

УДК: 577.325

Компьютерный анализ первичных структур инулиназ из различных продуцентов

М. Г. Холявка^a, Т. А. Ковалева^b, Е. А. Хрупина^c, В. Г. Артюхов^d

Воронежский государственный университет
Россия, 394006, Воронеж, Университетская площадь, д. 1

E-mail: ^aholyavka@rambler.ru, ^btamara_kovaleva@inbox.ru, ^clenavgu@mail.ru, ^davg@main.vsu.ru

Получено 22 февраля 2011 г.

Установлено, что основное количество гомологичных звеньев у инулиназ из различных продуцентов представлено остатками Gln, Asn и Glu. Карбоксильные группы боковых радикалов Asp и Glu, входящих в состав активных центров инулиназ, могут играть роль контактных групп для молекул субстрата, а также осуществлять кислотно-основной катализ. Сопоставление первичных структур инулиназ показало, что частота замены остатков на протяжении полипептидных цепей отличается высокой вариабельностью. Построено филогенетическое дерево инулиназ из различных источников. Выявлено, что высокая степень гомологии характерна для ферментов из *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus ficuum*. Показано, что относительно небольшим родством обладают эндо- и экзоинулиназы.

Ключевые слова: инулиназа, первичная структура, компьютерный анализ

The computer analysis of primary structures for inulinases from various producers

M. G. Holyavka, T. A. Kovaleva, E. A. Hrupina, V. G. Artyukhov

The Voronezh state university, 1 University sq., Voronezh, 394006, Russia

Abstract. – It is shown that the basic amount of homologous parts at inulinases from various species is presented by Gln, Asn and Glu residues. Carboxyl groups of Asp and Glu side chains (a part of active center of inulinase) can play the role of contact groups for substrate molecules and also carry out acid-base catalysis. Comparison of primary structures of inulinases has shown that frequency of residue substitution is very variable along the polypeptide chain. The phylogenetic tree of inulinases from various sources is constructed. It is revealed that high homology degree is characteristic for enzymes from *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus ficuum*. Rather small relation degree is shown for endo- and exo-inulinases.

Keywords: inulinase, primary structure, computer analysis

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 85–92 (Russian).

Инулиназа (КФ 3.2.1.7) расщепляет инулин и другие фруктозосодержащие полимеры, играя важную роль в превращении резервных полифруктозидов типа инулина или левана в мобильную 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.

Целью работы был компьютерный анализ аминокислотных последовательностей инулиназ из различных продуцентов, который создает предпосылки к составлению прогнозов относительно молекулярных особенностей фермента, механизма катализа, функциональных групп активного центра. Детальный анализ белковых макромолекул на всех уровнях их организации в сочетании с классическими подходами биохимии и биофизики позволяет определить структурно-функциональные свойства и молекулярные механизмы действия инулиназ. На сегодняшний день возможность предсказать свойства белка, исходя из аминокислотной последовательности, является одной из главнейших целей современной интегративной биологии.

Сведения о первичных структурах инулиназ получали в National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>), выравнивание аминокислотных последовательностей проводили при использовании программного пакета BioEdit.

Сравнение первичных структур инулиназ позволило выявить аминокислотные остатки, играющие важнейшую роль в функционировании данных ферментов. Из табл. 1 видно, что основное количество гомологичных звеньев представлено остатками глутамина, аспарагина и глутаминовой кислоты. Данные аминокислоты являются полярными из-за большого дипольного момента и ответственны за активное взаимодействие белковой макромолекулы с молекулами воды, обеспечивая хорошую растворимость фермента. Карбоксильные группы боковых радикалов аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, входящих в состав активных центров инулиназ [Корнеева, 2001], могут играть роль контактных групп для молекул субстрата, а также осуществлять кислотно-основной катализ, оказывая влияние на полярность расположенных по соседству с ними связей и групп фермент-субстратного комплекса или вызывая смещение электронной плотности путем образования водородных связей.

