углеводов была произведена в HyperChem.

Докинг белковых структур с лигандами осуществляли в программном обеспечении AutoDock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit>). Вычисление параметров туннелей и внутренних полостей осуществляли при помощи программы MOLE (<http://mole.chemimuni.cz>). Анализ скоплений аминокислот на поверхностях белковых молекул проводили на основе программного обеспечения Maestro 10.3 (<https://www.schrodinger.com/products/maestro>).

Расстояния между аминокислотными остатками на поверхности ферментов были рассчитаны на основе координат атомов в их составе по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2},$$

где x_1 и x_2 – координаты атомов двух аминокислот по оси абсцисс, y_1 и y_2 – координаты атомов аминокислот по оси ординат, z_1 и z_2 – координаты по оси аппликата. За скопление принимали аминокислотные остатки, расстояние между которыми не превышало 10 Å [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В пространственной структуре эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) обнаружено четыре скопления заряженных и восемь скоплений гидрофобных аминокислотных остатков. После одноточечного взаимодействия с используемыми в данной работе носителями количество, аминокислотный состав (табл. 1) и локализация (рис. 1) заряженных аминокислотных

Таблица 1. Аминокислотный состав заряженных скоплений на поверхности молекулы инулиназы из *Aspergillus ficium*

Лиганд	Скопление 1	Скопление 2	Скопление 3	Скопление 4
Без лигандов	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с фруктозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с глюкозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с инулином	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu243, Glu247, Lys344, Glu246, Lys345	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с маннозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282, Asp285	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Комплекс с сахарозой	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454

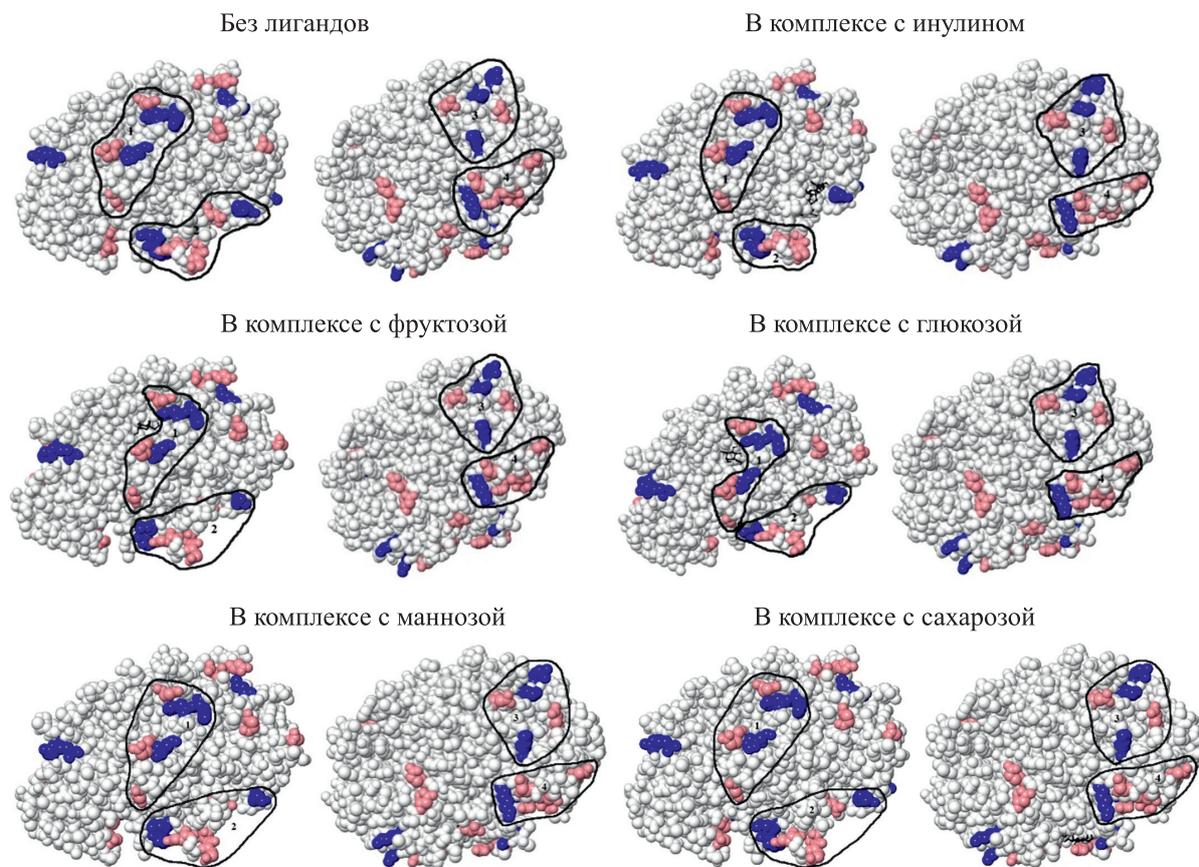
**Рис. 1.** Локализация скоплений заряженных аминокислотных остатков в составе моделей эндоинулиназы из *Aspergillus ficium* при одноточечном связывании с углеводами.

