

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-188-201>



Поступила 16.03.2023

Поступила после рецензирования 19.05.2023

Принята в печать 23.05.2023

© Кондратенко В. В., Кондратенко Т. Ю., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

# ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ФРАГМЕНТАЦИИ ОСНОВНОЙ ЦЕПИ РАМНОГАЛАКТУРОНАНОВЫХ УЧАСТКОВ ПРОТОПЕКТИНОВОГО КОМПЛЕКСА РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Кондратенко В. В.<sup>1,\*</sup>, Кондратенко Т. Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования, Московская область, Россия

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

ферменты, фрагментация, лиазы, гидролазы, рамногалактуронан, пектиновые вещества, протопектиновый комплекс

## АННОТАЦИЯ

Особенности структуры протопектинового комплекса растительной ткани предполагают необходимость проведения точечной деструкции отдельных гликозидных связей в структуре полимерных цепей рамногалактуронана для промышленного производства пектина. В состав этих цепей входят гомогалактуронановые участки и зоны ветвления. В связи с тем, что основную функциональную нагрузку несут гомогалактуронановые фрагменты протопектинового комплекса, целевыми являются гликозидные связи между остатками рамнозы и галактуроновой кислоты. Для их направленной деструкции наиболее целесообразно использовать ферменты лиазного и гидролазного действия. Целью данного обзора является систематизация представлений о молекулярных особенностях ферментов лиазного и гидролазного действия, катализирующих процесс ферментативной деструкции основной цепи рамногалактуронана. В статье рассматриваются систематики лиазных и гидролазных ферментов по механизму деструкции гликозидных связей и по молекулярной структуре. Показано, что данные классификации пересекаются, в результате чего в каждое семейство может входить как одна, так и несколько групп ферментов. В обзоре показано основное структурное отличие ферментов лиазного и гидролазного действия, заключающееся в обязательном присутствии в составе лиазных ферментов катионов Ca<sup>2+</sup>. Эти катионы участвуют в стабилизации конформации молекулы фермента и в самом каталитическом процессе, блокируя остаток галактуроновой кислоты. В составе целевых гидролазных ферментов катионы Ca<sup>2+</sup> отсутствуют. Молекулярные особенности лиазных ферментов определяют чувствительность их каталитической активности к присутствию катионов Ca<sup>2+</sup> в системе. Превышение определенной концентрации способно приводить к антагонистическому эффекту. В отношении гидролазных ферментов однозначное представление на этот счет отсутствует. Показана необходимость исследования подходов к оценке целесообразности предварительного частичного удаления катионов из субстрата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № 0585–2019–00015 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 16.03.2023

Accepted in revised 19.05.2023

Accepted for publication 23.05.2023

© Kondratenko V. V., Kondratenko T. Yu., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

# ENZYME SYSTEMS FOR FRAGMENTATION OF THE MAIN CHAIN OF THE RHAMNOGALACTURONAN SITES IN PLANT TISSUE PROTOPECTIN COMPLEX

Vladimir V. Kondratenko<sup>1,\*</sup>, Tatyana Yu. Kondratenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Russian Research Institute of Canning Technology, Moscow Region, Russia

## KEY WORDS:

enzyme, fragmentation, lyase, hydrolase, rhamnogalacturonan, pectin substance, protopectin complex

## ABSTRACT

Special features of the protopectin complex structure of plant tissue suggest the necessity of performing point destruction of certain glycoside bonds in the structure of rhamnogalacturonan polymer chains for industrial production of pectin. These chains include homogalacturonan sites and branching zones. As the homogalacturonan fragments of the protopectin complex carry the main functional load, glycoside bonds between residues of rhamnose and galacturonic acid are targeted bonds. For their directional destruction, it is most expedient to use enzymes of lyase and hydrolase action. The aim of this review is to systemize notions of molecular specific features of enzymes of lyase and hydrolase action that catalyze the process of enzymatic destruction of the rhamnogalacturonan main chain. The paper examines systematics of lyase and hydrolase enzymes by mechanism of destruction of glycoside bonds and by molecular structure. It is shown that the classification data intercross, as a result, each family can include one or several enzyme groups. The review shows the main structural difference of enzymes of lyase and hydrolase action that consists in the obligatory presence of Ca<sup>2+</sup> cations in the composition of lyase

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Кондратенко, В. В., Кондратенко, Т. Ю. (2023). Ферментные системы для фрагментации основной цепи рамногалактуронановых участков протопектинового комплекса растительной ткани. *Пищевые системы*, 6(2), 188–201. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-188-201>

FOR CITATION: Kondratenko, V. V., Kondratenko, T. Yu. (2023). Enzyme systems for fragmentation of the main chain of the rhamnogalacturonan sites in plant tissue protopectin complex. *Food Systems*, 6(2), 188–201. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-188-201>

enzymes. These cations take part in stabilization of conformation of the enzyme molecule and in the catalytic process per se blocking the residue of galacturonic acid.  $Ca^{2+}$  cations are absent in the composition of targeted hydrolase enzymes. Molecular specific features of lyase enzymes determine sensitivity of their catalytic activity to the presence of  $Ca^{2+}$  cations in the system. Exceeding certain concentration can lead to the antagonistic effect. There is no unambiguous idea of this regarding hydrolase enzymes. The review demonstrates the necessity of studying approaches to assessment of expediency of preliminary partial removal of cations from the substrate.

FUNDING: The article was published as part of the research topic № 0585–2019–00015 of the state assignment of the V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS.

### 1. Введение

Растительное сырье и продукты его первичной переработки являются источником биологически активных составляющих олиго- и полигликановой природы [1]. Один из ключевых компонентов растительного сырья представляет собой совокупный массив клеточных стенок, срединных пластинок и межклетников [2]. В основе этих составляющих лежит сложный матрикс из олиго- и полисахаридов (арабианов, галактанов, арабиногалактанов, ксиланов, арабиноксиланов, целлюлоз), производных (гомогалактуронанов, рамногалактуронанов I и II, арабиногарактуронанов I и II, ксилотетрагалактуронанов, и др.) [3, 4], структурных белков (эктенсина, экспансина и арабиногалактанового протеина) и полифенолов (лигнинов) [3, 5]. Сюда же входит и некоторое количество инкорпорированных локальных белковых агрегаций межклеточной транспортной системы, сигнальной системы и т. д. [2, 5]. Все компоненты матрикса объединены в единую разветвленную надмолекулярную структуру посредством эфирных, боратных и водородных связей, а также солевых мостиков с участием поливалентных катионов металлов (преимущественно  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ ) и остатков фосфорной кислоты.

Молекулярная структура олиго- и полигликановых компонентов матрикса клеточных стенок в значительной степени варьирует в зависимости от таксономической принадлежности растительного организма (Рисунок 1). Также она зависит от локализации и физиологических функций ткани, от этапа вегетационного периода, от почвенно-климатических и погодных условий, микробиологического фона, условий культивирования, степени зрелости, а также от условий и продолжительности хранения.

Глубокая переработка растительной ткани и вторичных продуктов её обработки, предполагающая максимально

полную фрагментацию исходного матрикса на составляющие компоненты, имеет большие перспективы. Это связано с наличием значительного биологического и/или технического потенциала пектиновых веществ, растворимых и нерастворимых пищевых волокон, их производных и других компонентов.

В настоящее время из всех нативных компонентов клеточных стенок растительной ткани и вторичных продуктов её переработки наибольший спектр физико-химических свойств, обладающих выраженной потребительской ценностью, соответствует пектиновым веществам — продуктам направленной фрагментации нативного протопектинового комплекса исходного сырья. Основную нагрузку в процессе реализации этих свойств пектиновыми веществами несут гомогалактуронановые участки их молекул. Соответственно, для выделения из растительного сырья гомогалактуронановой составляющей посредством фрагментации нативного протопектинового комплекса матрикса клеточных стенок наиболее эффективным является ферментативное воздействие на целевые гликозидные связи, фиксирующие гомогалактуронановые участки в полимерных цепях.

Результаты наших предыдущих исследований [6,7] позволили разработать методологический подход к определению целесообразности ферментативной фрагментации протопектинового комплекса на основе системы критериев. Основной акцент был сделан на представлении гомогалактуронана как неотъемлемой составляющей более сложной структуры — рамногалактуронана. При этом последний характеризуется наличием дополненной зоны ветвления, представляющей собой последовательность пар  $[-\alpha-(1\rightarrow2)\text{-Rha-}\alpha-(1\rightarrow4)\text{-GalA-}]_n$  из остатков  $\alpha$ -L-рамнозы (Rha,  $\alpha$ -L-рамнопиранозы) и  $\alpha$ -D(+)-галактуроновой кислоты (GalA).