Согласно литературным данным, основные различия между аминокислотными последовательностями гомологичных ферментов, как правило, не затрагивают функционально значимых участков белковой глобулы, а имеют отношение к поверхности молекул, отдаленной от активного центра [Molecular cloning and sequence analysis..., 2000]. Поэтому в тех случаях, когда полная информация о пространственной организации исследуемого белка отсутствует, изучение структурной вариабельности может значительно расширить представления о локализации того или иного аминокислотного остатка в глобуле.

Сопоставление первичных структур инулиназ показало, что частота замен остатков на протяжении полипептидных цепей отличается высокой вариабельностью. Более эволюционно значимыми событиями являются вставки и пропуски отдельных остатков или целых групп аминокислот. Наличие подобных изменений затрудняет сопоставление первичных структур белковых молекул.

На основе данных литературы можно заключить, что остатки, находящиеся во внутренней части глобулы, обычно мало подвержены изменениям, и все различия между гомологичными белками (замены, делеции или вставки аминокислот в цепи) касаются поверхности молекул [Шерман, Андрианов, Ахрем, 1989]. В тех случаях, когда пространственная организация белка еще не известна, подобная структурная вариабельность может дать относительно достоверную информацию о локализации каждого конкретного остатка в макромолекуле. Исследование аминокислотных последовательностей белков позволяет определить наличие связей между различными частями цепи, стабилизирующими третичную структуру. Для большинства глобулярных протеинов это, прежде всего, дисульфидные мостики, формирующиеся при окислении пар цистеинов. Инулиназы в основном содержат 1–2 [Molecular cloning and sequence analysis..., 2000; Cloning and analysis of the inulinase gene..., 2003; Purification, characterization, gene cloning

and preliminary X-ray data..., 2002; Expression of an α -galactosidase gene..., 1993], реже 3 остатка Cys [Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes..., 1998]. Этот факт может свидетельствовать о преимуществе поддерживающих четвертичную структуру не дисульфидных связей, а гидрофобных взаимодействий. Исключение составляют инулиназы из *Rhodopirellula baltica*, *Cryptococcus aureus* [Purification and characterization of extracellular inulinase..., 2008], *Prevotella tanneriae* и *Bacillus polymyxa*, имеющие в своем составе 13, 11, 8 и 6 остатков цистеина соответственно. Интересно, что 1-фруктан-экзогидролаза I из *Cichorium intybus* также содержит сравнительно высокое число Cys [Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolyase I..., 2000].

Роль SH-групп в проявлении биокаталитической способности инулиназ точно не установлена. В некоторых случаях SH-группы могут входить в состав «контактной площадки апоферментов» или участвовать в стабилизации каталитически активной конформации белковой макромолекулы фермента [Корнеева, 2001; Ковалева, 1998]. Показано, что *n*-хлормеркурибензоат инактивирует инулиназу *Bacillus polymyxa* 772, что свидетельствует об участии в акте катализа реакции гидролиза инулина сульфгидрильной группы цистеина [Идентификация каталитически активных групп инулиназы..., 2003].

Методом рентгеноструктурного анализа установлено [Корнеева, 2001], что в активный центр инулиназы *Aspergillus awamori* входят Glu 241 и Asp 41. Автором предложен механизм разрыва фруктозидной связи в молекуле инулина, исходя из принципа ориентированной сопряженной атаки нуклеофильных и электрофильных групп, находящихся в активном центре фермента. При этом донором протонов выступает Glu 241, нуклеофилом (акцептором протонов) является Asp 41, а к субстратсвязывающим группам относятся Glu 241, Asp 189, Arg 188, Ser 103, Trp 65. В ходе сравнения аминокислотных последовательностей инулиназ различного происхождения выявлено, что данные аминокислотные остатки представляют собой элементы участков консервативных последовательностей в структуре гликозидаз. Вероятно, в состав активного центра инулиназы *Kluyveromyces marxianus* также входят остатки Asp и Glu (Asp 51 и Glu 285). До конца не ясна роль Cys 239, который также является константным. Не исключено участие данного аминокислотного остатка в акте катализа реакции расщепления инулина энзимом. К субстратсвязывающим группам могут относиться Asn 53, Gln 71, Ser 116, Trp 335.

