

ЭКСПРЕСС-МЕТОД АНАЛИЗА ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ИНУЛИНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ

© 2018 г. М.Г. Холявка, В.Г. Аргюхов, С.М. Макин

Воронежский государственный университет, 304018, Воронеж, Университетская площадь, 1

E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 09.07.15 г.

После доработки 02.05.17 г.

Компьютерное моделирование вторичных структур (расчет соотношения α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных участков) является перспективным и необходимым на первых этапах изучения структурно-функциональных особенностей инулиназ, так как позволяет получить сведения о пределах колебаний тестируемых показателей. Однако расчетные данные должны быть подкреплены рядом работ биофизического и биохимического характера, в том числе экспериментами с использованием инфракрасной спектроскопии. Расхождение экспериментальных и расчетных результатов в нашей работе составило для инулиназы из *Aspergillus awamori* 3–4%, а для фермента из *Kluyveromyces marxianus* – 12–18%. По этой причине можно утверждать, что анализ вторичных структур ферментов достаточно актуален при составлении быстрых прогнозов относительно диапазона колебаний физико-химических и кинетических характеристик белковых молекул, а также для экспресс-оценки их динамического состояния.

Ключевые слова: инулиназа, вторичная структура, компьютерный анализ

Инулиназа (КФ 3.2.1.7) расщепляет инулин и другие фруктосодержащие полимеры, играя важную роль в превращении резервных полифруктозидов типа инулина или левана во фруктозу, которая является источником углерода и энергии для растений и микроорганизмов. Биотехнологи стали изучать инулиназы из-за перспективы их использования с целью получения сиропов с высоким содержанием фруктозы и для синтеза олигосахаридов, являющихся пребиотическими компонентами [1–5].

В настоящее время в исследовании биокаatalизаторов промышленного назначения достаточно актуальны проблемы изучения их структурных особенностей, трактовки механизма катализа, идентификации функциональных групп активных центров фермента. Эти знания помогают существенно удешевить процесс производства за счет сокращения стадии НИОКР и усовершенствовать технологические линии.

При изучении молекулярных механизмов действия ферментов класса гидролаз, к которому относится и инулиназа, как правило, недостаточно исследования структурно-функциональных свойств биохимическими методами, необходимо осуществление детального анализа белковых макромолекул на всех уровнях их организации [6,7]. Особенности вторичных структур белков обуславливают их пространственную организацию, следовательно, и эф-

фективность функционирования. С этой целью нами был проведен сравнительный анализ вторичных структур инулиназ из разных продуцентов на основании расчета соотношения α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных участков макромолекул ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сведения об аминокислотных последовательностях инулиназ получали в National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>).

Соотношение упорядоченных и неупорядоченных структур в составе молекул инулиназ определяли с помощью двух программ:

1) GOR (Garnier–Osguthorpe–Robson) – метод основан на определении вероятности соответствия количества α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных структур параметрам, полученным для известного белка с помощью рентгеновской кристаллографии. Метод GOR учитывает не только «склонности» индивидуальных аминокислот, но также и вероятность образования α -спиралей или β -слоя с учетом соседних аминокислотных остатков (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_gor4.html).

2) SOPMA (Self-Optimized Prediction Method with Alignment) – прогнозирует расположение

Таблица 1. Структурные и физико-химические характеристики инулиназ из различных продуцентов

1	2	3						4		5
Продуцент	Источник аминокислотной последовательности	Содержание типов вторичной структуры в молекуле инулиназы в %, рассчитанное в программах						Свойства фермента		Литературные источники
		GOR			SOPMA					
		α -спирали	β -слои	Неупорядоченные структуры	α -спирали	β -слои	Неупорядоченные структуры	<i>t</i> , °C	pH	
Дрожжи										
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	[18]	6,38	36,77	56,85	5,82	30,77	56,66	49–55	4,5–5,5	[19–26]
	[27]	7,39	35,86	56,75	8,29	30,27	54,59			
	[28]	8,45	34,71	56,84	8,81	30,40	53,42			
	[29,30]	8,47	34,23	57,30	7,39	32,25	52,97			
Микромицеты										
<i>Aspergillus ficuum</i>	[31,32]	8,72	31,78	59,50	11,63	28,68	55,62	50	5,4	[33]
	[34]	18,81	26,63	54,56	9,31	28,12	55,49			
<i>Aspergillus niger</i>	[35]	7,36	33,91	58,73	10,08	30,43	53,10	50–60	4,0–6,0	[36,37]
	[38]	6,07	32,59	61,34	8,10	28,74	56,88			
	[39]	7,75	31,2	61,05	10,66	29,07	54,46			
	[35]	8,72	31,78	59,50	10,47	30,04	53,88			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	[35]	18,81	26,26	54,93	10,99	28,86	54,38	60	5,5–6,0	[41–44]
	[40]	14,94	27,45	57,61	9,39	30,30	52,63			
<i>Aspergillus awamori</i>	[45]	13,26	25,57	61,17	9,28	29,36	54,73	60	4,0	[1]
	[46]	11,13	28,03	60,84	9,94	29,62	54,27			
Бактерии										
<i>Bacillus polymyxa</i>	[47]	23,51	27,01	49,48	7,63	31,96	54,64	35–40	7,0	[48–50]
<i>Arthrobacter sp. S37</i>	[51]	20,81	26,85	52,34	13,67	25,49	55,05	50	7,5	[52]
<i>Cryptococcus aureus</i>	[53]	10,36	31,64	58,00	7,45	30,18	58,00		5,0	[54–56]
	[53]	14,86	25,29	59,85	14,48	24,90	52,90			
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	[57]	14,77	29,74	55,49	9,58	30,54	52,50	55	6,0	[58]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	[59]	11,36	32,05	56,59	9,13	31,85	53,14	60		[59]