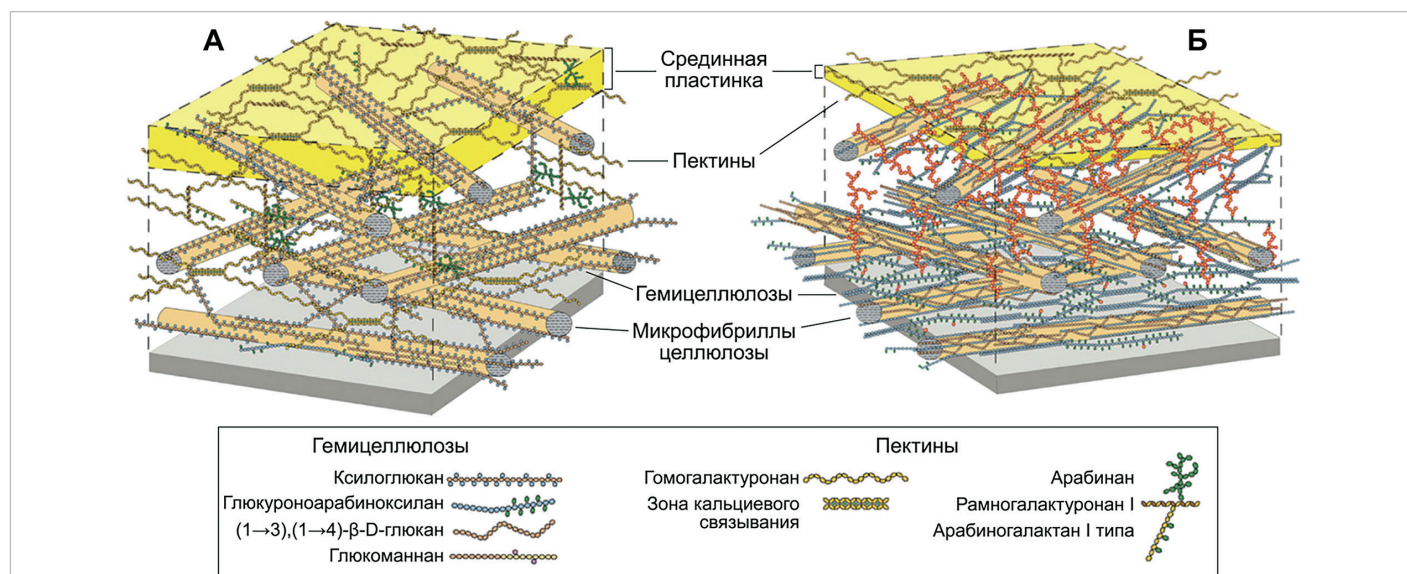


Рисунок 1. Структура первичных клеточных стенок двудольных, некоторых однодольных (А) и травянистых однодольных (Б) растений [1]

Figure 1. Structure of primary cell walls of dicotyledonous plants, certain monocotyledonous plants (A) and herbaceous monocotyledonous plants (B) [1]

В силу сложности и высокой степени гетерогенности пектиновых молекул в отношении молекулярной структуры и углеводного состава, для полной их компонентной фрагментации необходим достаточно большой пул ферментов [8–10]. Однако принадлежность гомогалактурановой составляющей к структуре рамногалактуранана предполагает акцентирование внимания на ферментах, катализирующих фрагментацию именно данной структуры. К таковым относятся ферменты лиазного и гидролазного действия бактериального, грибного и растительного происхождения.

Цель данного обзора заключается в систематизации знаний о молекулярных особенностях ферментов лиазного и гидролазного действия, отвечающих за осуществление каталитического процесса направленной деструкции основной цепи рамногалактуранана в составе протопектинового комплекса матрикса клеточных стенок растительной ткани.

## 2. Материалы и методы

В качестве объектов исследований были приняты научные издания отечественных и зарубежных учёных. Область исследований включала в себя современные представления о классификации, особенностях молекулярной структуры и механизма проявления целевой активности лиазных и гидролазных ферментов, применяемых для направленной деструкции углеводного биополимерного матрикса клеточных стенок растительной ткани. Поиск осуществляли в базах CAZy, IUBMB Enzyme Nomenclature, ScienceDirect, NCBI, Mendeley, Google Scholar, eLibrary, LibGen и других открытых электронных источниках в соответствии с протоколом PRIZMA. Использовали комбинации ключевых слов, включающие такие как лиазы, гидролазы, рамногалактуранан, протопектин, пектиновые вещества, гликозидные связи, полигликаны, активный сайт, ингибирование. Ключевые слова использовали в английском и русском вариантах.

Из результатов поиска были исключены нерезцензируемые, малоинформативные и дублирующие источники, а также источники, не относящиеся, либо имеющие опосредованное отношение к теме исследований.

## 3. Ферментативная деструкция основной цепи пектиновых веществ

Ферменты лиазного действия катализируют расщепление гликозидной связи между углеводными остатками посредством  $\beta$ -элиминирования (Рисунок 2). При этом происходит расщепление  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидных связей между остатками  $\alpha$ -L-рамнопиранозы и  $\alpha$ -D-галактурановой кислоты на участ-

ках ветвления рамногалактуранана. В процессе расщепления возникает L-рамнопиранозильный остаток на восстанавливаемом конце одного из фрагментов. В случае эндо-ферментативного процесса на невозстанавливаемом конце другого фрагмента образуется 4-деокси-4,5-ненасыщенный остаток D-галактурановой кислоты. В случае экзо-ферментативного процесса возможно образование дисахарида 2-O-(4-деокси- $\beta$ -L-трео-гекс-4-енопирануранозил)- $\alpha$ -L-рамнопиранозы и укороченного фрагмента основной цепи рамногалактуранана с 4-деокси-4,5-ненасыщенным остатком D-галактурановой кислоты на невозстанавливаемом конце.

Ферменты гидролазного действия катализируют гидролитическое расщепление (инверсию) гликозидной связи между углеводными остатками (Рисунок 3): происходит расщепление в присутствии молекулы воды  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)- или  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-гликозидных связей между остатками  $\alpha$ -L-рамнопиранозы и  $\alpha$ -D-галактурановой кислоты с изменением аномерной конфигурации галактуранового остатка до  $\beta$ -формы либо без таковой.

В отношении того, какие именно группы лиазных и гидролазных ферментов целесообразно применять для фрагментирования основной цепи рамногалактуранана, мнения исследователей расходятся.

Так, в настоящее время существует два вида классификации ферментов — в зависимости от целевого действия и в зависимости от особенностей молекулярной структуры. В соответствии с первой классификацией [13], все ферменты, фрагментирующие основную цепь рамногалактуранана, представлены шестью группами: две группы лиаз (EC4.2.2.23 и EC4.2.2.24) и четыре группы гидролаз (EC3.2.1.171, EC3.2.1.172, EC3.2.1.173 и EC3.2.1.174). Функциональные особенности каждой из данных групп схематично представлены на Рисунке 4.

В группу EC4.2.2.23 входят эндо-лиазы, катализирующие расщепление гликозидных связей внутри основной цепи рамногалактуранана, тогда как группа EC4.2.2.23 включает экзолиазы, результатом действия которых является отщепление дисахаридного фрагмента от конца цепи, приводя в итоге к её укорочению.

В группу гидролаз EC3.2.1.171 входят ферменты, осуществляющие эндогидролиз  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-гликозидной связи между остатками  $\alpha$ -D-галактурановой кислоты и  $\alpha$ -L-рамнопиранозой в основной цепи рамногалактуранана с начальной инверсией ее аномерной конфигурации в  $\beta$ -форму остатка  $\alpha$ -D-галактурановой кислоты на восстанавливаемом конце фрагмента рамногалактуранана.

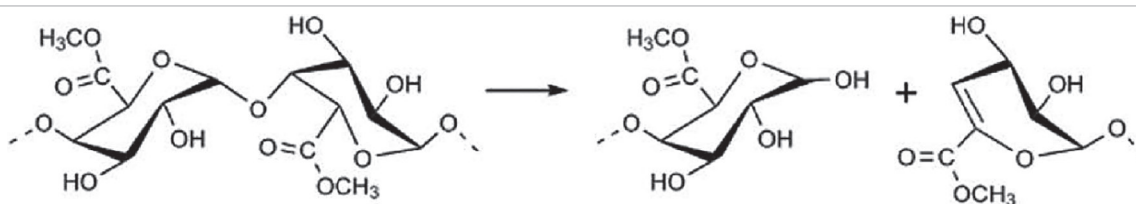


Рисунок 2. Реакция  $\beta$ -элиминирования [11]  
Figure 2. Reaction of  $\beta$ -elimination [11]

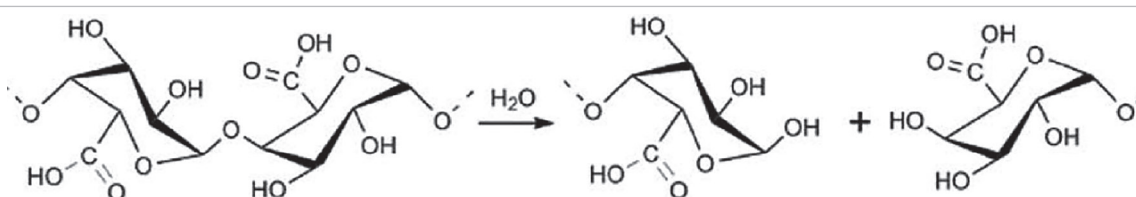
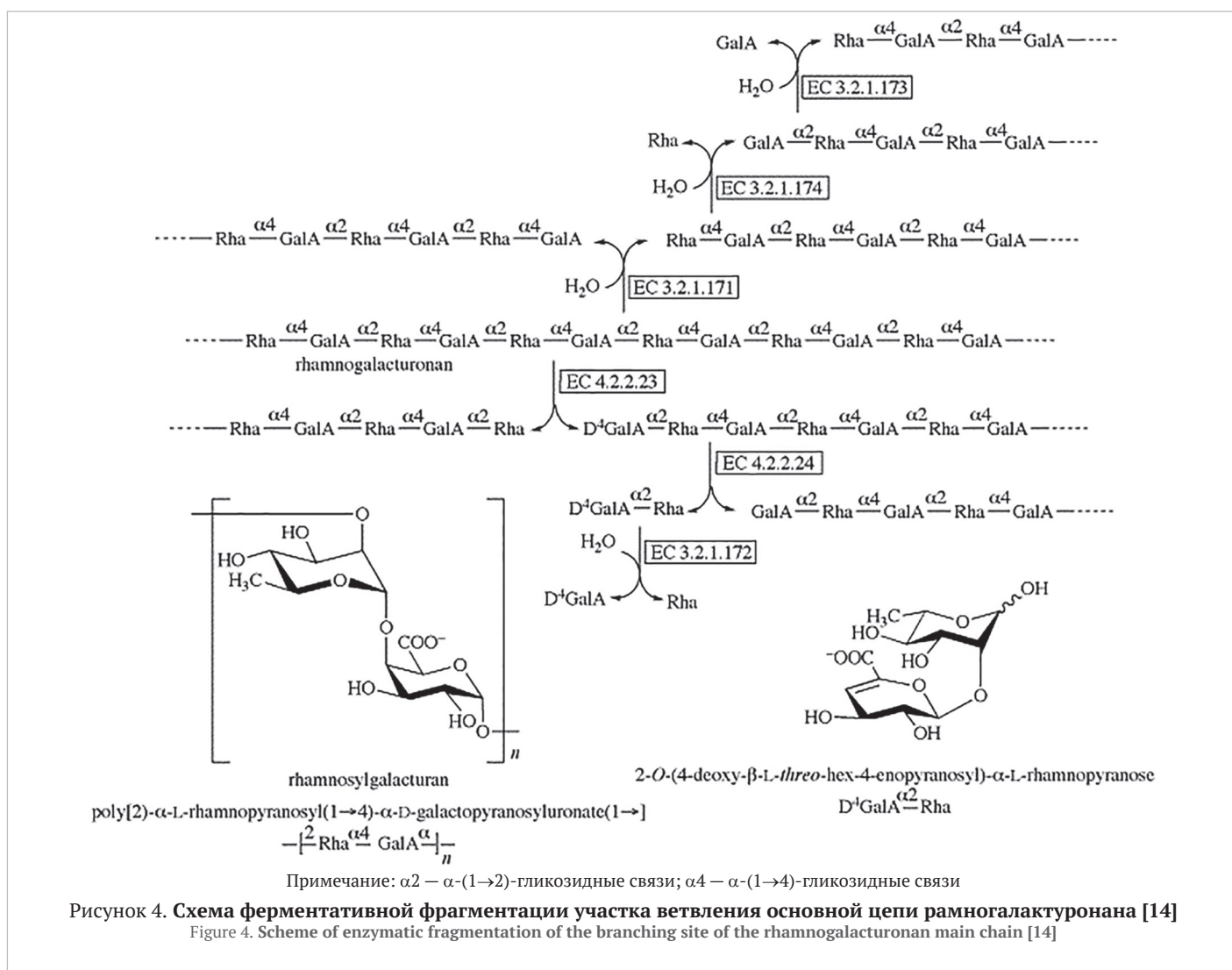


