

УДК 577.325

## ПОИСК *insilico* ВОЗМОЖНЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ МОЛЕКУЛ ЭНДОИНУЛИНАЗЫ ИЗ *Aspergillus ficuum* И ЭКЗОИНУЛИНАЗЫ ИЗ *Aspergillus awamori* С ЗАРЯЖЕННЫМИ И ГИДРОФОБНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

© 2019 г. Ф.А. Сакибаев, М.Г. Холявка, С.М. Макин, В.Г. Артюхов

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

E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.10.2018 г.

После доработки 02.12.2018 г.

Принята к публикации 20.12.2018 г.

Исследованы состав и расположение заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков молекул эндо- (3SC7) и экзоинулиназы (1Y4W). Определено процентное соотношение аминокислот разных типов на поверхности молекул ферментов. Установлено, что заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки распределены по поверхности молекул неравномерно, образуя участки локального скопления. Показано, что наиболее перспективными носителями для иммобилизации эндоинулиназ являются положительно заряженные носители, которые, вероятно, будут взаимодействовать с одним из следующих участков на поверхности молекул фермента, удаленных от активного центра и содержащих Glu239, Glu243, Glu246, Glu247 и Asp275 (участок 1); Asp399, Asp424, Glu433, Glu452, Glu453, Asp454 и Glu497 (участок 2); Asp37, Asp92, Glu93 и Glu516 (участок 3). Для экзоинулиназы наиболее перспективны отрицательно заряженные носители, поскольку сайты связывания с ними, содержащие Lys225 и Lys247 (сайт 1); His80, Lys84, Lys118 и Lys121 (сайт 2); Lys381, Arg382, Arg 387, Lys390, Lys407, Lys415, Lys417, Lys479, Arg526 и Lys531 (сайт 3), локализованы на удаленных от активного центра участках поверхности молекул фермента. Наименее перспективны гидрофобные носители, так как на поверхности энзимов в области активного центра имеются аминокислотные остатки, с которыми могут связываться такие полимеры: Tyr39, Pro62, Val66, Leu172, Gly196 и Gly259 в случае эндоинулиназы; Tyr 47, Trp65, Pro85, Val86, Leu89, Leu161, Pro232, Gly237, Pro266, Pro270, Val293, Pro298, Gly299 и Gly 320 – в случае экзоинулиназы.

**Ключевые слова:** эндоинулиназа, экзоинулиназа, иммобилизация, сайты связывания, заряженные носители, гидрофобные носители.

DOI: 10.1134/S0006302919030025

В настоящее время инулин является перспективным биотехнологическим субстратом. Инулин выступает в роли запасного полисахарида в некоторых растениях, таких как топинамбур (*Helianthus tuberosus*), цикорий (*Cichorium intibus*, *Cichorium endivia*) и георгин (*Dahlia pinnata*) [1]. Инулин представляет собой линейный фруктан, содержащий от 20 до нескольких тысяч единиц фруктозы. Звенья в инулине связаны  $\beta$ -(2,1)-гликозидными связями, полимерная цепь заканчивается остатком глюкозы [2].

Фруктоза считается безопасной альтернативой сахарозы, поскольку оказывает благоприятное влияние на пациентов с сахарным диабетом, увеличивает усваиваемость железа у детей и имеет

более высокую подслащивающую способность [3, 4]. Известно, что сахароза вызывает проблемы, связанные с ожирением и атеросклерозом [5]. Кроме того, фруктоза лучше растворима в воде, чем сахароза, имеет меньшую вязкость, при этом ее метаболизм не требует присутствия инсулина [6].

Фруктоолигосахариды быстро распространяются как важные ингредиенты в пищевой и фармацевтической промышленности. Они обладают питательными свойствами, способствующими их применению в качестве компонентов низкокалорийных диет и источника пищевых волокон [4,7,8]. В связи с этим в настоящее время фруктоолигосахариды широко используются для за-

мены сахаров во многих пищевых продуктах, таких как кондитерские и молочные изделия [5, 9, 10].

Пребиотические фруктоолигосахариды в основном производятся с использованием микробных ферментов. Для максимального выхода фруктоолигосахаридов на промышленном уровне требуется большое количество ферментов с высокой активностью и стабильностью [11].

Микробные инулиназы относятся к важному классу промышленных ферментов, которые в последние годы приобретают все большее значение [12]. Инулиназы представляют собой гидролазы, способные расщеплять инулин. Эти ферменты продуцируются рядом микроорганизмов, включая грибы, дрожжи и бактерии. Они подразделяются по механизму гидролиза на две группы: экзо- и эндоинулиназы. Экзоинулиназы (КФ 3.8.1.80) отщепляют концевые остатки фруктозы от инулина, эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7) осуществляют гидролиз инулина вдали от них с образованием инулоолигосахаридов. Ферменты первой группы могут быть использованы для производства сиропов с высоким содержанием фруктозы, ферменты из второй группы – для получения инулоолигосахаридов различной длины молекул [13].

