

АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИНУЛИНАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, Т. Б. Образцова

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 01.10.2009 г.

Аннотация. В ходе сравнения аминокислотных последовательностей инулиназ различного происхождения выявлено, что остатки глутамина, аспарагина, аргинина и триптофана представляют собой элементы участков консервативных последовательностей. Показана высокая степень гомологии для инулиназ *Aspergillus awamori* и *Aspergillus niger*, самые существенные отличия обнаружены между ферментами из *Geobacillus stearothermophilus* и *Penicillium species TN-88*.

Ключевые слова: инулиназа, первичная структура, секвенирование.

Abstract. During the comparison of various inulinase amino acid sequences it is revealed, that the rests of glutamin, asparagine, arginine and tryptophan represent elements of sites of conservative sequences. The high degree of homology for inulinase *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger* is shown, the most essential differences are found out between enzymes from *Geobacillus stearothermophilus* and *Penicillium species TN-88*.

Keywords: inulinase, primary structure, sequencing.

ВВЕДЕНИЕ

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) широко распространена среди высших растений и микроорганизмов, действует на гликозидные связи, расщепляя инулин и другие фруктозосодержащие полимеры. Фермент может использоваться для получения фруктозы из инулинсодержащего растительного сырья.

В настоящее время в исследовании биокатализаторов достаточно актуальны проблемы расшифровки их первичной структуры, объяснения механизма катализа, идентификации функциональных групп активных центров. При изучении молекулярных механизмов действия гидролаз, как правило, не достаточно исследования структурно-функциональных свойств биохимическими методами, необходимо осуществление детального анализа белковых макромолекул на всех уровнях их организации. На начальном этапе изучения структурных особенностей того или иного фермента необходимую информацию может представить секвенирование его молекулы. С этой целью нами был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей инулиназ из разных продуцентов.

Сведения о первичных структурах инулиназ получали в INTERNET National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Entrez), выравнивание аминокислотных последовательностей проводили при использовании программного пакета Alibee-Multiple Aligment (http://www.genebee.msu.ru/malign_reduced.html).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Молекула инулиназы *Kluyveromyces marxianus* состоит из 556 аминокислотных остатков. Фрагмент из 24 аминокислотных остатков, присоединенный к N-концу цепи, представляет собой сигнальный пептид, который включает преимущественно гидрофобные аминокислоты и характерен для белков-предшественников [1]. Молекула инулиназы из *Aspergillus awamori* представлена 537 аминокислотными остатками, предшественник данного фермента начинается с участка, содержащего 19 аминокислот главным образом гидрофобной и ароматической природы [2]. Проведенный нами сравнительный анализ первичных структур инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori* позволил определить, что доля идентичных остатков составила 40,4%. Наиболее часто на протяжении рассматриваемых полипептидных цепей наблюдаются корреляции одиночных идентичных остатков, встречаемость дуплетов и триплетов гораздо ниже (рис. 1). Сравнение первичных структур инулиназ позволило выявить остатки, играющие важнейшую роль в функционировании данных ферментов.

Из табл. 1 видно, что основное количество гомологичных звеньев представлено остатками глу-

Анализ аминокислотных последовательностей инулиназ из различных источников

Asp. awamori (1) MaPLSKALsVFMLMGITYA-FNY-----DQPY---RGQYHFSPQKNWMDPNGLL
 K. marxianus (1) M-KLAYSL-LLPLAGVSASvINYkrdgdskaItNTTFslnRPSVHFTPSHGWMNDPNGLW

Asp. awamori (47) Y--HNGTYHLFFQYNPGGIEWGNISWGHAISEDLTHWEEKPvALLarGFGSDVTEMyFS
 K. marxianus (59) YdaKEEDWHLYYQYNPAATIWGTPLYWGHAVSKDLTSWTDYG-ASL--GPGSDDAGA-FS

Asp. awamori (104) GSAVADVNNNTSGFGKDGKTP--LVAMYTsypvvaqtLPSGQTVqedqQSQSIAYSLDDG
 K. marxianus (115) GSMVIDYNNNTSGFFNSSVDPqrAVAVWT-----LSKGPS----QAQHISYSLDGG

Asp. awamori (161) LTWTTYdAANPVIpnppspyEAEYQNFDRDPVFWH---DESQKWVVVTSIAELHKLAIY
 K. marxianus (162) YTFQHY-SDNAVL-----INSSNFRDPKVFWHegenGEDGRWIMAVAESQVFSVLFY

Asp. awamori (217) TSDNLKDWKLVSEFGPYNAQGGVWECPLVKLP----LD-SGNST-----WVITSGLN
 K. marxianus (214) SPNLKNWTLESNFTHHGWTGTQYECPLVKVPydsvADsSSNSSskskpdSAWVLFVSI