Рисунок 3. Реакция гидролитического расщепления (инверсии) гликозидной связи [11,12]  
Figure 3. Reaction of hydrolytic cleavage (inversion) of glycoside bond [11,12]



В группу EC3.2.1.172 входят экзо-гидролазы, осуществляющие гидролиз  $\alpha$ -(1→2)-гликозидной связи между остатками  $\beta$ -элиминированной формы  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты и  $\alpha$ -L-рамнопиранозы в основной цепи рамногалактуронана.

Группа EC 3.2.1.173 включает в себя гидролазы, осуществляющие экзо-гидролиз  $\alpha$ -(1→2)-гликозидной связи между остатками  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты и  $\alpha$ -L-рамнопиранозой в основной цепи рамногалактуронана с начальной инверсией гликозидной связи, которая высвобождает остаток  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты на невосстанавливаемом конце фрагмента рамногалактуронана.

К группе EC3.2.1.174 относятся гидролазы, осуществляющие экзогидролиз  $\alpha$ -(1→4)-гликозидной связи между остатками  $\alpha$ -L-рамнопиранозы и  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты в основной цепи рамногалактуронана с начальной инверсией конфигурации в  $\beta$ -форму остатка  $\alpha$ -L-рамнопиранозы на невосстанавливаемом конце фрагмента рамногалактуронана.

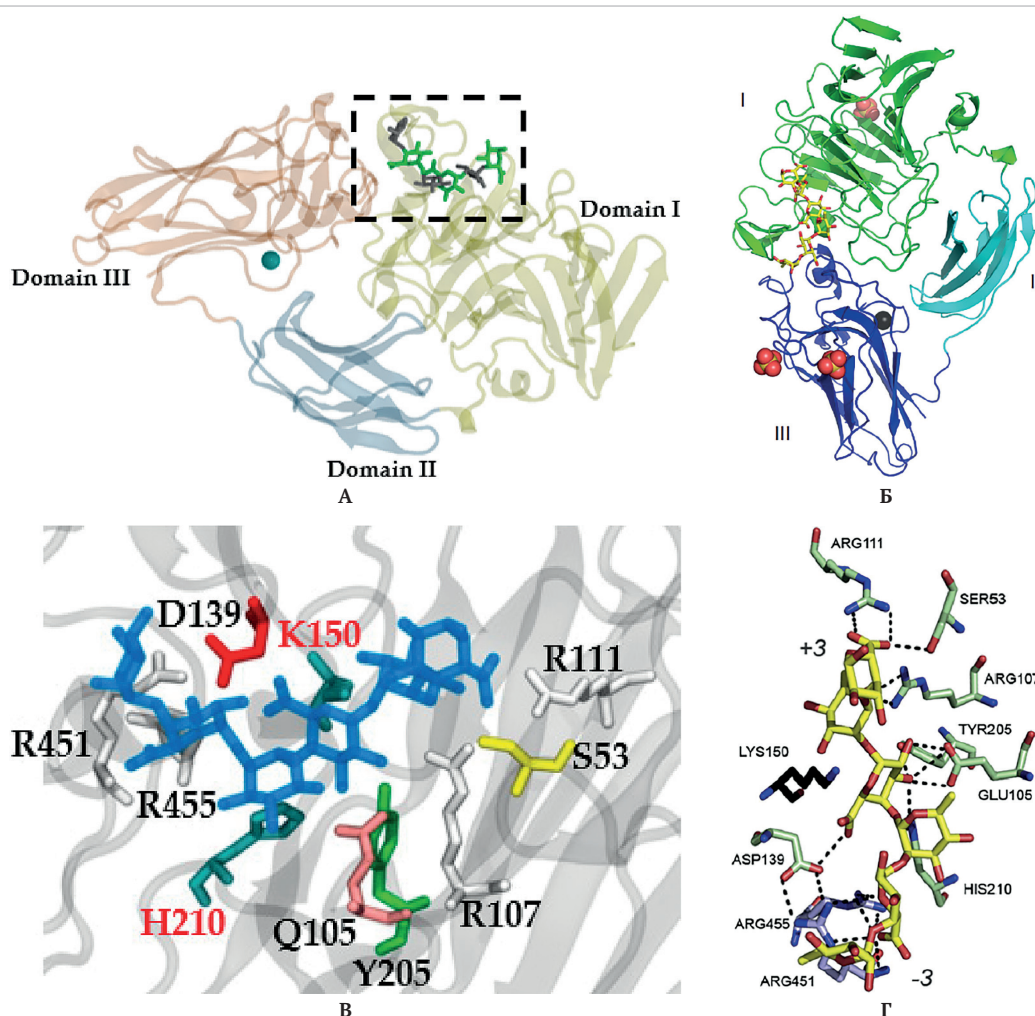
В соответствии со второй классификацией [15], все ферменты сгруппированы в семейства и подсемейства в зависимости от особенностей молекулярной структуры. При этом обе группы ферментов лиазного и гидролазного действия, фрагментирующих основную цепь рамногалактуронана, представлены четырьмя семействами полисахарид-лиаз (PL) — PL4, PL9, PL11 и PL26 — и четырьмя семействами гликозид-гидролаз (GH) — GH28, GH78, GH105 и GH138.

#### 4. Молекулярные особенности ферментов лиазного и гидролазного действия в отношении рамногалактуронановых участков протопектинового комплекса

##### 4.1. Ферменты лиазного действия

Из двух вариантов рамногалактуронан-лиазных ферментов группы EC4.2.2 в семейство PL4 входит только рамногалактуронан эндо-лиаза EC4.2.2.23 [16–20]. В составе фермента присутствуют три домена, пространственные структуры которых представлены комбинациями  $\beta$ -сэндвичей и  $\beta$ -листов. При этом домен I содержит в своей структуре сульфат-ион, а также активный сайт фермента с ключевыми аминокислотными остатками Lys150 и His210. В составе домена III присутствуют катион  $\text{Ca}^{2+}$  и сульфат-ион (Рисунок 5). При этом  $\text{Ca}^{2+}$  находится достаточно далеко от активного сайта, в силу чего играет только структурную роль в поддержании необходимой конформации молекулы фермента. В составе активного сайта в процессе ферментативной реакции ключевую роль играют аминокислотные остатки Lys150 и His210 (Рисунок 6).

Так же, как и в PL4, в семейство PL9 входит рамногалактуронан эндо-лиаза EC4.2.2.23 [21–23]. Кроме того, структура фермента включает в себя три домена. Но, в отличие от PL4, домены образованы  $\beta$ -спиралью, которая включает 10 плотных полипептидных витков, в совокупности формирующих три аксиально вытянутых параллельных  $\beta$ -листа (Рисунок 7). При этом активный сайт включает в себя кати-



Примечание: А и Б — пространственные отображения трёхмерной структуры фермента [20] и [18] соответственно с активным сайтом в домене I, с участком полимерной цепи лиганда (субстрата) в доменах I и II, с сульфат-ионами в доменах I и III и с катионом Ca<sup>2+</sup> в домене III; В и Г — увеличенная область активного сайта [20] и [18] соответственно, с лигандом и аминокислотными остатками K150 (Lys150) и H210 (His210)

Рисунок 5. Молекулярная структура тела и активного сайта фермента семейства PL4

Figure 5. Molecular structure of the body and active site of the enzyme of the PL4 family