Инулиназы состоят из пятилопастного  $\beta$ -пропеллерного каталитического N-домена, содержащего активный центр, и C-терминального  $\beta$ -сэндвич-домена, включающего два  $\beta$ -листа с пятью  $\beta$ -тяжами. Вблизи от активного центра находятся несколько петель, которые могут быть вовлечены в связывание субстрата [14].

В качестве нуклеофильного остатка в активном центре экзоинулиназ выступает аспарагиновая кислота, которая в составе эндоинулиназ заменяется глутаминовой кислотой. Кроме того, каталитический центр эндоинулиназ отличается смещением одной из петель в связи с отсутствием дополнительного остатка триптофана, наличие которого в его составе характерно для экзоинулиназ (Trp335 в ферменте из *A. awamori*) [15]. Каталитический центр эндоинулиназ характеризуется значительно бóльшим числом входящих в его состав аминокислотных остатков, составляющим порядка 90 из 516 остатков. Для сравнения, каталитический центр у экзоинулиназы существенно меньше и включает 42 из 493 аминокислот [16].

Для структуры как эндо-, так и экзоинулиназ характерно наличие участка Arg-Asp-Pro, присутствие которого, предположительно, имеет важное значение для распознавания пиранозного кольца и, как следствие, для обеспечения специфичности фермента в отношении фруктопиранозных остатков. Последовательность данного участка сохраняется и в других классах фермен-

тов, таких как фруктозил-трансферазы или инвертазы [17].

Использование в промышленности водорасстворимых (свободных) форм ферментов накладывает ряд ограничений, таких как невозможность повторного использования фермента и его быстрого удаления из реакционной смеси, низкая резистентность катализатора к инактивирующим факторам и т.д. В связи с этим наиболее перспективными для применения в промышленности являются препараты иммобилизованных инулиназ. Использование метода адсорбционной иммобилизации в наибольшей степени способствует сохранению нативной структуры молекул и высокого уровня их каталитической активности за счет отсутствия химической модификации ферментов [16, 17].

Иммобилизация инулиназ на ионообменных носителях КУ-2, АВ-17-2П, ВИОН КН-1, АВ-16-ГС и АМ 21А приводит к увеличению температурного оптимума до 70°C с сохранением небольшой активности при 85–95°C. Такое изменение характеристик иммобилизованного фермента, указывающее на его стабилизацию под действием денатурирующих факторов, обусловлено уменьшением степени мобильности третичной структуры молекул инулиназы [18].

**Целью нашей работы** было выявление сайтов связывания на поверхности молекул эндо- и экзоинулиназы с положительно и отрицательно заряженными, а также гидрофобными носителями для иммобилизации ферментов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) [14] и экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W) [19]. Выявление аминокислотных остатков на поверхности молекул ферментов с доступностью для растворителя не менее 20% проводили с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 4.1.0. Локализацию гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков визуализировали с помощью программы Maestro 10.3.

Расстояние между ближайшими атомами аминокислотных остатков вычисляли на основе их координат по следующей формуле:

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

Аналогичным способом были рассчитаны расстояния от активного центра инулиназы до заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности ее молекулы.

Критерием группировки аминокислотных остатков в локальное скопление служила степень их удаленности друг от друга. Остатки были отнесены нами к одному скоплению в случае, если

**Таблица 1.** Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков с различными свойствами на поверхности молекул эндо- и экзоинулиназы

Аминокислотные остатки	Эндоинулиназа (3SC7)		Экзоинулиназа (1Y4W)	
	Абсолютное количество	Относительное количество	Абсолютное количество	Относительное количество
Гидрофобные	51	31%	48	31%
Положительно заряженные	13	8%	23	15%
Отрицательно заряженные	23	14%	29	18%
Незаряженные	78	47%	57	36%

среднее расстояние от каждого из них до трех ближайших аминокислот из определяемого скопления не превышало 10 Å. За начальное положение локального скопления принимали три аминокислотных остатка, среднее расстояние между которыми также не превышало 10 Å.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности молекул эндоинулиназы (3SC7) обнаруживаются 165, а экзоинулиназы (1Y4W) – 157 аминокислотных остатков, доступных для растворителя не менее чем на 20%. Среди них как в первом, так и во втором случае в наибольшей степени преобладают полярные незаряженные аминокислотные остатки. Количество гидрофобных аминокислот на поверхности молекул эндоинулиназы (3SC7) превышает число заряженных аминокислот, тогда как для экзоинулиназы (1Y4W) наблюдается обратная картина. Сведения об абсолютном и относительном количестве аминокислот, принадлежащих к указанным группам, представлены в табл. 1. Перечень заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул эндо- (3SC7) и экзоинулиназы (1Y4W) представлен в табл. 2.