аминокислотных остатков не только в составе α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных структур, но также в составе поворотов и «шпилек» белковых макромолекул (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_sopma.html).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных нами расчетных данных трудно четко и однозначно выявить зависимость между структурными особенностями инулиназы и ее физико-химическими свойствами, однако, можно получить сведения о пределах колебаний тестируемых показателей.

В табл. 1 обобщены результаты расчетов, полученных в программах GOR и SOPMA (столбец 3), а также экспериментальные данные различных исследователей (столбец 4). Ферменты сгруппированы по таксономической принадлежности их продуцентов – дрожжи, микромицеты, бактерии, а внутри таксономической группы продуценты распределены по увеличению температурного оптимума выделенных из них инулиназ.

Логично предположить, что оптимальное значение температуры для функционирования инулиназ зависит от отношения количества аминокислотных остатков, расположенных в

Таблица 2. Содержание типов вторичной структуры инулиназ из различных продуцентов, рассчитанное с помощью компьютерных программ и метода инфракрасной спектроскопии

Продуцент	Источник аминокислотной последовательности	Содержание типов вторичной структуры в молекуле инулиназы в %					
		Рассчитанное в программах				Рассчитанное с использованием инфракрасной спектроскопии	
		GOR		SOPMA			
		α -спирали и β -слои	Неупорядоченные структуры	α -спирали и β -слои	Неупорядоченные структуры	α -спирали и β -слои	Неупорядоченные структуры
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	[18]	43,15	56,85	36,59	56,66	55	45
	[27]	43,25	56,75	38,56	54,59		
	[28]	43,16	56,84	39,21	53,42		
	[29,30]	42,70	57,30	39,64	52,97		
<i>Aspergillus awamori</i>	[46]	39,16	60,84	39,56	54,27	43	57

упорядоченных структурах, к тем, что образуют петли, однако подобной корреляции мы не обнаружили ни при более раннем сопоставлении первичных структур различных инулиназ [8], ни при анализе их вторичных структур в данном исследовании.

Соотношение числа аминокислотных остатков в α -спиралях, β -слоях и неупорядоченных структурах коррелирует с видом продуцента в большей степени, чем с физико-химическими характеристиками фермента.

Наши модельные расчеты мы сопоставили с собственными данными, полученными методом инфракрасной спектроскопии [9], который дает сведения о вторичной структуре белков (соотношении α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных структур) [10,11] и успешно применяется российскими и западными учеными для этих целей [12–17].

Из табл. 2 видно, что по результатам эксперимента фермент, выделенный из *Kluyveromyces marxianus*, имеет более упорядоченную структуру по сравнению с инулиназой из *Aspergillus awamori*: у него наблюдается меньшая протяженность нерегулярных участков и большая протяженность α -спиралей и β -слоев.