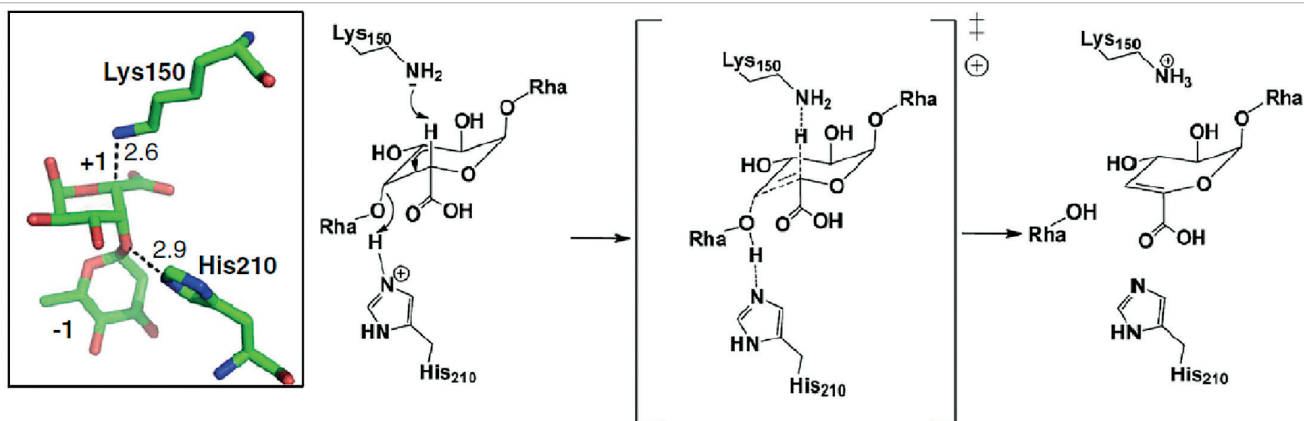


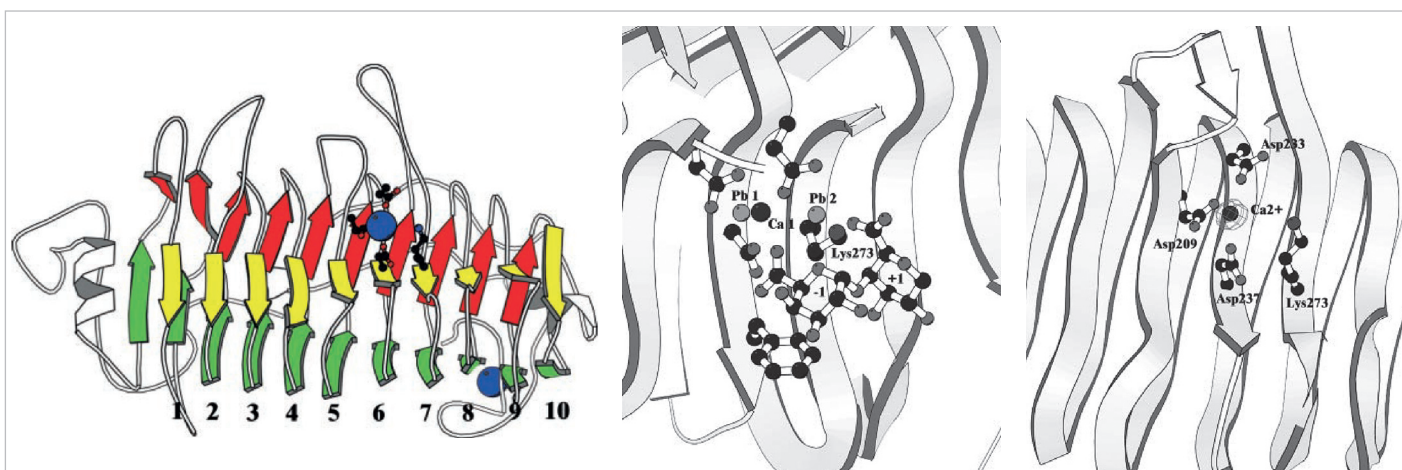
Рисунок 6. Предполагаемый механизм ферментативной реакции PL4 [18]

Figure 6. Assumed mechanism of the PL4 enzymatic reaction [18]

он Ca<sup>2+</sup> в окружении ключевых аминокислотных остатков Lys273, Asp209, Asp233, Asp 234, Asp238 и Asp268. Важным фактором каталитического процесса является связывание остатка GalA субстрата катионом Ca<sup>2+</sup> и аминокислотной группой остатка Asp268 (Рисунок 8).

В семейство PL11 в силу схожести молекулярной структуры входит как рамногалактуронан эндо-лиаза EC4.2.2.23, так и рамногалактуронан экзо-лиаза EC4.2.2.24 [24–30]. В отличие от предыдущих семейств PL, структура ферментов

данного семейства представлена двумя доменами. Один — в виде β-пропеллера с восемью лопастями (А, В, С, D, E, F, G и H), образованными β-листами и β-спиралями, с включением ионов Ca<sup>2+</sup> в каждую лопасть; другой домен образован β-листом и включает N-терминал (Рисунок 9). Активный сайт ферментов имеет щелевидную структуру, что способствует строгому захвату двухзвенных участков Rha-GalA субстрата со стабилизацией карбоксильной группы GalA совместным действием катиона Ca<sup>2+</sup> и аминокислотного



А

Б

В

Примечание: А — пространственное отображение трёхмерной структуры фермента с тремя доменами. Домены образованы β-спиралью, состоящей из 10 плотных витков, которые формируют три параллельных β-листа; Б и В — увеличенная область активного сайта, соответственно, с катионом Ca<sup>2+</sup>, связанным с участком субстрата и с аминокислотными остатками Lys273, Asp209, Asp233, Asp237, Asp234 и Asp268 (последние два не показаны).

Рисунок 7. Молекулярная структура тела и активного сайта фермента семейства PL9 [21]

Figure 7. Molecular structure of the body and active site of the enzyme of the PL9 family [21]

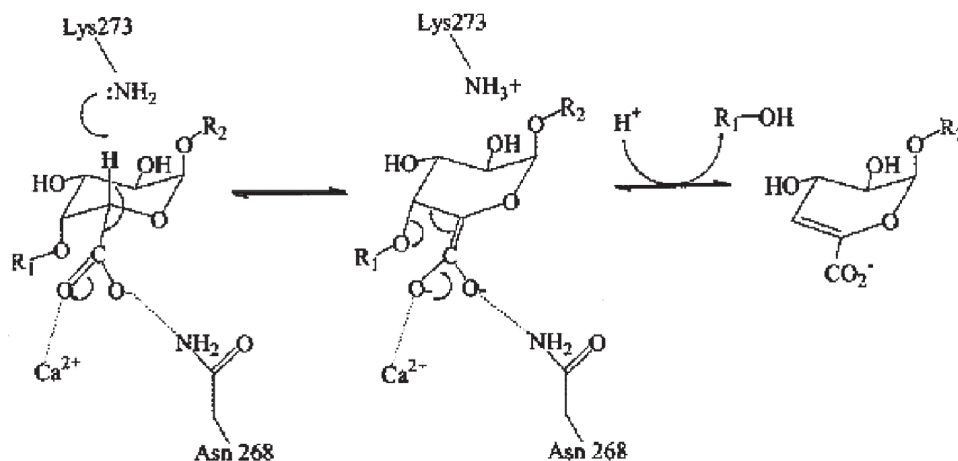
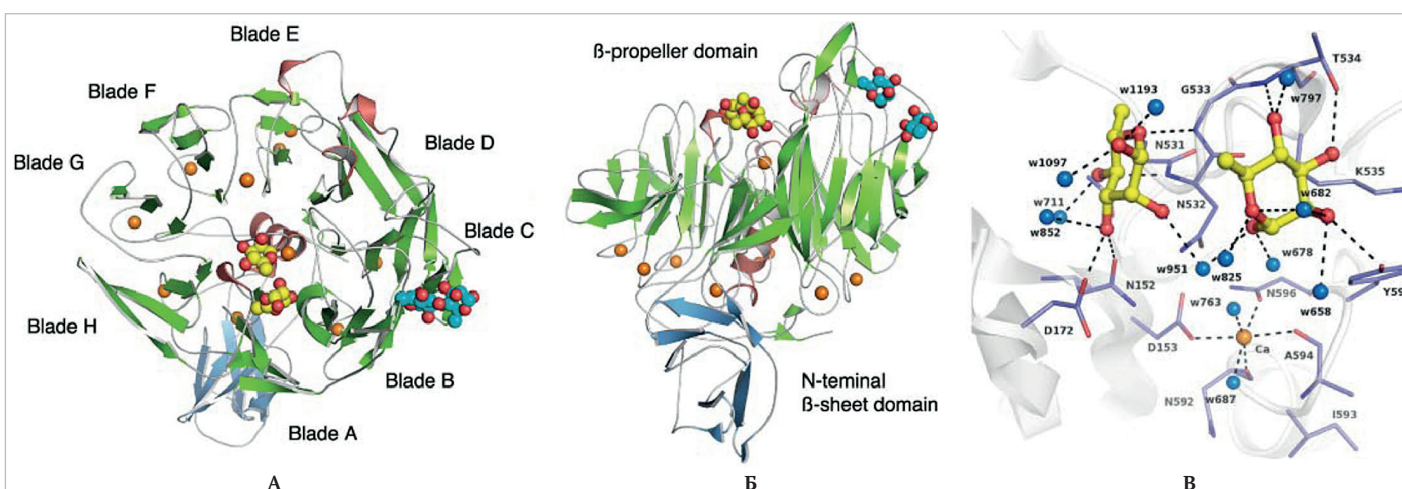


Рисунок 8. Предполагаемый механизм ферментативной реакции PL9 [21]

Figure 8. Assumed mechanism of the PL9 enzymatic reaction [21]



А

Б

В

Примечание: А — пространственное отображение трёхмерной структуры фермента с доменом в виде β-пропеллера с восемью лопастями (А, В, С, D, E, F, G и H), образованными β-листами и спиральями, с включением ионов Ca<sup>2+</sup> в каждую лопасть; Б — то же пространственное отображение фермента, развёрнутое на 90° для отображения N-терминала в домене, образованном β-листом; В — увеличенная область активного сайта.

Рисунок 9. Молекулярная структура тела и активного сайта фермента семейства PL11 [25,26]

Figure 9. Molecular structure of the body and active site of the enzyme of the PL11 family [25,26]

остатка Lys 170. Стабилизация осуществляется в комплексе с четырьмя остатками Asp153 (D153), Asn592 (N592), Ala594 (A594), и Asn596 (N596).

В семейство PL26 входят ферменты рамногалактуронан эндо-лиаза EC4.2.2.23 и рамногалактуронан экзо-лиаза EC4.2.2.24 [31]. Особенностью молекулярной структуры ферментов этого семейства является то, что в составе трёхдоменного комплекса конформация домена III имеет конфигурацию  $(\alpha/\alpha)_6$ -ротора (Рисунок 10).

С этим, предположительно, связана и локализация активного сайта именно в этом домене.