В табл. 2 представлены максимальные и минимальные значения ряда структурных характеристик инулиназ. Общее количество аминокислотных остатков в составе инулиназ варьирует в широких пределах – от 485 у ферментов из *Paenibacillus polymyxa*, *Arthrobacter aureus* до 1074 у энзима из *Rhodopirellula baltica*. Содержание гидрофильных и особенно гидрофобных остатков отличается большим постоянством: 31,53–40,88% и 51,72–59,11% соответственно. Ядро инулиназ формируют от 21,79 до 36,97% аминокислот в зависимости от продуцента, а в состав упорядоченных структур (α -спирали и β -складчатости) входит от 61,25 (у энзима из *Penicillium species*) до 88,95% (у фермента из *Aspergillus niger*) остатков.

На рисунке изображено филогенетическое дерево инулиназ. Высокая степень гомологии показана для ферментов из *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus ficuum*. Интересно, что инулиназа из *Aspergillus fumigatus* стоит эволюционно гораздо дальше. Относительно небольшим родством обладают даже выделенные из одного и того же продуцента эндо- и экзоинулиназы. Самые существенные отличия обнаружены между инулиназами из *Aspergillus fumigatus* и *Arthrobacter species* S37.

Логично предположить, что оптимальное значение температуры для функционирования инулиназ зависит от отношения аминокислотных остатков, расположенных в упорядоченных структурах, к тем, что образуют петли (табл. 3), однако подобной корреляции мы не обнаружили.

Примечательно, что нет прямой связи между количеством аминокислотных остатков, образующих отдельно α -спирали и β -слои, и значением температурного оптимума инулиназы. Число остатков в α -спиралях коррелирует только с видом продуцента, в частности, у энзимов из *Pichia guilliermondii*, *Cichorium intybus* и *Kluyveromyces marxianus* оно составляет 36,4–41,2%, у ферментов из *Arthrobacter species* – 44,8–48,8%, внутри рода *Aspergillus* варьирует в диапазоне 39,3–42,3%, а внутри рода *Bacillus* находится в пределах 47–48%.

Практически у всех инулиназ отношение аминокислотных остатков, образующих β -складчатости, к остаткам, расположенным в петлях, имеет значение, близкое к 1. Однако у всех ферментов, выделенных из *Kluyveromyces marxianus*, оно несколько ниже, чем у ферментов из рода *Aspergillus*, что отчасти объясняет более высокий температурный оптимум функционирования инулиназ плесневого происхождения. Интересно, что отношение более 1,1 характерно для белков из *Pseudomonas mucidolens*, *Pichia guilliermondii* и *Geobacillus stearothermophilus*, для которых оптимальными условиями являются pH 6,0 и температура 55, 60 и 60° С соответственно. Самое высокое значение (1,21) наблюдается у инулиназ из *Bacillus polymyxa* и *Paenibacillus polymyxa*, что может быть обусловлено их pH оптимумом 7,0, резко отличающимся от ферментов из других продуцентов, либо это является просто отличительной особенностью ферментов из данного вида бактерий.

Мы также не наблюдали прямой корреляции между температурными оптимумами инулиназ и отношением гидрофобных аминокислотных остатков к гидрофильным. Существует лишь тенденция к тому, что данный показатель выше у инулиназ бактериального происхождения, немного ниже – у плесневых ферментов и самый низкий – у дрожжевых ферментов.

Таким образом, можно сделать вывод, что хотя исследование аминокислотных последовательностей инулиназ из различных продуцентов и является полезным на первых этапах изучения структурно-функциональных свойств ферментов, оно является недостаточным для составления достоверных прогнозов и должно быть подкреплено рядом работ биофизического и биохимического характера.