Анализ моделей пространственной структуры эндо- (3SC7) и экзоинулиназ (1Y4W) показал, что остатки аминокислот распределены по поверхности молекул неравномерно, образуя участки локального скопления. На поверхности молекул эндоинулиназы (3SC7) обнаруживаются три участка локального скопления заряженных аминокислотных остатков (рис. 1). Один из таких участков полностью находится в области N-концевого домена и содержит наибольшее число

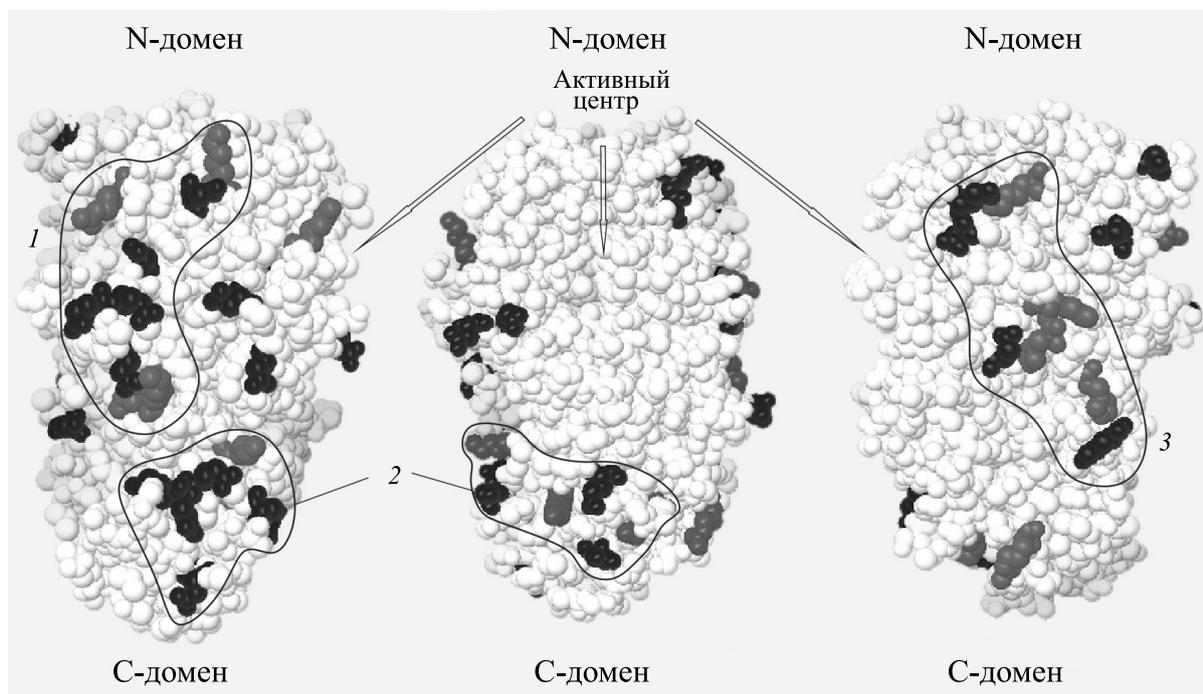
аминокислот; в его состав входят Arg183, Glu239, Glu243, Glu246, Glu247, Asp275, Lys277, Lys344, Lys345. Другой участок полностью расположен в области C-концевого домена и содержит Asp399, Lys410, Lys419, Asp424, Glu433, Lys450, Glu452, Glu453, Asp454, Glu497. Последний из представленных участков находится частично в области N-концевого, частично – C-концевого домена и включает Asp37, His82, His85, Lys86, Asp92, Glu93, Lys151, Glu516.

На основании большого количества отрицательно заряженных аминокислотных остатков можно сделать вывод о том, что поверхность молекул эндоинулиназы (3SC7) с наибольшей вероятностью будет связываться с положительно заряженными носителями.