Ключевыми аминокислотными остатками активного сайта рамногалактуронан эндо-лиазы являются Arg634 и Arg648. У рамногалактуронан экзо-лиазы — Lis535 и Arg452. Несмотря на некоторую удалённость от активного сайта катиона  $\text{Ca}^{2+}$ , он также принимает участие в каталитическом процессе, блокируя карбоксильную группу GalA в окружении аминокислотных остатков Asp562, Asp585, His616, Asp621 и His639.

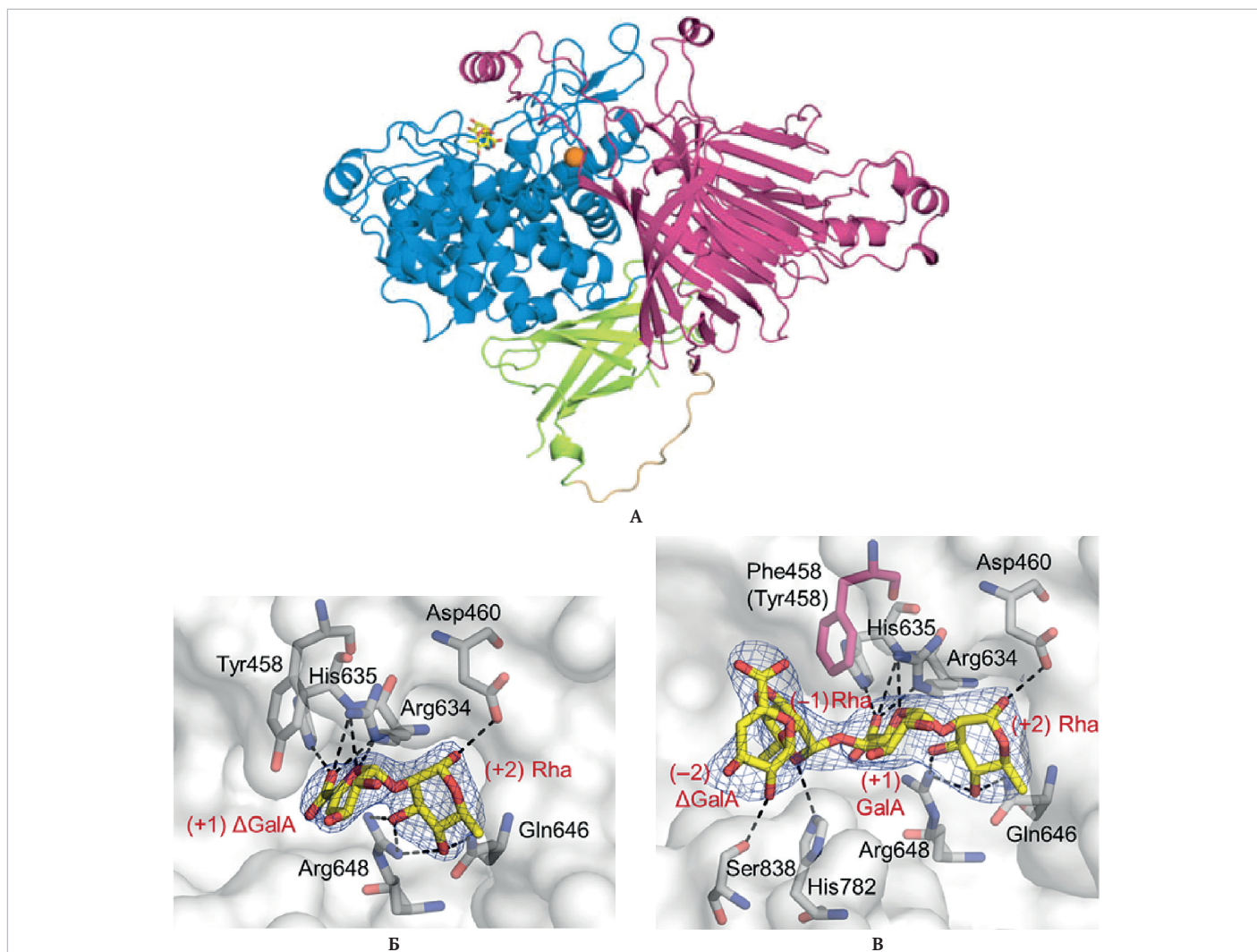
#### 4.2. Ферменты гидролазного действия

В состав семейства гликозид-гидролаз GH28 входят ферменты рамногалактуроназа EC3.2.1.171 и рамногалактуронан  $\alpha$ -1,2-галактуроногидролаза EC3.2.1.173 [22, 32–35]. В молекулярной структуре ферментов  $\beta$ -спираль скомпонована в три параллельных  $\beta$ -листа (Рисунок 11). Активный сайт фермен-

тов данного семейства включает кластер из четырех остатков аминокислот Asp177, Asp180, Asp197 и Glu198, а также — отдельно стоящий остаток Asp156. При этом расстояние между функциональными группами остатков Asp180 и Asp156 хорошо согласуется с существующим пониманием каталитического механизма инверсии гликозидных связей.

В семейство GH78 из рассматриваемых ферментов входит только рамногалактуронан  $\alpha$ -L-рамногидролаза EC3.2.1.174 [36,37]. Молекулярная структура фермента включает пять отдельных доменов, собранных воедино в четвертичную структуру. При этом четыре домена в высокой степени насыщены  $\beta$ -структурами (спиралями и листами), в то время как пятый — каталитически активный и самый большой — представлен в конформации  $(\alpha/\alpha)_6$ -ротора (Рисунок 12). Для рамногалактуронан  $\alpha$ -L-рамногидролазы EC3.2.1.174, входящей в данное семейство, точный пул ключевых аминокислотных остатков активного сайта неизвестен. По некоторым предположениям [36], в качестве таковых может выступать Glu572 в комбинации с Asp567 или Glu841.

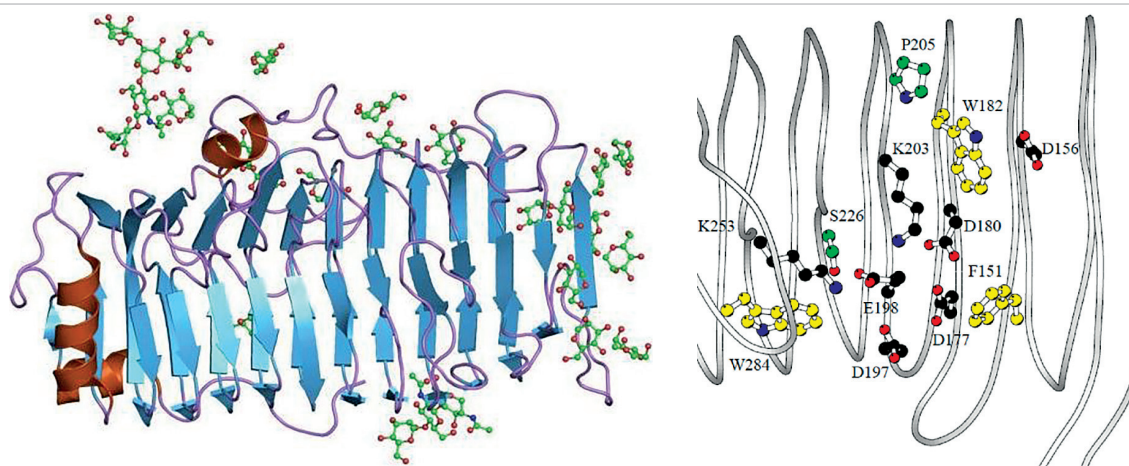
В семейство GH105 входит ненасыщенная рамногалактуронил гидролаза EC3.2.1.172 [38,39]. Особенность ферментов данного семейства состоит в том, что сам фермент мономерен, то есть, представлен единственным доменом, имеющим структуру  $(\alpha/\alpha)_6$ -ротора (Рисунок 13). Ключевым каталитическим аминокислотным остатком активного



Примечание: А — пространственное отображение трехмерной структуры фермента с доменами I, II и III (домен III — в конфигурации  $(\alpha/\alpha)_6$ -ротора), с активным сайтом в домене III и с катионом  $\text{Ca}^{2+}$ ; Б и В — увеличенные области активного сайта с каталитическими центрами Arg634 и Arg648.

Рисунок 10. Молекулярная структура тела и активного сайта фермента семейства PL26 [31]

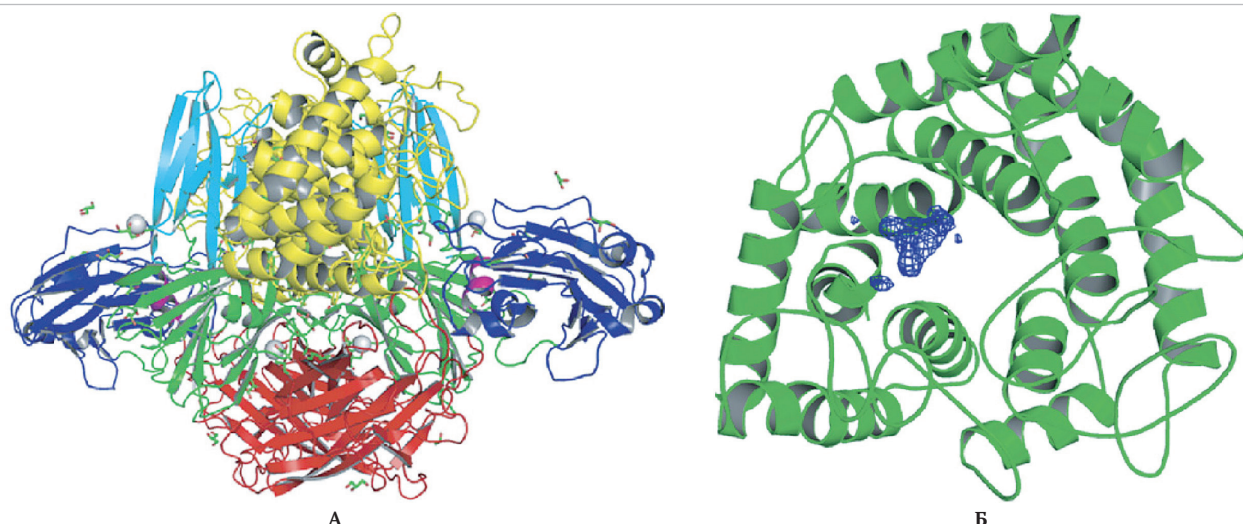
Figure 10. Molecular structure of the body and active site of the enzyme of the PL26 family [31]



Примечание: А — пространственное отображение трёхмерной структуры фермента с параллельными  $\beta$ -спиралями; Б — увеличенная область активного сайта с каталитическими центрами Asp180 (D180) и Asp156 (D156).