Расхождение экспериментальных и расчетных результатов составило для инулиназы из *Aspergillus awamori* 3–4%, а для фермента из *Kluyveromyces marxianus* – 12–18%. Колебания результатов при использовании названных программ составляли максимум 13–14%.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что компьютерное моделирование вторичных структур инулиназ из различных продуцентов является перспективным на первых этапах изучения структурно-функциональных свойств ферментов, так как позволяет эконо-

мить временные и материальные ресурсы, его вполне достаточно для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик белковых молекул и экспресс-оценки их динамического состояния. Для получения более точных результатов расчетные данные должны быть подкреплены рядом работ биофизического и биохимического характера, в частности экспериментами с использованием методов инфракрасной спектроскопии, кругового дихроизма, рентгеноструктурного анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О. С. Корнеева, *Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды* (Изд-во Воронежского государственного университета, Воронеж, 2001).
2. S. Curcio, E. Ricca, V. Calabro, and G. Iorio, *Food Technol. Biotechnol.* **52** (3), 317 (2014).
3. Н. К. Rawat, М. А. Ganaie, and N. Kango, *Antonie Van Leeuwenhoek* **107** (3), 799 (2015).
4. L. L. Zhang, M. J. Tan, G. L. Liu, et al., *Mol. Biotechnol.* **57** (4), 337 (2015).
5. T. Mutanda, M. P. Mokoena, A. O. Olaniran, et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41** (6), 893 (2014).
6. M. R. Arjomand, M. Habibi-Rezaei, G. Ahmadian, et al., *Int. J. Biol. Macromolecules* **92**, 1234 (2016).
7. A. M. Vandamme, C. Michaux, A. Mayard, and I. Housen, *FEBS Open Bio* **3**, 467 (2013).
8. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, Е. А. Хрупина и В. Г. Артюхов, *Компьютерные исследования и моделирование* **3** (1), 85 (2011).
9. Т. А. Ковалева и М. Г. Холявка, *Вопр. биол., мед. и фармацевтич. химии* **1**, 3 (2011).
10. И. Сердюк, Н. Заккаи и Дж. Заккаи *Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика: учебное пособие в 2 т.* (КДУ, М., 2009), т. 2.
11. I. N. Serdyuk, *Biophysics* **54** (2), 238 (2009).