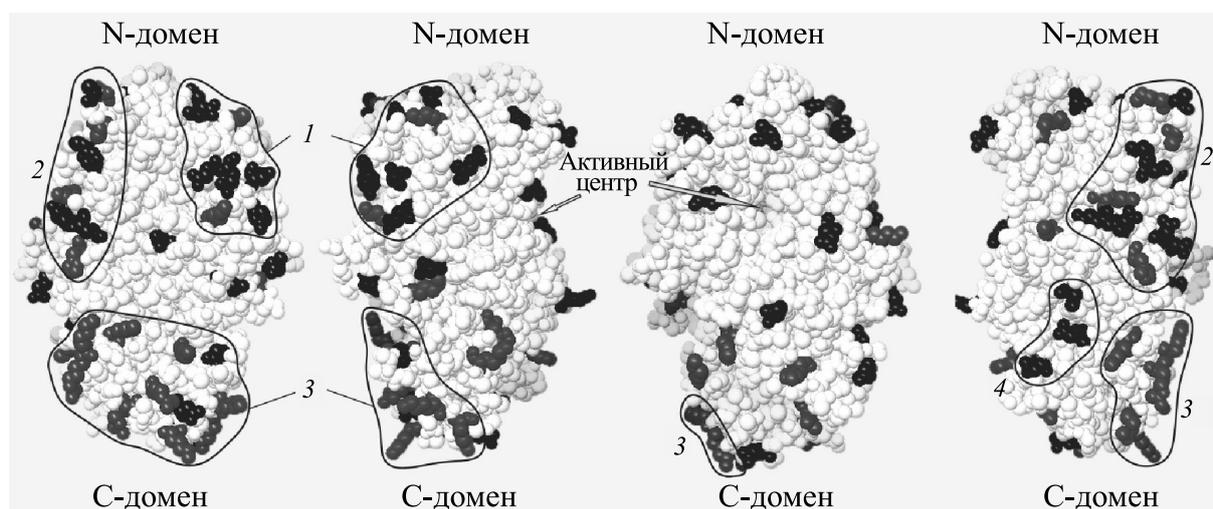
Поверхность молекул экзоинулиназы (1Y4W) характеризуется наличием четырех участков локального скопления заряженных аминокислотных остатков, два из которых расположены в области N-концевого домена и два – в области C-концевого домена (рис. 2). Наиболее крупный участок занимает значительную площадь C-концевого домена. В его состав входят Lys381, Arg382, Arg387, Lys390, Lys407, Lys415, Lys417, Asp473, Lys479, Asp 254, Arg526, Lys531. На данном участке поверхности фермента в значительной степени преобладают положительно заряженные аминокислотные остатки, в то время как в области N-концевого домена, в том числе активного центра, преобладают отрицательно заряженные аминокислоты, что указывает на высокую вероятность экранирования субстрата от каталитически активных аминокислотных остатков при иммобили-

**Таблица 2.** Перечень заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхностях молекул эндо- и экзоинулиназы

Эндоинулиназа (3SC7)			Экзоинулиназа (1Y4W)		
Положительно заряженные аминокислотные остатки	Отрицательно заряженные аминокислотные остатки	Гидрофобные аминокислотные остатки	Положительно заряженные аминокислотные остатки	Отрицательно заряженные аминокислотные остатки	Гидрофобные аминокислотные остатки
His82 His85 Lys86 Lys151 Arg183 Lys218 Lys277 Lys344 Lys345 Arg386 Lys410 Lys419 Lys450	Asp37 Glu433 Asp92 Glu452 Glu93 Glu453 Asp115 Asp454 Asp144 Glu497 Asp228 Glu516 Glu239 Glu243 Glu246 Glu247 Glu258 Asp275 Asp282 Asp285 Asp361 Asp399 Asp424	Tyr39 Ile168 Ile369 Gly51 Gly170 Pro377 Pro62 Leu172 Gly378 Val66 Phe181 Tyr397 Trp67 Gly186 Gly311 Pro87 Gly196 Pro327 Ala91 Ala206 Gly347 Gly95 Trp213 Leu367 Pro107 Gly224 Ala400 Gly112 Pro241 Gly401 Ala117 Gly244 Ala412 Val143 Gly259 Ile437 Ala147 Pro261 Pro441 Gly154 Pro283 Val446 Pro156 Ala286 Gly455 Ala164 Pro307 Gly500 Pro165 Ala308 Val504	Lys36 His452 His80 His467 Lys84 Lys479 Arg91 Arg514 Lys118 Arg526 Lys121 Lys531 Lys225 Lys247 Lys364 Lys381 Arg382 Arg387 Lys390 Lys407 Lys415 Lys417 Lys443	Asp23 Glu229 Glu64 Asp251 Glu76 Glu283 Glu82 Asp285 Glu83 Asp294 Asp96 Asp325 Asp119 Glu394 Glu146 Glu404 Asp158 Glu460 Asp159 Asp473 Asp167 Asp509 Glu181 Asp524 Asp196 Glu197 Glu209 Asp219 Asp223	Phe20 Leu161 Leu323 Pro25 Ala168 Pro342 Tyr47 Pro179 Tyr344 Trp65 Ala182 Gly362 Pro85 Leu226 Ile384 Val86 Pro232 Ala429 Leu89 Tyr233 Ala442 Phe93 Gly237 Val465 Gly94 Gly253 Pro469 Val110 Pro266 Val477 Gly115 Pro270 Gly494 Gly120 Gly271 Gly519 Val134 Val273 Ala533 Ala135 Ala293 Trp536 Pro139 Pro298 Gly141 Gly299 Leu157 Gly320



**Рис. 1.** Локальные скопления (1–3) заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекул эндоинулиназы (3SC7) (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно). Слева направо представлены развернутые на 90° вокруг вертикальной оси изображения модели фермента.