Рисунок 11. Молекулярная структура фермента семейства GH28 [34,38]

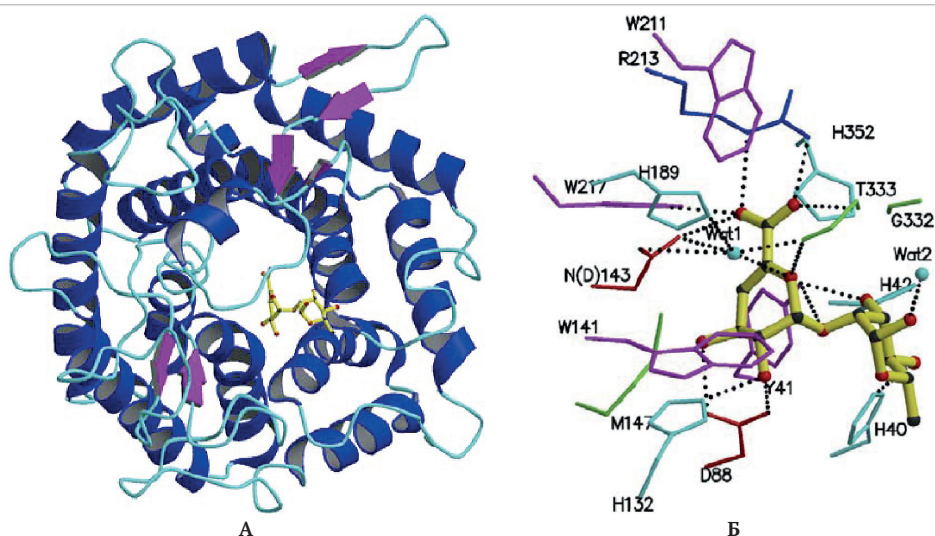
Figure 11. Molecular structure of the enzyme of the GH28 family [34,38]



Примечание: А — пространственное отображение трёхмерной структуры фермента, включающей пять доменов; Б — каталитически-активный домен в конформации  $(\alpha/\alpha)_6$ -ротора.

Рисунок 12. Молекулярная структура фермента семейства GH78 [36,38]

Figure 12. Molecular structure of the enzyme of the GH78 family [36,38]



Примечание: А — пространственное отображение трёхмерной структуры фермента в конформации  $(\alpha/\alpha)_6$ -ротора; Б — увеличенные области активного сайта с каталитическими аминокислотными остатками Asn(Asp)143 (D143), Thr333 (T333) и His189 (H189).

Рисунок 13. Молекулярная структура тела и активного сайта фермента семейства GH105 [39]

Figure 13. Molecular structure of the body and active site of the enzyme of the GH105 family [39]



сайта является Asn(Asp)143. При этом важную роль в каталитическом процессе играют также остатки Thr333 и His189, удерживающие молекулу воды, которая участвует в процессе гидролитического расщепления гликозидной связи, в каталитически выгодной позиции (Рисунок 14).

К семейству GH138 относится фермент рамногалактуронан  $\alpha$ -1,2-галактуроногидролаза EC3.2.1.173 [40,41]. Четвертичная молекулярная структура фермента образована четырьмя доменами (ND1, D2, D3 и CB4). Активный сайт локализован в домене D2, имеющем конформацию  $(\beta/\alpha)_8$ -ротора (Рисунок 15).

В составе активного сайта аминокислотные остатки Arg332 и Arg521 выполняют роль детерминанта специфичности каталитической активности фермента в отношении остатков D-галактуроновой кислоты.

В то же время ключевыми аминокислотными остатками, определяющими каталитическую активность фермента, являются Glu294 и Glu361 (Рисунок 16).

Описанная классификация ферментов лиазного и гидролазного действия, фрагментирующих основную цепь рамногалактуронана, с точки зрения некоторых учёных является избыточной. Так, одни исследователи [31,42-45] полагают,

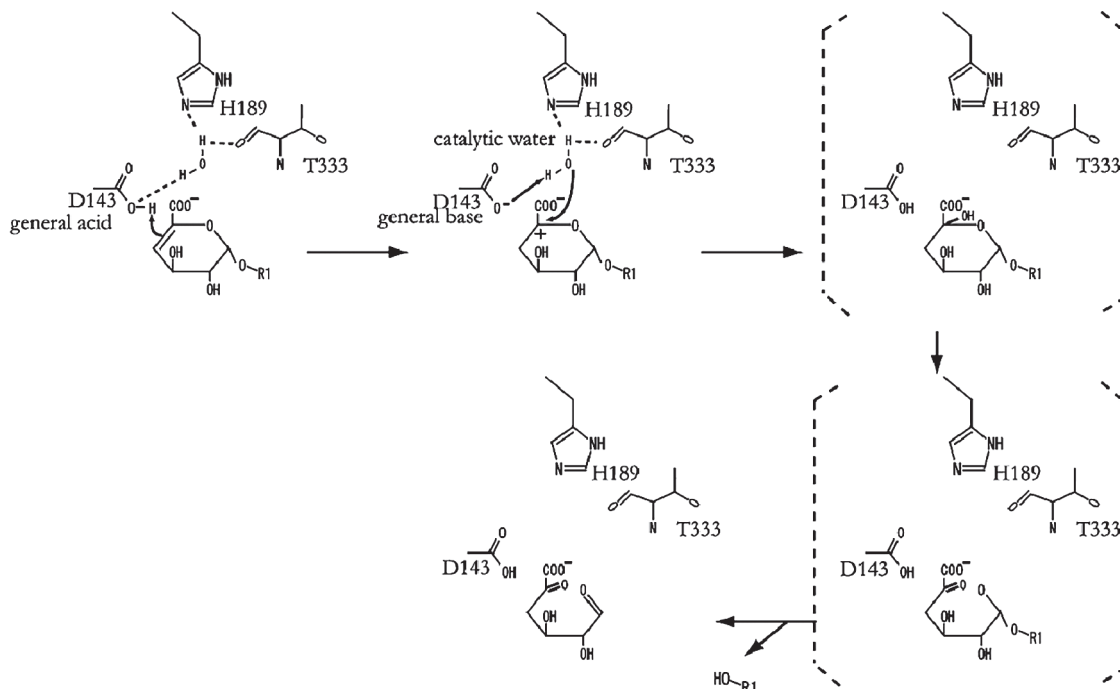
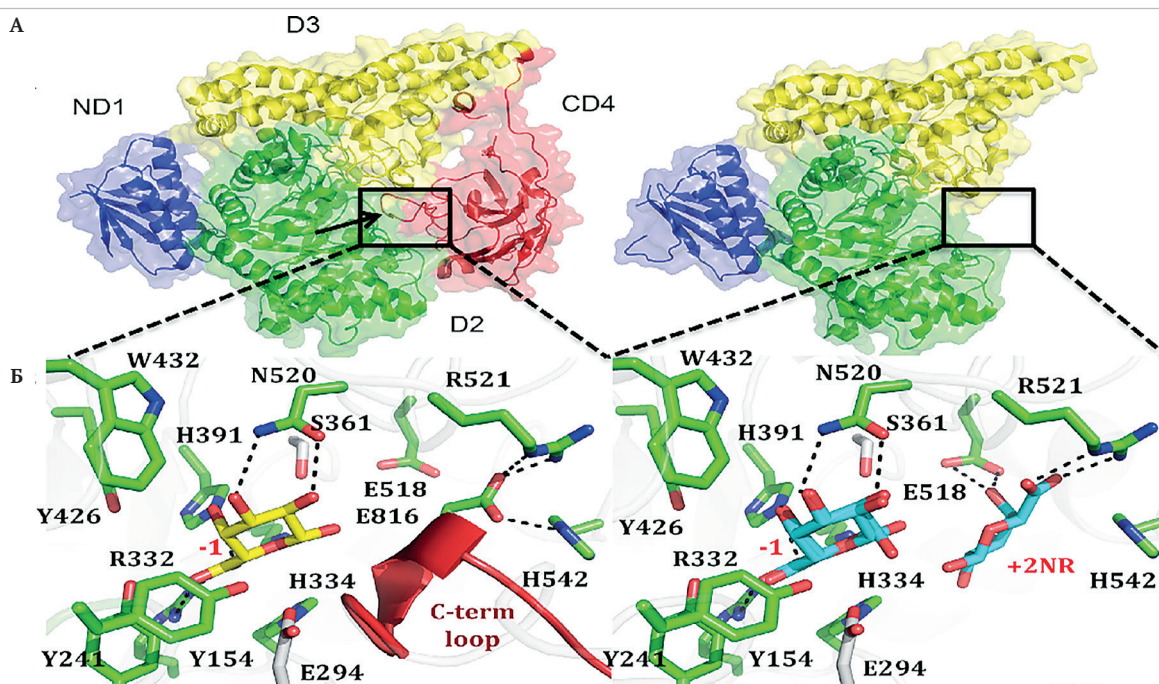
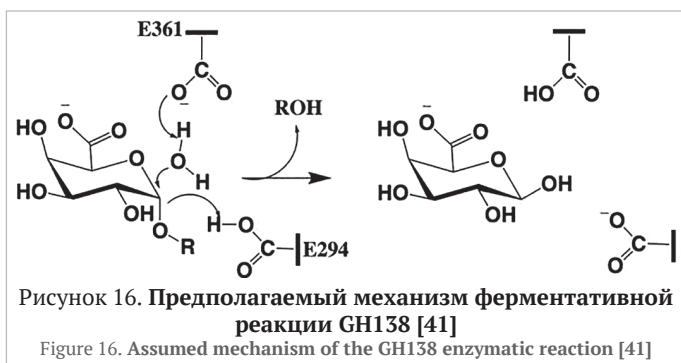