Таблица 2. Аминокислотный состав гидрофобных скоплений на поверхности молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum*

Лиганд	Скопление 1	Скопление 2	Скопление 3	Скопление 4	Скопление 5	Скопление 6	Скопление 7	Скопление 8
Без лигандов	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с фруктозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с глюкозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с инулином	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Gly112, Val143, Ala206, Pro107, Ala117, Gly186	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	—	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с маннозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446
Комплекс с сахарозой	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala371, Ile369, Val504, Tyr397	Pro377, Gly378, Gly401, Ala400, Gly500	Ile437, Pro441, Pro327, Val446

остатков изменяются только при связывании с инулином, что выражается в изменении состава аминокислот во втором скоплении. Одноточеч-

ный докинг подразумевает взаимодействие одной молекулы лиганда с выбранной моделью белка.

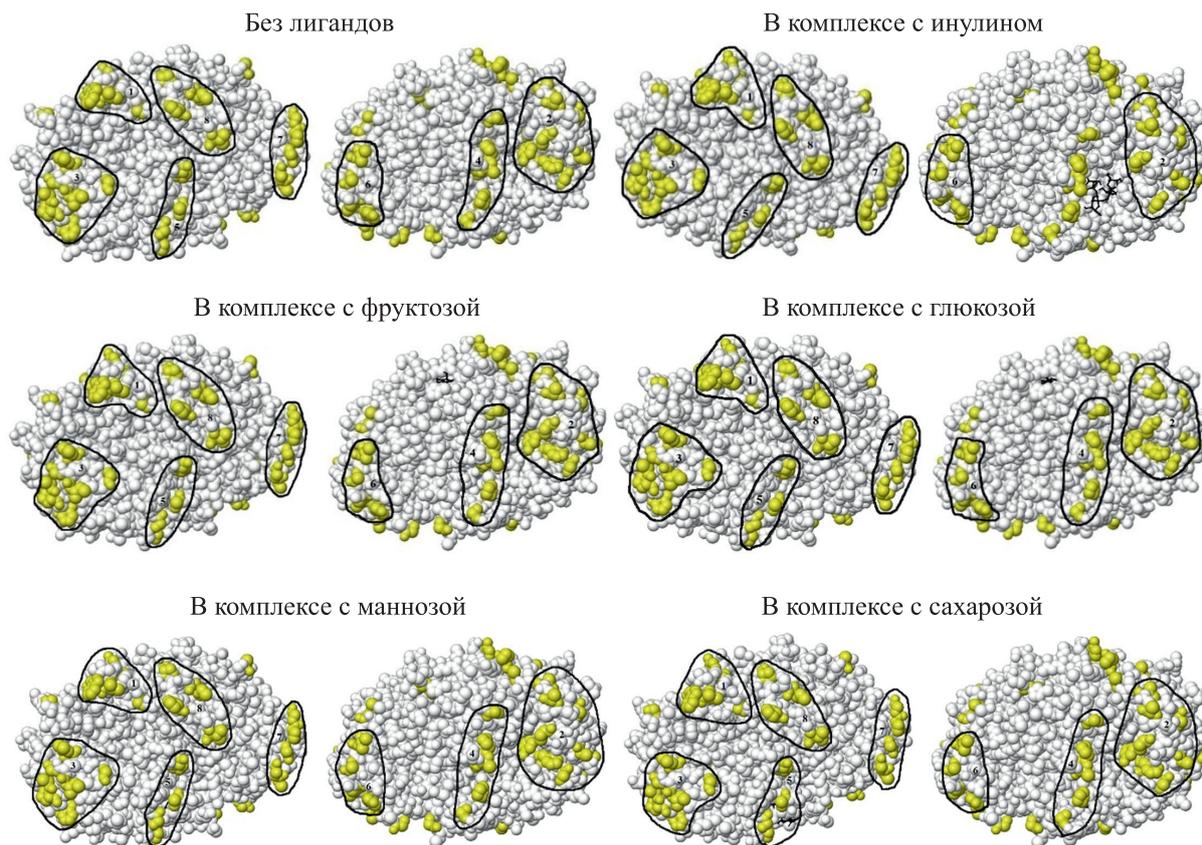


Рис. 2. Локализация скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в составе моделей эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* при односточном связывании с углеводами.