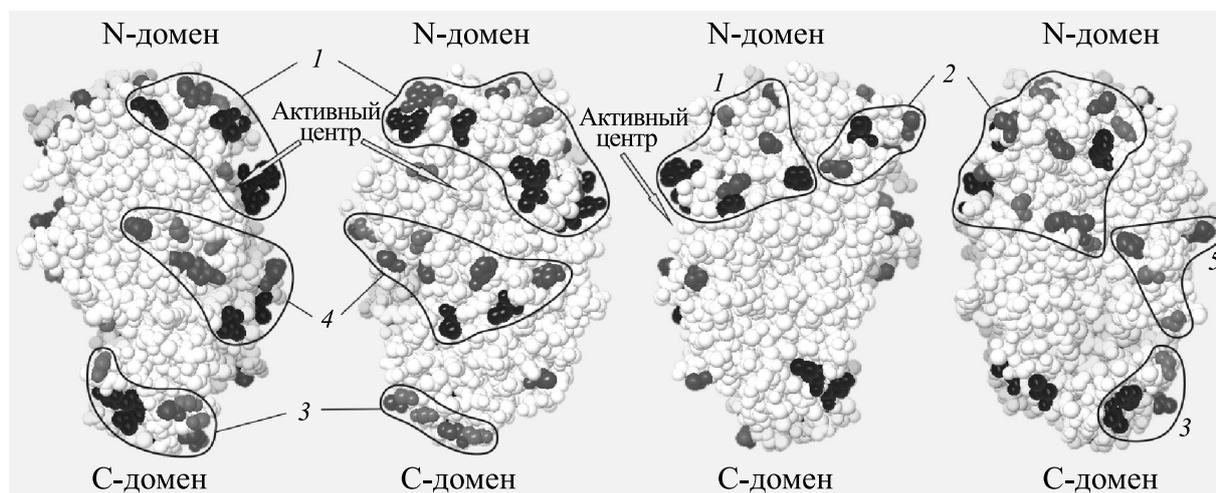
**Рис. 2.** Локальные скопления (1–3) заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекул экзоинулиназы (1Y4W) (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно). Слева направо представлены развернутые на 90° вокруг вертикальной оси изображения модели фермента.

лизации инулиназы на положительно заряженных носителях.

В табл. 3 представлены значения расстояний от активного центра фермента до потенциальных сайтов связывания эндо- и экзоинулиназы с заряженными носителями. Эти параметры необходимо учитывать при подборе условий иммобилизации, так как близость сайта связывания с носителем к активному центру фермента

может привести к существенному снижению каталитической активности препарата.

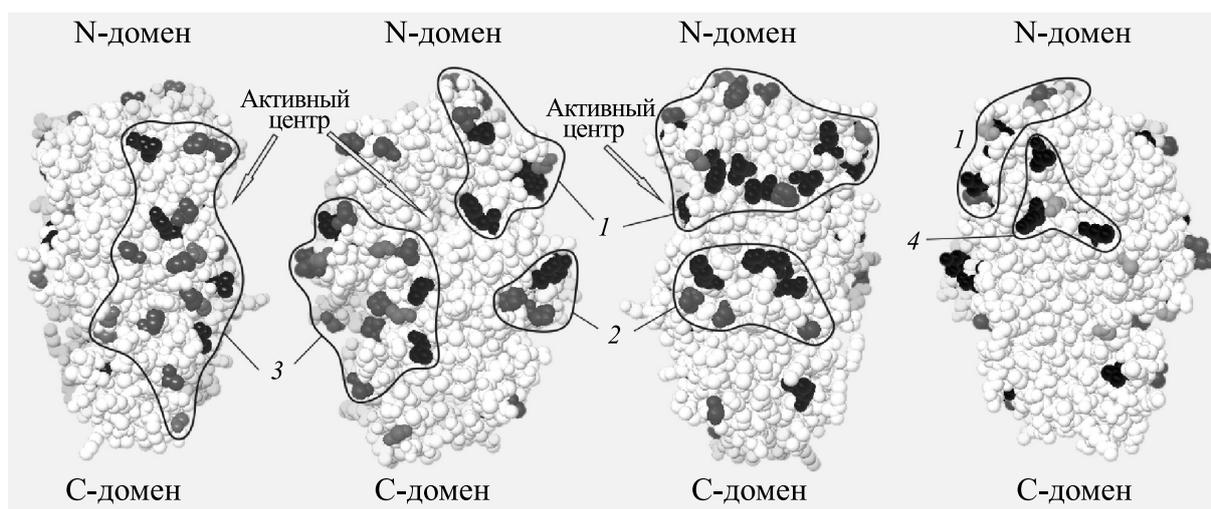
Большая часть гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул эндоинулиназы (3SC7) локализована в области N-концевого домена, формируя два участка локального скопления, расположенных полностью на поверхности указанного домена (рис. 3). В области C-концевого домена расположен один участок локального