Рисунок 14. Предполагаемый механизм ферментативной реакции GH105 [39]  
Figure 14. Assumed mechanism of the GH105 enzymatic reaction [39]



Примечание: А — пространственное отображение трёхмерной структуры фермента с четырьмя доменами ND1, D2, D3 и CB4; Б — увеличенные области активного сайта в конформации  $(\beta/\alpha)_8$ -ротора с каталитическими аминокислотными остатками Glu361 (S361) и Glu294 (E294)

Рисунок 15. Молекулярная структура тела и активного сайта фермента семейства GH138 [41]  
Figure 15. Molecular structure of the body and active site of the enzyme of the GH138 family [41]

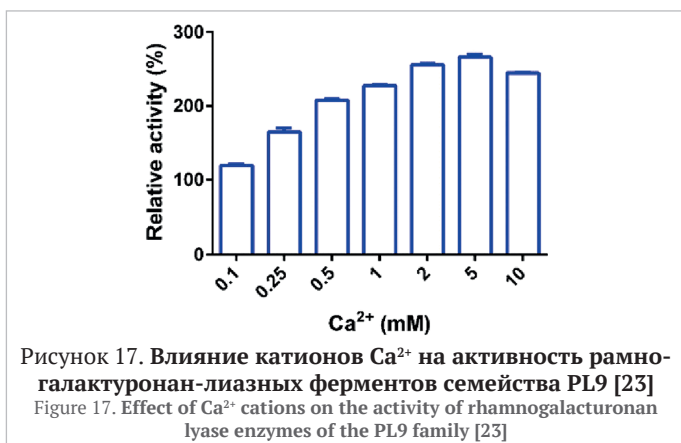


что рамногалактуронан лиазы эффективно представлены всего двумя семействами — PL4 и PL11, другие авторы [46] относят к ним также семейство PL26. В то же время в работе [47] и в базе данных The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy) [15] речь идёт уже обо всех четырёх семействах.

Похожая картина имеет место и в отношении гликозид-гидролаз: в работе [45] из четырёх описанных семейств рамногалактуронан-гидролаз к таковым отнесены только GH28 и GH78, тогда как в [37,44] — GH28 и GH105. Более того, в работах [11,45] к рамногалактуронан-гидролазам не относят ферменты группы EC3.2.1.172. В то же время в базе данных CAZy [15] так же речь идет обо всех четырёх семействах.

#### 4.3. Влияние катионов на ферментативную активность лиаз и гидролаз

На каталитическую активность ферментов, фрагментирующих основную цепь рамногалактуронана, может оказывать влияние как концентрация субстрата (в этом случае сам процесс следует рассматривать в контексте классической ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен), так и концентрация сторонних компонентов, в качестве которых могут теоретически выступать и продукты ферментативного процесса. Однако, несомненно, первостепенную роль играют условия проведения процесса: температура и pH среды. Так как каждый рассматриваемый фермент как лиазного, так и гидролазного действия имеет свои значения оптимума температуры процесса и pH среды при условии наличия необходимого субстрата. Также в отношении лиаз особую значимость приобретает концентрация катионов поливалентных металлов. При этом влияние катионов на ферменты разных семейств лиаз проявляется по-разному. Так, все рассматриваемые семейства полисахарид-лиаз, за исключением PL4, крайне чувствительны к присутствию катионов  $Ca^{2+}$ : в отсутствии в среде катионов каталитическая активность ферментов практически исчезает [23,25,27,29,30]. При этом все исследователи отмечают, что введение в систему комплексона приводит



к частичной или полной инактивации фермента. Стоит заметить, что инактивация эта носит обратимый характер: при восстановлении концентрации  $Ca^{2+}$  активность практически полностью восстанавливается. Такое положение дел, по всей вероятности, связано с обязательным присутствием катионов в теле фермента. Причем в большинстве случаев сами катионы являются составляющей активных сайтов ферментов и непосредственно участвуют в каталитическом процессе. По всей видимости, в составе фермента катионы достаточно подвижны, чтобы в случае гипотонической концентрации их в среде покинуть исходное местоположение, переходя в неё.

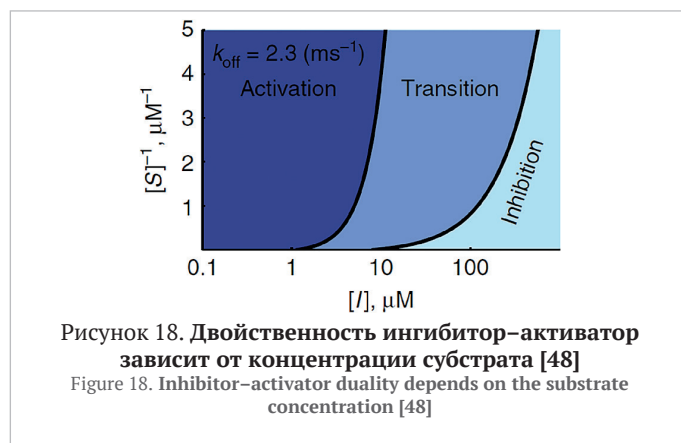
Полисахарид-лиазы семейства PL4 нарушают общую картину, не требуя обязательного присутствия катионов  $Ca^{2+}$  в среде [16,18–20], что, предположительно, может быть связано с пониженной подвижностью катионов в составе фермента на фоне повышенного сродства к связанным с ними остаткам аминокислот.

Во всех работах отмечено, что вне зависимости от принадлежности к описанным семействам полисахарид-лиаз для всех входящих в них ферментов имеет место повышение активности при некотором увеличении концентрации  $Ca^{2+}$  в среде. При этом в работах [19,23,25,27,29,30] показано, что возрастанию активности лиазных ферментов может способствовать увеличение концентрации в среде не только катионов  $Ca^{2+}$ , но и  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и даже  $Hg^{2+}$ . Однако те же авторы отмечают, что при превышении некоторого критического значения концентрации катионов в среде активность фермента начинает убывать, что указывает на инициацию процессов ингибирования (Рисунок 17).

Таким образом, присутствие одних и тех же катионов в среде может инициировать как усиление активности ферментов, так и её инактивацию. Это хорошо согласуется с теорией [48] о двойственности влияния (Рисунок 18). Также на активность лиазных ферментов может оказывать влияние присутствие в среде либо накопление в ней в процессе ферментативной реакции отдельных углеводов (Таблица 1).

В отношении гидролазных ферментов, не содержащих нативно в составе своей молекулярной структуры катионы  $Ca^{2+}$ , в настоящее время нет однозначного представления о влиянии катионов на каталитическую активность. Однако отдельные исследования [49–51] косвенно указывают на такую возможность.

Протопектиновый комплекс матрикса клеточных стенок растительной ткани — надмолекулярная структура, одним из основных компонентов которой являются цепи рамногалактуронана. Он включает в свой состав не только полигликановые структуры, но и элементы их взаимосвязи, в том числе  $Ca^{2+}$ - и  $Mg^{2+}$ -, а также солевые (комбинированные с кислотным остатком) мостики (Рисунок 19).



Следовательно, в процессе ферментативной фрагментации протопектинового комплекса локальные концентрации высвобождающихся катионов могут превышать некоторые пороговые значения.

Таблица 1. Влияние различных углеводов на рамногалактуронан экзо-лиазы (PL11) [25]

Table 1. Effect of different carbohydrates on rhamnogalacturonan exo-lyases (PL11) [25]

Добавленные углеводы *	Активность, % **	
	YesW	YesX
—	100	100
L-фукоза	108	92
D-галактоза	89	104
D-глюкоза	86	120
D-глюкуроновая кислота	117	125
D-манноза	117	116
L-рамноза	108	124
D-ксилоза	106	137
D-сахароза	77	120
D-галактуроновая кислота (GalA)	43	59
2-деоксиглюкоза	73	102
D-глюкозамин	90	108

\* Углеводы добавлены в концентрации 5 мМ;

\*\* Активность в вариантах без углеводов принята за 100%.

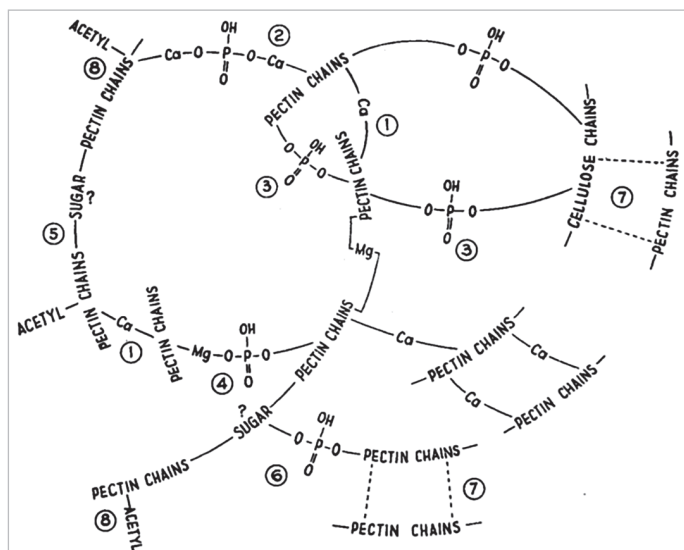


Рисунок 19. Структура связей между участками протопектинового комплекса, а также неуронидными полигликановыми компонентами матрикса клеточной стенки растительной ткани [52,53]

Figure 19. Structure of bonds between sites of the protopectin complex as well as non-uronide polyglycan components of the cell wall matrix of plant tissue [52,53]

Таким образом, разработка подхода к определению необходимой степени предварительной декатионизации субстрата с использованием комплексона и последующим его удалением из среды является актуальным направлением.