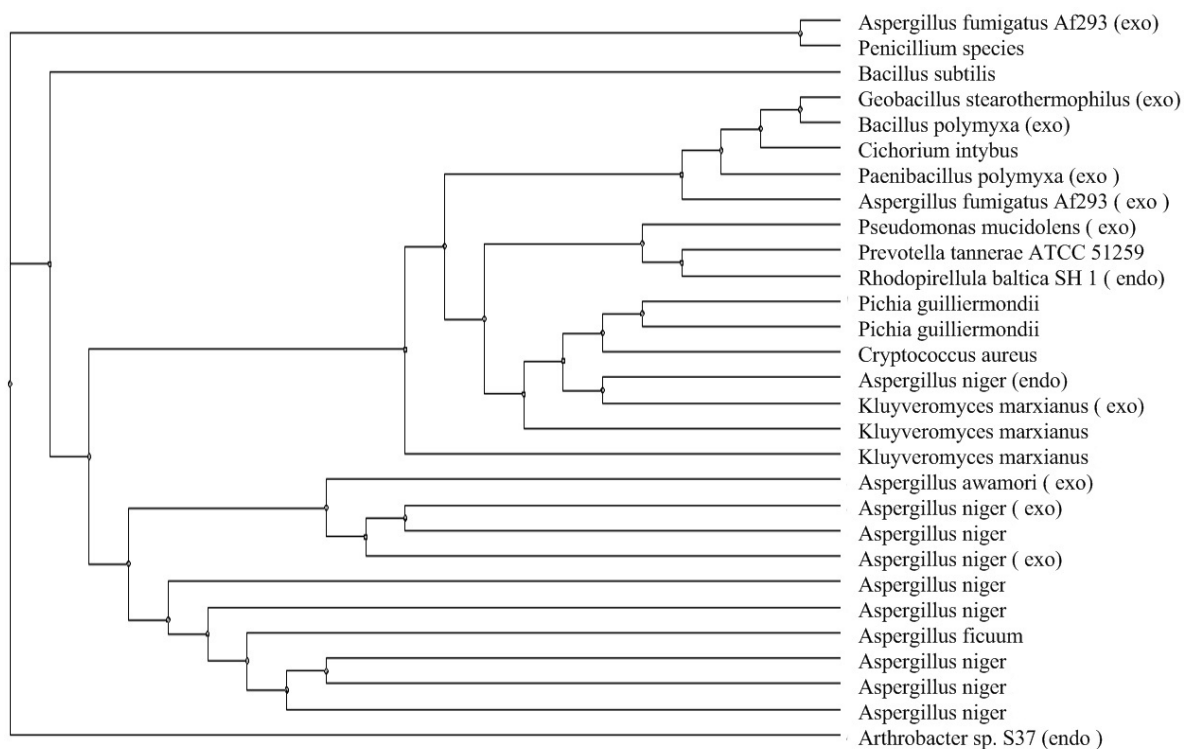


Рис. Филогенетическое дерево инулиназ из различных продуцентов

Таблица 1. Константные области полипептидных цепей инулиназ

Фрагмент полипептидной цепи	Позиция фрагмента	Наличие функционально важного остатка
NDPNG	23–28 ^{1,3} 24–29 ² 51–55 ⁴ 39–44 ^{5,6} 51–56 ⁸ 47–51 ⁷	N-41(Asn41)
YHLEFQH	36–43 ^{1,3}	–
WMNDPNGL	21–28 ² 20–27 ³ 38–45 ^{6,5} 37–46 ⁷ 50–57 ⁸	N-40(Asn40)
WGPMHWGHA VS	49–59 ^{1,3} 50–60 ²	–
QYNP	57–60 ^{5,6} 64–67 ⁷ 71–74 ⁸	Q-57(Gln57)
WGHA VSKD	54–61 ^{1,3} 86–93 ⁸	–
TEM-FSGSAV	99–108 ^{5,6} 102–113 ⁷	S-103(Ser103)
NFRDPFVFWHDES	186–199 ^{5,6}	R-188(Arg188)
FRDPKVFWNH	151–159 ^{1,3} 152–160 ² 181–189 ⁸	–
GVWECP	212–217 ¹ 211–216 ² 234–239 ^{5,6}	–
TQYFVG	239–244 ¹ 241–246 ² 240–245 ³ 278–283 ^{5,6} 284–289 ⁸	Q-241(Gln241)
GPENGT	290–296 ⁷ 289–294 ⁸	–
DYYA	307–310 ⁴ 312–315 ⁸	–
NWQY	335–338 ^{5,6,8} 500–503 ⁷	W-335(Trp335)

¹ – *Geobacillus stearothermophilus*² – *Pseudomonas mucidolens*³ – *Paenobacillus polymyxa*⁴ – *Bacillus subtilis*⁵ – *Aspergillus awamori*⁶ – *Aspergillus niger*⁷ – *Penicillium species TN-88*⁸ – *Kluyveromyces marxianus*

Таблица 2. Структурные характеристики инулиназ из различных продуцентов

Исследуемый показатель *	Максимальное значение	Минимальное значение
общее количество аминокислотных остатков	1074 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	485 (<i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Arthrobacter aureescens</i>)
гидрофобные, %	59,11 (<i>Arthrobacter</i> species S37)	51,72 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
гидрофильные, %	40,88 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	31,53 (<i>Arthrobacter</i> species S37)
алкильные, %	40,88 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	21,58 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
кислые, %	16,11 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	5,05 (<i>Paenibacillus polymyxa</i>)