**Рис. 3.** Локальные скопления (1–5) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул эндоинулиназы (3SC7) (цветами черный → светло-серый выделены гидрофобные аминокислотные остатки в порядке уменьшения степени гидрофобности). Слева направо представлены развернутые на 90° вокруг вертикальной оси изображения модели фермента.

**Таблица 3.** Расстояния от активного центра инулиназы до потенциальных сайтов связывания с заряженными носителями

Эндоинулиназа (3SC7)				Экзоинулиназа (1Y4W)					
Расстояния от активного центра инулиназы до сайтов связывания с носителями, Å									
Номер скопления	Отрицательно заряженные носители		Положительно заряженные носители		Номер скопления	Отрицательно заряженные носители		Положительно заряженные носители	
1	Arg183	22,54	Glu239	16,60	1	Lys225	18,89	Asp196	22,09
	Lys277	17,63	Glu243	24,19		Lys247	16,29	Glu197	22,17
	Lys344	22,22	Glu246	27,49				Asp219	23,38
	Lys345	25,33	Glu247	23,65				Glu229	13,78
			Asp275	20,08				Asp251	24,96
								Glu283	17,59
								Asp285	19,89
								Asp294	19,57
2	Lys410	28,5	Asp399	39,53	2	His80	17,13	Glu76	18,17
	Lys419	27,9	Asp424	29,70		Lys84	13,54	Glu82	14,33
	Lys450	23,2	Glu433	26,69		Lys118	26,46	Glu83	13,04
			Glu452	28,06		Lys121	24,69	Asp119	30,49
			Glu453	31,55				Asp158	19,29
			Asp454	32,32				Asp159	17,03
			Glu497	35,38					
3	His82	17,22	Asp37	12,89	3	Lys381	30,65	Asp473	31,12
	His85	13,15	Asp92	13,85		Arg382	33,82	Asp524	38,76
	Lys86	13,68	Glu93	16,66		Arg387	38,24		
	Lys151	15,97	Glu516	23,63		Lys390	44,24		
						Lys407	25,02		
						Lys415	37,62		
						Lys417	40,53		
						Lys479	27,62		
						Arg526	34,55		
						Lys531	27,26		
Вне скоплений	Lys218	11,82	Asp115	28,11	4	–		Asp23	22,21
	Arg386	30,53	Asp144	20,26				Glu40	423,21
			Asp228	11,34				Asp509	29,98
			Glu258	7,56					
			Asp282	16,74	Вне скоплений	Lys36	12,66	Glu64	10,93
			Asp285	16,86		Arg91	16,29	Asp96	21,68
			Asp361	23,60		Lys364	19,82	Glu146	15,76
						Lys443	27,68	Asp167	21,02
						His452	26,9	Glu181	16,64
						His467	20,04	Glu20	97,57
						Arg514	33,5	Asp223	21,77
								Asp325	18,27
								Glu394	43,16
								Glu460	20,41



**Рис. 4.** Локальные скопления (1–4) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул экзоинулиназы (1Y4W) (цветами черный → светло-серый выделены гидрофобные аминокислотные остатки в порядке уменьшения степени гидрофобности). Слева направо представлены развернутые на 90° вокруг вертикальной оси изображения модели фермента.

скопления гидрофобных аминокислотных остатков. На поверхности молекул эндоинулиназы также обнаруживаются два участка, расположенных частично в области N-домена и частично в области C-домена.

Поверхность N-концевого домена экзоинулиназы (1Y4W), также как и в случае с эндоинулиназой, характеризуется наличием двух участков локального скопления (рис. 4). Кроме них, на поверхности молекул экзоинулиназы присутствуют еще два участка, расположенных частично в области N-, частично в области C-доменов.

В табл. 4 представлены значения расстояний от активного центра фермента до сайтов связывания эндо- и экзоинулиназы с гидрофобными носителями.