### 5. Выводы

Благодаря широкому спектру физико-химических, технологических и органолептических свойств, пектиновые вещества, направленно выделяемые из растительного сырья, имеют наибольший потенциал применения в пищевой и перерабатывающей промышленности среди остальных компонентов матрикса клеточных стенок. Поскольку основную функциональную нагрузку несут гомогалактуроновые фрагменты протопектинового комплекса в составе полимерных цепей рамногалактуронана, направленная биотехнологическая деструкция данных компонентов протопектинового комплекса с использованием ферментов лиазного и гидролазного действия представляет собой наиболее перспективный технологический подход при разработке эффективных технологий промышленного производства пектина. В соответствии с классификацией по механизму ферментативной деструкции основной цепи рамногалактуронана, ферменты лиазного действия представлены двумя группами, а гидролазного — четырьмя. В то же время, в соответствии с классификацией по молекулярной структуре, каждый рассматриваемый вид ферментов представлен четырьмя семействами. При этом данные классификации пересекаются, и в каждое семейство может входить как одна группа ферментов, так и несколько. Следует учитывать, что особенностью ферментов лиазного действия является непременно присутствие в одном или нескольких доменах катионов  $Ca^{2+}$ , за исключением семейства PL4. Катионы играют роль стабилизаторов/фиксаторов галактуронидных звеньев в положении, благоприятном для выполнения целевыми аминокислотными остатками активных сайтов ферментов своих каталитических функций. В составе гидролазных ферментов катионы  $Ca^{2+}$  не участвуют. Такое положение дел способствует чувствительности каталитической активности ферментов лиазного действия к присутствию катионов  $Ca^{2+}$  в системе «фермент — субстрат». При этом существует некоторый предел концентрации катионов, при превышении которых они начинают оказывать антагонистическое влияние на активность ферментов. В отношении ферментов гидролазного действия описанных семейств однозначное мнение на этот счёт отсутствует. Однако имеющиеся разрозненные данные показывают ненулевую вероятность наличия предела концентрации катионов и для данных ферментов. Учитывая особенности состава и структуры протопектинового комплекса, а молекулярные особенности целевых ферментов лиазного и гидролазного действия, при разработке биотехнологии промышленного производства пектиновых веществ с использованием ферментов необходимо принимать во внимание возможный ингибирующий эффект от присутствия катионов  $Ca^{2+}$  в системе. Для этого целесообразно исследовать возможность проведения предварительной декатионизации — удаления избыточной части катионов из системы непосредственно перед ферментативной обработкой.





29. Dhillon, A., Fernandes, V. O., Dias, F. M. V., Prates, J. A. M., Ferreira, L. M. A., Fontes, C. M. G. A. et al. (2016). A new member of family 11 Polysaccharide Lyase, Rhamnogalacturonan Lyase (CtRGLf) from *Clostridium thermocellum*. *Molecular Biotechnology*, 58(4), 232–240. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9921-6>
30. Wang, W., Wang, Y., Yi, H., Liu, Y., Zhang, G., Zhang, L. et al. (2022). Biochemical characterization of two Rhamnogalacturonan Lyases from *Bacteroides ovatus* ATCC8483 with preference for RG-I substrates. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 799875. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.799875>
31. Kunishige, Y., Iwai, M., Nakazawa, M., Ueda, M., Tada, T., Nishimura, S. et al. (2018). Crystal structure of exo-rhamnogalacturonan lyase from *Penicillium chrysogenum* as a member of polysaccharide lyase family 26. *FEBS Letters*, 592(8), 1378–1388. <https://doi.org/10.1002/1875-3468.13034>
32. Kofod, L. V., Kauppinen, S., Christgau, S., Andersen, L. N., Heldt-Hansen, H. P., Dörreich, K. et al. (1994). Cloning and characterization of two structurally and functionally divergent rhamnogalacturonases from *Aspergillus aculeatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 29182–29189. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)62028-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)62028-4)
33. Suykerbuyk, M. E., Kester, H. C., Schaap, P. J., Stam, H., Musters, W., Visser, J. (1997). Cloning and characterization of two rhamnogalacturonan hydrolase genes from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2507–2515. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2507-2515.1997>
34. Petersen, T. N., Kauppinen, S., Larsen, S. (1997). The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. *Structure*, 5(4), 533–544. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00209-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00209-8)
35. Fu, J., Prade, R., Mort, A. (2001). Expression and action pattern of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) rhamnogalacturonan hydrolase in *Pichia pastoris*. *Carbohydrate Research*, 330(1), 73–81. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00268-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00268-8)
36. Cui, Z., Maruyama, Y., Mikami, B., Hashimoto, W., Murata, K. (2007). Crystal structure of glycoside hydrolase family 78  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Bacillus sp.* GL1. *Journal of Molecular Biology*, 374(2), 384–398. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.003>
37. Matsumoto, S., Yamada, H., Kunishige, Y., Takenaka, S., Nakazawa, M., Ueda, M. et al. (2017). Identification of a novel *Penicillium chrysogenum* rhamnogalacturonan rhamnohydrolase and the first report of a rhamnogalacturonan rhamnohydrolase gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.008>
38. Shrivastava, S. (2020). Introduction to glycoside hydrolases: Classification, identification and occurrence. Chapter in a book: *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases*. Singapore: Springer, 2020. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4767-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4767-6_1)
39. Itoh, T., Ochiai, A., Mikami, B., Hashimoto, W., Murata, K. (2006). Structure of unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(4), 1021–1029. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.034>
40. Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A. S., Baslé, A., Gray, J. et al. (2017). Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, 544(7648), 65–70. <https://doi.org/10.1038/nature21725>
41. Labourel, A., Baslé, A., Munoz-Munoz, J., Ndeh, D., Booth, S., Nepogodiev, S.A. et al. (2019). Structural and functional analyses of glycoside hydrolase 138 enzymes targeting chain A galacturonic acid in the complex pectin rhamnogalacturonan II. *Journal of Biological Chemistry*, 294(19), 7711–7721. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.006626>
42. Ochoa-Jiménez, V.-A., Berumen-Varela, G., Fernández-Valle, R., Tiznado-Hernández, M.-E. (2018). Rhamnogalacturonan Lyase: A Pectin modification enzyme of higher plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(11), 910–917. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i11.1858>
43. van den Brink, J., de Vries, R.P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1477–1492. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2>
44. Silva, I. R., Jers, C., Meyer, A. S., Mikkelsen, J. D. (2016). Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New Biotechnology*, 33(1), 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.07.008>
45. Samanta, S. (2019). Microbial pectinases: A review on molecular and biotechnological perspectives. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(2), 248–266. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.248-266>
46. Méndez-Yañez, A., Carrasco-Orellana, C., Herrera, R., Moya-León, M. A. (2020). Isolation of a rhamnogalacturonan lyase expressed during ripening of the Chilean strawberry fruit and its biochemical characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.041>
47. Lombard, V., Bernard, Th., Rancurel, C., Brumer, H., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2010). A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycoinformatics. *Biochemical Journal*, 432(3), 437–444. <https://doi.org/10.1042/BJ20101185>
48. Robin, T., Reuveni, S., Urbakh, M. (2018). Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nature Communications*, 9, Article 779. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02995-6>
49. Furusawa, G., Azami, N. A., Teh, A.-H. (2021). Genes for degradation and utilization of uronic acid-containing polysaccharides of a marine bacterium *Catenovulum sp.* CCB-QB4. *PeerJ*, 9, Article e10929. <http://doi.org/10.7717/peerj.10929>
50. O'Neill, E. C., Stevenson, C. E.M., Paterson, M. J., Rejzek, M., Chauvin, A.-L., Lawson, D. M. et al. (2015). Crystal structure of a novel two domain GH78 family  $\alpha$ -rhamnosidase from *Klebsiella oxytoca* with rhamnose bound. *Proteins*, 85(9), 1742–1749. <https://doi.org/10.1002/prot.24807>
51. Fujimoto, Z., Jackson, A., Michikawa, M., Maehara, T., Momma, M., Henrissat, B. et al. (2013). The structure of a Streptomyces avermitilis  $\alpha$ -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 12376–12385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460097>
52. Joslyn, M. A. (1963). The Chemistry of protopectin: A critical review of historical data and recent developments. *Advances in Food Research*, 11, 1–107. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60064-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60064-6)
53. Henglein, F. A. (1958). Die Uron- und Polyuronsäuren (Pektin und Alginsäure). Chapter in a book: *Aufbau Speicherung Mobilisierung und Umbildung der Kohlenhydrate*. Handbuch der Pflanzenphysiologie, V.6. Berlin, Heidelberg: Springer, 1958. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-94731-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-94731-5_18) (In German)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
<b>Принадлежность к организации</b>	<b>Affiliation</b>
Кондратенко Владимир Владимирович — кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник, лаборатория технологии молочнокислых концентратов, пищевых добавок и производства продуктов на их основе, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности 115093, Москва, ул. Люсиновская, 35/7 Тел.: +7-916-328-61-03 E-mail: v_kondratenko@vnimi.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-0913-5644">https://orcid.org/0000-0002-0913-5644</a> * автор для контактов	Vladimir V. Kondratenko, Candidate of Technical Sciences, Docent, Senior Researcher, Laboratory of Technology for Milk-Protein Concentrates, Food Additives and Products on their Basis, Russian Dairy Research Institute 35/7, Lusinovskaya Str., Москва, 115093, Russia Tel.: +7-916-328-61-03 E-mail: v_kondratenko@vnimi.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-0913-5644">https://orcid.org/0000-0002-0913-5644</a> * corresponding author
Кондратенко Татьяна Юрьевна — старший научный сотрудник, лаборатория технологии пищевых систем общего и специализированного назначения, Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования 142703, Россия, Московская область, г. Видное, ул. Школьная, 78 Тел.: +7-985-445-76-23 E-mail: t.kondratenko@fncps.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0001-8237-0774">https://orcid.org/0000-0001-8237-0774</a>	Tatyana Yu. Kondratenko, Senior Researcher, Laboratory of Food Systems Technology for General and Specialized Purposes, Russian Research Institute of Canning Technology 78, Shkolnaia Str., 142703, Vidnoe, Moscow region, Russia Tel.: +7-985-445-76-23 E-mail: t.kondratenko@fncps.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0001-8237-0774">https://orcid.org/0000-0001-8237-0774</a>
<b>Критерии авторства</b>	<b>Contribution</b>
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
<b>Конфликт интересов</b>	<b>Conflict of interest</b>
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.