12. R. Sarroukh, E. Cerf, S. Derclaye, et al., *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1429 (2011).
13. N. N. Brandt, A. A. Mankova, and A. Yu. Chikishev, *Moscow University Physics Bulletin* **66** (3), 282 (2011).
14. M. J. G'omara, B. J. Canto, M. A. Alsina, et al., *Lett. Peptide Sci.* **7**, 255 (2001).
15. S. P. Makarenko, V. A. Trufanov, and T. E. Putilina, *Rus. J. Plant Physiol.* **49** (3), 326 (2002).
16. L. Wang, P. Cai, H.-J. Galla, et al., *Eur. Biophys. J.* **34**, 243 (2005).
7. A. Ahmed-Ouameur, S. Diamantoglou, M. R. Sedaghat-Herati, et al., *Cell Biochem. Biophys.* **45**, 203 (2006).
18. J. H. Wang, M. H. Wang, D. Teng, et al., *Expression of recombinant exo-inulinase of Kluyveromyces marxianus IW9801 (CGM CC0360) in Pichia pastoris exi2086*. Patent: China CN 02124145.7-B 12-MAY-2004, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China.
19. E. J. Vandamme and D. G. Derycke, *Adv. Appl. Microbiol.* **29**, 139 (1983).
20. A. Pessoa and M. Vitolo, *Braz. J. Chem. Eng.* **16**, 237 (1999).
21. R. J. Rouwenhorst, M. Hensing, J. Verbakel, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (11), 3337 (1990).
22. M. Mazutti, G. Ceni, M. Di Luccio, and H. Treichel, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **30** (5), 297 (2007).
23. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и А. С. Таха, *Сорбционные и хроматографические процессы* **7** (5), 804 (2007).
24. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и А. С. Таха, *Биотехнология* **3**, 80 (2007).
25. В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и др., *Прикл. биохимия и микробиология* **46** (4), 422 (2010).
26. R. S. Singh, R. Dhaliwal, and M. Puri, *J. Microbiol. Biotechnol.* **17** (5), 733 (2007).
27. O. Laloux, J. P. Cassart, J. Delcour, et al., *FEBS Lett.* **289** (1), 64 (1991).
28. J. W. Chapman, W. Musters, R. J. Rouwenhorst, et al., *The use of the Kluyveromyces marxianus inulinase gene promoter for protein production*. Patent: WO 9413821-A1 23-JUN-1994, QUEST INT (NL).
29. T. Wen, F. Liu, K. Huo, and Y. Li, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19** (4), 423 (2003).
30. N. Lertwattanasakul, N. Rodrussamee, S. Suprayogi, et al., *AMB Express* **1**, 20 (2011).
31. T. Uhm, S. Chae, D. Lee, et al., *Biotechnol. Lett.* **20**, 809 (1998).
32. J. Pouyez, A. Mayard, A. M. Vandamme, et al., *Biochimie* **94** (11), 2423 (2012).
33. T. Mutanda, B. Wilhelmi, C.G. Whiteley, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **159** (1), 65 (2009).
34. X.-M. Chen, X.-M. Xu, and Z.-Y. Jin, *Expression, purification and characterization of exo-inulinase gene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADM21204.1>).
35. K. Ohta, H. Akimoto, S. Matsuda, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** (9), 1731 (1998).
36. G. Ongen-Baysal, S. Suha Sukan, and N. Vassilev, *Biotechnol. Lett.* **16** (3), 275 (1994).
37. C. Goosen, *Identification and characterization of glycoside hydrolase family 32 enzymes from Aspergillus niger* (2007) (<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/2007/c.goosen/>).
38. J. H. Wang, D. Teng, and Y. Yao, *Cloning of endo-inulinase gene from Aspergillus niger ENDOINU 9891 and its expression in Pichia methanolica* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/24754016>).
39. H. J. Pel, J. H. de Winde, D. B. Archer, et al., *Nat. Biotechnol.* **25** (2), 221 (2007).
40. W. C. Nierman, A. Pain, M. J. Anderson, et al., *Nature* **438** (7071), 1151 (2005).
41. P. K. Gill, R. K. Manhas, J. Singh, and P. Singh, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **117** (1), 19 (2004).
42. P. K. Gill, R. K. Manhas, and P. Singh, *Bioresource Technol.* **97** (2), 355 (2006).
43. P. K. Gill, R. K. Manhas, and P. Singh, *J. Food Engineer.* **76**, 369 (2006).
44. P. K. Gill, R. K. Manhas, and P. Singh, *Bioresource Technol.* **97**, 894 (2006).
45. N. D. Fedorova, N. Khaldi, V. S. Joardar, et al., *PLoS Genet.* **4** (4), 1000046 (2008).
46. M. Arand, A. M. Golubev, J. R. Neto, et al., *Biochem. J.* **362** (1), 131 (2002).
47. B.-W. Kim, D.-J. You, and H.-J. Kwon, *Nucleotide sequence of exo-inulinase from Bacillus polymyxa MGL21* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAL82575.1>).
48. H. J. Kwon, S. J. Jeon, D. J. You, et al., *Biotechnol. Lett.* **25** (2), 155 (2003).
49. Н. А. Жеребцов, И. Н. Абрамова и С. А. Шеламова, *Биотехнология* **3**, 13 (2002).
50. Н. А. Жеребцов, С. А. Шеламова и И. Н. Абрамова, *Прикл. биохимия и микробиология* **38** (6), 634 (2002).
51. S. I. Kang and S. I. Kim, *Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from Arthrobacter sp.S37* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAB63119.1>).
52. S. I. Kang, Y. J. Chang, S. J. Oh, and S. I. Kim, *Biotechnol. Lett.* **20**, 983 (1998).
53. T. S. Cao, G. Y. Wang, Z. Chi, et al., *Gene* **516** (2), 255 (2013).
54. J. Sheng, Z. Chi, F. Gong, and J. Li, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **144** (2), 111 (2008).
55. L. Gao, Z. Chi, J. Sheng, et al., *Microb. Ecol.* **54** (4), 722 (2007).
56. L. M. Gao, Z. M. Chi, J. Sheng, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 825 (2007).
57. Y.-M. Kwon and Y.-J. Choi, *DNA sequences and expression in Escherichia coli of an exo-inulinase gene (inu2) from Pseudomonas mucidolens* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAF44125.1>).
58. Y. M. Kwon, H. Y. Kim, and Y. J. Choi, *J. Microbiol. Biotechnol.* **10** (2), 238 (2000).
59. Y. Tsujimoto, A. Watanabe, K. Nakano, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62** (2-3), 180 (2003).

Express-Method for Analysis of Secondary Structures of Inulinases from Various Producers

M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov, and S.M. Makin

Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 304018 Russia

Computer simulation of secondary structures (calculation of the ratio of α -helices, β -sheets and unordered regions) is a perspective tool and needed for initial stages of studying the structural and functional features of inulinases which is able to estimate the ranges of the tested indicators' fluctuations. However, calculated data should be supported by a number of biophysical and biochemical experimental results, in particular, by experiments using IR-spectroscopy. In the present work, the difference between experimental and calculated results was 3–4% with regard to inulinase from *Aspergillus awamori*, and 12–18% as to the enzyme from *Kluyveromyces marxianus*. Consequently, it is possible to state that the analysis of secondary structures of the enzymes is much more applicable when making fast forecasts in relation to the range of fluctuations in physical, chemical and kinetic characteristics of proteins molecules, as well as an express-evaluation of the dynamic state of these molecules.

Keywords: inulinase, secondary structure, computer analysis