основные, %	13,90 (<i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)	7,26 (<i>Penicillium</i> species)
поверхностные, %	41,78 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	31,53 (<i>Arthrobacter</i> species S37)
находятся в:		
ядре, %	36,97 (<i>Cichorium intibus</i>)	21,79 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)
α_N , %	22,35 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	14,71 (<i>Aspergillus niger</i>)
α , %	22,07 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	11,36 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
α_C , %	13,90 (<i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)	7,26 (<i>Penicillium</i> species)
до α_N , %	37,52 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	26,83 (<i>Cryptococcus aureus</i>)
за α_C , %	20,69 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	11,73 (<i>Talaromyces stripitatus</i> ATCC 10500)
β , %	41,86 (<i>Aspergillus niger</i>)	35,55 (<i>Arthrobacter aureescens</i>)
в петлях, %	41,28 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	33,02 (<i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)
образуют α - и β -структуры, %	88,95 (<i>Aspergillus niger</i>)	61,25 (<i>Penicillium</i> species)
образуют α -спирали, %	57,08 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	36,32 (<i>Penicillium</i> species)
не встречаются в:		
α_N , %	12,78 (<i>Bacillus polymyxa</i>)	5,23 (<i>Aspergillus niger</i>)
α , %	35,46 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	24,49 (<i>Aspergillus ficuum</i>)
α_C , %	22,35 (<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1)	14,71 (<i>Aspergillus niger</i>)
β , %	41,55 (<i>Prevotella tanneriae</i> ATCC 51259)	29,05 (<i>Aspergillus niger</i>)

* основные структурные свойства аминокислотных остатков изложены в работе [Финкельштейн, Птицын, 2002]

Таблица 3. Количество аминокислотных остатков инулина, расположенных в различных структурах