Для гидрофобных скоплений также наблюдаются изменения состава (табл. 2), количества и локализации (рис. 2) аминокислотных остатков только при взаимодействии с инулином: исчезает четвертое гидрофобное скопление, изменяется состав второго скопления.

В ходе исследования был проведен анализ внутренних структур моделей инулиназ (табл. 3). Типичными представителями внутренних структур являются туннели, внутренние полости и поры. Внутренние полости представляют собой пространство, не заполненное аминокислотами и не соединенное с внешним растворителем. Термин «пора» означает путь, идущий через молекулу белка, без каких-либо прерываний внутренней полостью, с одной стороны соединенный с внешней поверхностью молекулы. «Туннель» — путь, соединяющий поверхность белка с внутренней полостью, или две или несколько внутренних полостей [26].

Во всех представленных моделях присутствуют внутренние полости, большая из них имеет объем 0.308 нм^3 . При взаимодействии с маннозой и сахарозой образуется новая внутренняя полость

объемом 0.205 нм^3 . В модели, полученной путем односточного докинга инулиназы с инулином, полость объемом 0.152 нм^3 прилегает к лиганду, что может оказывать значительное влияние на сродство лиганда к ферменту, тогда как в других моделях данная полость отсутствует (рис. 3). Пory в представленных моделях отсутствуют.

Разные полости (у инулиназы без лигандов их шесть) имеют отличный объем вследствие различного их расположения в пространстве молекулы и аминокислотного состава их стенок. Во всех представленных моделях наблюдается присутствие двух полостей равного объема 0.171 нм^3 . В большинстве моделей присутствует туннель длиной 15.09 \AA , кроме комплексов с маннозой и сахарозой, в которых длина туннеля составляет 11.78 \AA . В модели «инулиназа—инулин» также присутствует второй туннель длиной 6.39 \AA .

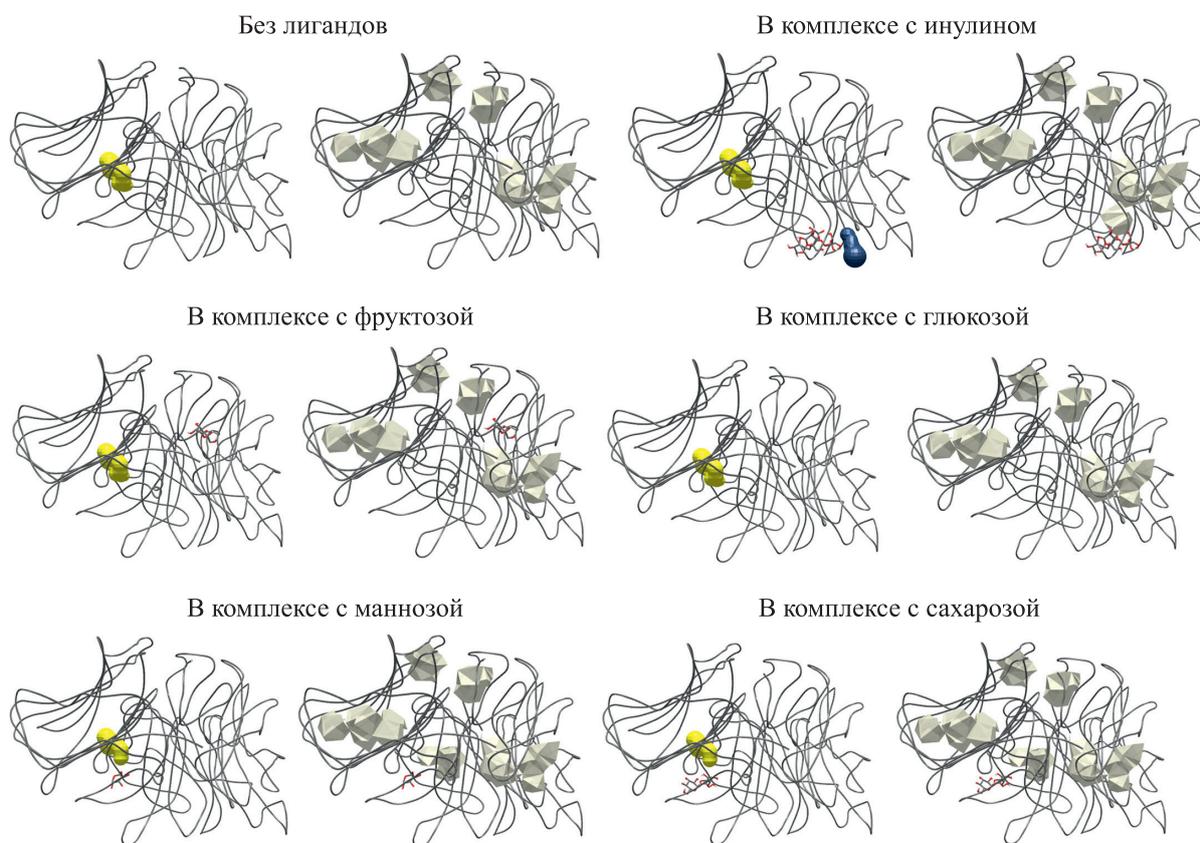
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных расчетов было выявлено, что в моделях комплексов молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* с сахарозой и манно-