Стоит отметить, что некоторые участки на поверхности эндо- и экзоинулиназы расположены в непосредственной близости к активному центру фермента, создавая возможность экранирования субстрата при связывании фермента с гидрофобным носителем.

### ВЫВОДЫ

Для иммобилизации эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (3SC7) наиболее перспективны положительно заряженные носители, которые, вероятно, будут взаимодействовать с одним из участков на поверхности молекул фермента, удаленных от активного центра и содержащих: 1) Glu239, Glu243, Glu246, Glu247, Asp275; 2) Asp399, Asp424, Glu433, Glu452, Glu453,

Asp454, Glu497; 3) Asp37, Asp92, Glu93, Glu516. В качестве таких носителей могут выступать анионообменное волокно ВИОН АН-1, смолы ЭДЭ-10П, PUROLITE, АВ-17-2П и АВ-16-ГС, функциональные группы которых могут связываться с отрицательно заряженными остатками аспарагиновой и глутаминовой аминокислот инулиназы [20].

Для иммобилизации экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (1Y4W) наиболее перспективны отрицательно заряженные носители, поскольку сайты связывания с ними – 1) Lys225, Lys247; 2) His80, Lys84, Lys118, Lys121; 3) Lys381, Arg382, Arg387, Lys390, Lys407, Lys415, Lys417, Lys479, Arg526, Lys531 – локализованы на удаленных от активного центра участках поверхности молекул фермента. Такими носителями могут быть ИМАС-НР, КУ-2 и ВИОН КН-1, отрицательно заряженные группы которых (сульфогруппы и карбоксильные группы соответственно), вероятно, будут взаимодействовать с заряженными остатками лизина, аргинина и гистидина [20].

Гидрофобные носители наименее перспективны как для эндо-, так и для экзоинулиназы, поскольку на поверхности молекул ферментов для них присутствуют сайты связывания Tyr39, Pro62, Val66, Leu172, Gly196, Gly259 и Tyr47, Trp65, Pro85, Val86, Leu89, Leu161, Pro232, Gly237, Pro266, Pro270, Val293, Pro298, Gly299, Gly320 соответственно, расположенные в непосредствен-

**Таблица 4.** Расстояния от активного центра инулиназы до потенциальных сайтов связывания с гидрофобными носителями

Эндоинулиназа (3SC7)			Экзоинулиназа (1Y4W)		
Расстояния от активного центра инулиназы до сайтов связывания с носителями, Å					
Номер скопления	Гидрофобные носители		Номер скопления	Гидрофобные носители	
1	Tyr39 11,05 Pro62 11,77 Val66 12,3 Trp67 14,23 Pro87 13,24 Ala91 13,62 Gly95 16,63 Gly154 22,25	Pro156 18,09 Ala164 17,44 Pro165 17,86 Ile168 14,32 Gly170 15,37 Leu17 28,98 Trp213 15,41	1	Trp65 9,49 Pro85 11,34 Val86 10,04 Leu89 10,56 Phe93 14,71 Gly94 18,3 Gly115 20,99 Gly120 22,41	Val134 19,14 Ala135 22,05 Pro139 20,93 Gly141 24,55 Leu157 15,78 Leu161 12,18 Ala168 20,93
2	Gly51 20,99 Pro107 23,89 Gly112 26,66 Ala117 29,38 Val143 21,44 Ala147 17,07	Phe181 18,45 Gly186 24,51 Ala206 23,4 Pro307 21,47 Ala308 24,52 Gly311 21,86	2	Phe20 20,18 Pro25 22,88 Pro342 22,04	Tyr344 21,03 Ala533 23,02 Trp536 14,75
3	Pro377 42,89 Gly378 42,96 Tyr397 37,38 Ala400 40,57	Pro377 42,89 Gly378 42,96 Tyr397 37,38 Ala400 40,57	3	Pro23 21,33 Gly237 7,7 Pro266 11,13 Pro270 12,7 Gly271 16,75 Val273 17,57 Ala29 38,8	Pro298 7,9 Gly299 5,42 Gly362 19,64 Ala442 27,1 Val465 22,76 Pro469 17,29 Gly494 25,67
4	Gly224 16,33 Gly259 10,98 Pro261 13,95 Pro283 17,82	Pro327 16,91 Ile437 22,25 Pro441 19,14 Val446 22,4	4	Tyr47 9,22 Val110 17,25 Pro179 15,99 Ala182 19,25	Gly320 11,66 Leu323 19,19 Ile384 33,02 Ala429 38,12
Вне скоплений	Gly196 6,61 Pro241 21,02 Gly244 27,18 Ala286 16,58	Ile369 35,02 Gly347 29,03 Leu367 30,98 Ala412 33,47	Вне скоплений	Leu226 14,63 Gly253 26,4	Val477 30,38 Gly519 38,72