Продуцент	Отношение количества аминокислотных остатков			Остатки (%), входящие в состав	
	в α -спиралях и β -слоях / в петлях	в β -слоях / в петлях	гидрофобные / гидрофильные	α -спиралей	β -слоев
<i>Arthrobacter species</i>	2,06	1,05	1,87	46,06	38,92
<i>Arthrobacter aurescens</i>	1,93	1,04	1,72	44,80	40,00
<i>Arthrobacter aurescens</i>	1,84	0,89	1,49	48,83	35,55
<i>Cryptococcus aureus</i>	1,86	0,98	1,80	45,17	39,38
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	2,14	1,14	1,43	45,51	41,12
<i>Pichia guilliermondii</i>	1,95	1,11	1,36	39,88	41,05
<i>Pichia guilliermondii</i>	1,95	1,11	1,36	40,27	40,86
<i>Cichorium intybus</i>	1,90	1,10	1,35	41,20	41,73
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,71	1,00	1,36	37,41	40,83
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,73	1,02	1,37	37,30	41,44
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,70	1,00	1,38	36,40	41,28
<i>Aspergillus awamori</i>	2,01	1,11	1,66	41,34	40,78
<i>Aspergillus awamori</i>	1,93	1,07	1,61	39,58	40,15
<i>Aspergillus ficuum</i>	1,89	1,08	1,61	40,70	41,28
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,90	1,08	1,76	40,72	41,29
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,93	1,04	1,55	42,25	39,54
<i>Aspergillus niger</i>	1,87	1,08	1,61	40,70	41,28
<i>Aspergillus niger</i>	1,89	1,08	1,58	40,89	41,09
<i>Aspergillus niger</i>	1,93	1,08	1,65	39,48	40,22
<i>Aspergillus niger</i>	1,85	1,05	1,51	40,69	40,69
<i>Aspergillus niger</i>	2,33	1,10	1,64	39,92	41,86
<i>Aspergillus niger</i>	1,93	1,08	1,66	39,29	40,22
<i>Bacillus polymyxa</i>	2,34	1,21	1,47	47,84	41,03
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	2,35	1,21	1,47	48,04	41,03
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1,99	1,11	1,24	41,38	41,38
<i>Bacillus subtilis</i>	1,88	0,96	1,69	47,06	38,34

Список литературы

- Akimoto H., Kiyota N., Kushima T., Nakamura T., Ohta K. Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000 – Vol. 64, № 11. – P. 2328–2335.
- Arand M., Golubev A. M., Neto J. R., Polikarpov I., Wattiez R., Korneeva O. S., Eneyskaya E. V., Kulminskaya A. A., Shabalin K. A., Shishliannikov S. M., Chepurnaya O. V., Neustroev K. N. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori* // Biochem. J. – 2002. – Vol. 362. – P. 131–135.
- Bergkamp R. J., Bootsman T. C., Toschka H. Y., Mooren A. T., Kox L., Verbakel J. M., Geerse R. H., Planta R. J. Expression of an α -galactosidase gene under control of homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1993. – Vol. 40, № 2. – P. 309–317.
- Ohta K., Akimoto H., Matsuda S., Toshimitsu D., Nakamura T. Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1998 – Vol. 62, № 9. – P. 1731–1738.
- Sheng J., Chi Z., Gong F., Li J. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2008. – Vol. 144, № 2. – P. 111–121.
- Van den Ende W., Michiels A., De Roover J., Verhaert P., Van Laere A. Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme // The Plant Journal. – 2000. – Vol. 24, № 4. – P. 447–456.
- Wen T. Q., Liu F., Huo K. K., Li Y. Y. Cloning and analysis of the inulinase gene from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS4857 // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2003. – Vol. 19. – P. 423–426.
- Жеребцов Н. А., Абрамова И. Н., Шеламова С. А., Попова Т. Н. Идентификация каталитически активных групп инулиназы *Vacillus polymyxa* 722 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 619–624.
- Ковалева Т. А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобилизованными амилазами: автореферат дис. д-ра биол. наук. – Воронеж, 1998. – 421 с.
- Корнеева О. С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. – Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. – 184 с.
- Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. – М.: Изд-во Книжный дом «Университет», 2002. – 376 с.
- Шерман С. А., Андрианов А. М., Ахрем А. А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. – Минск: Изд-во Наука и техника, 1989. – 240 с.