Таблица 3. Профили внутренних структур моделей молекул, полученных путем одноточечного молекулярного докинга инулиназы из *Aspergillus ficuum* с различными углеводами

Нативный фермент	Глюкоза	Инулин	Манноза	Сахароза	Фруктоза
Объем внутренних полостей, нм ³					
0.308	0.308	0.308	0.308	0.308	0.308
0.251	0.251	0.251	0.251	0.251	0.251
–	–	–	0.205	0.205	–
0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171
0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171
–	–	0.152	–	–	–
0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137
0.115	0.115	0.115	0.115	0.115	0.115
Длина туннелей, Å					
15.09	15.09	15.09	11.78	11.78	15.09
		6.39			

Примечание. Полужирным курсивом выделены структуры, отличающиеся от таковых у нативного фермента.

**Рис. 3.** Локализация внутренних структур в составе моделей эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* при одноточечном связывании с углеводами (слева – туннели, справа – внутренние полости).

зой наблюдаются одинаковые типы внутренних структур, что может служить подтверждением того, что данные сахара оказывают схожий эффект на активность фермента. Манноза является активатором инулиназы, тогда как сахароза представляет собой субстрат для данного фермента, наряду с инулином [31]. В случае взаимодействия с фруктозой (продуктом реакции гидролиза инулина) происходит ингибирование фермента. Модели комплексов энзима с глюкозой и фруктозой обладают схожими профилями внутренних структур, что позволяет сделать вывод об ингибиторных свойствах глюкозы в отношении инулиназы [15]. Кроме того, было показано, что состав как заряженных, так и гидрофобных скоплений на поверхности молекулы инулиназы из *Aspergillus ficuum* не претерпевает значительных изменений после ее взаимодействия с изучаемыми нами лигандами. Соответственно, можно сделать вывод о том, что взаимодействие с рядом представленных сахаров происходит с изменением конфигурации и состава внутренних структур фермента — туннелей и внутренних полостей.

Производство инулина из инулинсодержащего сырья — необходимый этап в технологии создания низкокалорийных подсластителей. Данное исследование позволяет углубить понимание механизмов взаимодействия инулиназы с различными углеводами, что открывает возможность применять полученные результаты в пищевой промышленности, благодаря пониманию того, какие поли-, ди- и олигосахариды являются ингибиторами инулиназ (фруктоза, глюкоза), а какие — их активаторами (сахароза, манноза).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. G. Holyavka, A. R. Kayumov, D. R. Baydamshina, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **115**, 829 (2018).