ной близости к активному центру макромолекул тестируемых ферментов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. K. Gupta, M. Kaur, N. Kaur, and R. Singh, J. Chem. Technol. Biotechnol. **5**, 293 (1992).
2. P. Singh and P. K. Gill, Food Technol. Biotechnol. **44** (2), 151 (2006).
3. G. L. S. Pawan, In *Molecular Structure and Function of Food Carbohydrates*, Ed. by G. G. Birch and L. F. Green (Applied Science Publishers, London, UK), pp. 65–80.
4. M. B. Roberfroid and N. M. Delzenne, Annu. Rev. Nutr. **18**, 117 (1998).
5. E. J. Vandamme and D. G. Derycke, Adv. Appl. Microbiol. **29**, 139 (1983).
6. S. E. Fleming and J. W. D. Groot Wassink, Crv. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **12**, 1 (1979).
7. G. W. Elmer, J. Am. Med. Assoc. **275**, 870 (1986).
8. D. M. Kim and H. S. Kim, Biotechnol. Bioeng. **39**, 336 (1992).
9. K. Ohta, S. Hamada, and T. Nakamura, Appl. Environ. Microbiol. **59**, 729 (1993).
10. H. Treichel, D. de Oliveira, L. Lerin, et al., Global J. Biochem. **3**, 7 (2011).
11. M. A. Ganaie, A. Lateef, and U. S. Gupta, Appl. Biochem. Biotechnol. **172**, 2143 (2014).
12. S. R. Hughes, N. Qureshi, J. C. López-Núñez, et al., World J. Microbiol. Biotechnol. **33**, 78 (2017).

13. N. Kango and S. C. Jain, *Food Biotechnol.* **25**, 165 (2011).
14. J. Pouyez, A. Mayard, A.-M. Vandamme, et al., *Biochimie* **94** (11), 2423 (2012).
15. A. Basso, P. Spizzo, V. Ferrario, et al., *Biotechnol. Prog.* **26** (2), 397 (2010).
16. C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, et al., *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451 (2007).
17. P. V. Iyer and L. Ananthanarayan, *Process Biochem.* **43**, 1019 (2008).
18. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и А. С. Таха, *Сорбционные и хроматографические процессы* **7** (5), 804 (2007).
19. R. A. Nagem, A. L. Rojas, A. M. Golubev, et al., *J. Mol. Biol.* **344** (2), 471 (2004).
20. M. G. Holyavka, T. A. Kovaleva, S. I. Karpov, et al., *Biophysics* **59** (2), 222 (2014).

***In silico* Searching for Possible Binding Sites for Endonulinase from *Aspergillus ficuum* and Exoinulinase from *Aspergillus awamori* Molecules with Charged and Hydrophobic Carriers**

**F.A. Sakibaev, M.G. Holyavka, S.M. Makin, and V.G. Artyukhov**

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

We investigated the composition and location of charged and hydrophobic amino acid residues of endonulinase (3SC7) and exoinulinase (1X4W) molecules. The percentage ratio of different types of amino acids on the surface of enzyme molecules was determined. It has been established that the charged and hydrophobic amino acid residues are distributed unevenly over the surface of the molecules, forming sites of local aggregation. It has been shown that the most promising carriers for immobilization of endonulinases are positively charged carriers, which are likely to interact with one of the following sites on the surface of enzyme molecules that are remote from the active center and contain: Glu239, Glu243, Glu246, Glu247, and Asp275 (site 1); Asp399, Asp424, Glu433, Glu452, Glu453, Asp454, and Glu497 (site 2); Asp37, Asp92, Glu93, and Glu516 (site 3). Negatively charged carriers are most promising for exoinulinase, whereas the binding sites for these carriers contain Lys225 and Lys247 (site 1); His80, Lys84, Lys118, and Lys121 (site 2); Lys381, Arg382, Arg 387, Lys390, Lys407, Lys415, Lys417, Lys479, Arg526, and Lys531 (site 3) and are localized on the surface of the enzyme molecules remote from the active center. Hydrophobic carriers are less promising, because on the surface of the enzymes in the area of an active center there are amino acid residues to which polymers such as Tyr 39, Pro 62, Val66, Leu172, Gly196, Gly259 in the case of endonulinase; and Tyr 47, Trp65, Pro85, Val86, Leu89, Leu161, Pro232, Gly237, Pro266, Pro270, Val293, Pro298, Gly299, Gly 320 in the case of exoinulinase can bind.

*Keywords: endonulinase, exoinulinase, immobilization, binding sites, charged carriers, hydrophobic carriers*