2. B. A. Абемян и Л. С. Манукян, *Биохимия*, **61** (6), 1028 (1996).
3. T. A. Kovaleva, M. G. Kholyavka, and V. G. Artyukhov, *Biotechnology in Russia*, **1**, 43 (2012).
4. R. S. Singh, T. Singh, and C. Larroche, *Bioresour. Technol.* **273**, 641 (2019).
5. A. Mathur and D. Sadana, *World J. Pharmacy Pharmaceut. Sci.*, **10** (4), 360 (2021).
6. Q. Meng, C. Lu, H. Gao, et al., *Bioresour. Technol.*, **320**, 124346 (2021).
7. L. Zhang, C. Zhao, W. Y. Ohta, and Y. Wang, *Process Biochemistry*, **40** (5), 1541 (2005).
8. R. I. Corona, A. Morales-Burgos, C. Pelayo, et al., *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **42**, 1779 (2019).
9. M. Germec and I. Turhan, *Biomass Convers. Biorefin.*, **13** (6), 4727 (2021).
10. D. Das, R. Selvaraj, and M. Ramananda Bhat, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **22**, 101363 (2019).
11. E. J. Vandamme and D. G. Derycke, *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139 (1983).
12. M. G. Holyavka, V. G. Artyukhov, and T. A. Kovaleva, *Biocatal. Biotransformation*, **34** (1), 1 (2016).
13. Q. Sun, M. Arif, Z. Chi, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **169**, 206 (2021).
14. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, М. И. Калашникова и Д. А. Сливкин, *Технологии живых систем*, **1**, 60 (2011).
15. М. Г. Холявка и В. Г. Артюхов, *Инулиназы в условиях различного микроокружения: биофизические, кинетические и структурно-функциональные свойства* (Изд. дом ВГУ, Воронеж, 2018).
16. M. G. Holyavka, M. S. Kondratyev, A. A. Samchenko, et al., *Comput. Biol. Med.*, **71**, 198 (2016).
17. L. Pravda, K. Berka, R. Svobodová-Vařeková, et al., *BMC Bioinformatics*, **15** (1), 379 (2014).
18. G. P. Barletta and S. Fernandez-Alberti, *J. Chem. Theory Comput.*, **14** (2), 998 (2018).
19. J. Brezovsky, V. Kozlikova, and J. Damborsky, In *Protein Engineering. Methods in Molecular Biology*, Vol. 1685, Ed. by U. Bornscheuer, and M. Höhne (Humana Press, New York, 2018), pp. 25–42. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8_3
20. M. Petřek, P. Košinová, J. Koča, and M. Otyepka, *Structure*, **15** (11), 1357 (2007).
21. A. Stank, D. B. Kokh, M. Horn, et al., *Nucl. Acids Res.*, **45** (W1), W325 (2017).
22. S. E. D. Dias, A. M. Martins, Q. T. Nguyen, and A. J. P. Gomes, *BMC Bioinformatics*, **18** (1), 1 (2017).
23. H. Li and Y. O. Kamatari, In *High Pressure Bioscience — Basic Concepts, Applications and Frontiers*, Ed. by K. Akasaka and H. Matsuki (Springer, 2015), pp. 237–257.
24. M. S. Mason, B.Y. Chen, and F. Jagodzinski, *Molecules*, **23** (2), 351 (2018).
25. S. Marques, J. Brezovsky, and J. Damborsky, *Understanding Enzymes: Function, Design, Engineering, and Analysis* (Jenny Stanford Publishing, New York, 2016).
26. P. Kokkonen, D. Bednar, G. Pinto, et al., *Biotechnol. Adv.*, **37** (6), 107386 (2019).

27. T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, and U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17** (2), 215 (2013).
28. A. Stank, D. B. Kokh, J. C. Fuller, and R. C. Wade, *Acc. Chem. Res.*, **49** (5), 809 (2016).
29. U. Sreenivasan and P. H. Axelsen, *Biochemistry*, **51**, 12785 (1992).
30. Д. Ю. Богомолов, Ф. А. Сакибаев, М. Г. Холявка и др., *Сорбционные и хроматографические процессы*, **21** (4), 555 (2021).
31. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и В. Г. Артюхов, *Биотехнология* **1**, 43 (2012).

The Specificity of Interactions between Endoinulinase from *Aspergillus ficuum* and Mono-, Di- and Polysaccharides

S.M. Makin*, A.N. Dubovitskaya*, D.Yu. Bogomolov*, M.S. Kondratyev*. **, M.G. Holyavka*. ***, and V.G. Artyukhov*

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

The aim of this study was to analyze the peculiarities of spatial organization of an endoinulinase molecule from *Aspergillus ficuum* after its binding to mono-, di-, and polysaccharides. This study examined changes in volume and number of internal cavities upon binding of inulinase to mono- (glucose, fructose), di- (sucrose, mannose), and polysaccharides (inulin). Transformations in the quantity and length of tunnels and pores were described, and the reorganization of the composition and localization of charged and hydrophobic amino acid residues clusters on the surface of the enzyme molecule was analyzed. It was shown that the models of inulinase in the complex with sucrose (an alternative substrate) and mannose (an activator) exhibit the same types of internal structures. The similar pattern was found in the formation of complexes with fructose (a reaction product) and glucose (an inhibitor). In addition, it was established that both charged and hydrophobic clusters do not undergo significant changes in chemical composition after the binding of inulinase to mono-, di-, and polysaccharides, i.e., the interaction between inulinase and carbohydrates mentioned above primarily affects the internal structures of the enzyme. The specificity of the binding of inulinases to various ligands should be taken into account while developing modern industrial biocatalysts based on inulinase.

Keywords: inulinase, catalysis, cavities, tunnels, computer modeling