Asp. awamori (266) PGGPPGtvGSGTQYFVGEFDGTTFTP-DADTVYpgnstanwMDWGPDFYAAAG-NGLSL
 K. marxianus (274) PGGPLG--GSVTQYFVGDFNGTHFTPiDDQTRF-----DMGKDYYALQTFfFNTPNE

Asp. awamori (324) NDHVHIGWMNNWQYGANIPTYPWRsSAMI PRHMALKTIGskATlvqQPQEAwSSISNKRP
 K. marxianus (324) -KDVYGIAWASNWQYAAQAPTDPWRSSMSLVRQFTLKDF---ST---NPNSA-VVLNSQP

Asp. awamori (384) I--YSRTFKTLSEGS-TNTTTTGET---FKVD-----LS--F--SAKSKASTFA-I
 K. marxianus (377) VlnYDALRKNGTYSiTYNTVTSENGkIKLDnpsgslefhLEyvFngSPDIKSNVFAAdL

Asp. awamori (424) AL--RASANFTEQTLVGYDFAKQQIFLDRTHSgDVSF--DETFAS---YHGPLTPDSTG
 K. marxianus (437) SLYfKGNNDNEYLRLGYETNGGAFFLDRGHT-IPFvkENLFFNhlAVTNPVSNYTTN

Asp. awamori (477) VVKLSIFVDRSSVEVFGGQGETTLTAQIFPSSDAVharlastGGTTeDVRADiYKIASTW
 K. marxianus (496) VFDVYGVIDKNIIELYFDNGNVSTNTFFFSTNNV-----IGEI-DIKSP-DKAYTI

Asp. awamori (537) N-----
 K. marxianus (547) Nsfvntqfnv

Рис. 1. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей молекул инулиназ из *Kluveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori*

тамина, аспарагина и аспарагиновой 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 [3], могут выполнять 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. Участие кислой аминокислоты в акте катализа подтверждено результатами химической модификации инулиназы *Aspergillus awamori* специфическими реагентами [4], причем более вероятен факт наличия в

активном центре гликозидазы аспарагиновой, а не глутаминовой кислоты, ввиду меньшей подвижности структуры последней.

В табл. 2 представлен полный аминокислотный состав инулиназ из *Kluveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori*. Анализ первичных структур этих ферментов объясняет более высокую устойчивость инулиназы из *Aspergillus awamori* к органическим растворителям по сравнению с дрожжевой формой, поскольку белок микромицета характеризуется большим количеством (26,07%) аминокислотных остатков с алкильными боковыми цепями (аланин, валин, лейцин, изолейцин). Эксперименты, проводившиеся в нашей лаборатории, показали, что оптимальной для осаждения инулиназы из поверхностной культуры *Aspergillus awamori* является концентрация ацетона 65%, в этом случае выход фермента и эффективность очистки максимальны [4]. Для молекулы инулина-

Таблица 1

Частота совпадения гомологичных аминокислотных остатков в первичных структурах инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori*

Аминокислота	Частота совпадения
Аланин	7
Валин	10
Лейцин	12
Изолейцин	2
Глицин	15
Пролин	12
Цистеин	1
Метионин	2
Гистидин	5
Фенилаланин	10
Тирозин	9
Триптофан	11
Аспарагин	15
Глутамин	5
Серин	14
Треонин	9
Лизин	3
Аргинин	5
Аспарагиновая кислота	12
Глутаминовая кислота	3

зы из *Kluyveromyces marxianus* аминокислотные остатки с алкильными боковыми радикалами составляют 24,13% от общего количества остатков аминокислот.

Серин и треонин способны к образованию эфиров фосфорной и органических кислот и служат местом прикрепления углеводных компонентов в гликопротеидах. Высокое содержание остатков серина и треонина (для молекулы инулиназы из *Aspergillus awamori* 18,06%, а для фермента *Kluyveromyces marxianus* 17,29%) обеспечивает гидратацию молекул фермента за счет образования системы водородных связей.

Из табл. 2 видно, что в состав молекул инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori* входят по одной SH-группе цистеина. Из этого факта следует, что в стабилизации каталитически активной конформации инулиназы участвуют электростатические и гидрофобные взаимодействия, а не дисульфидные связи.

Анализ аминокислотных последовательностей инулиназ *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori* объясняет различную термостабильность данных ферментов. Выявлено, что для энзима, выделенного из микромицета, характерно проявление наиболее высокой каталитической актив-

Таблица 2

Аминокислотный состав инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori*

Аминокислота	<i>Kluyveromyces marxianus</i>		<i>Aspergillus awamori</i>	
	Количество	% от общего числа	Количество	% от общего числа
Аланин	29	5,22	42	7,82
Валин	40	7,20	33	6,15
Лейцин	37	6,67	34	6,33
Изолейцин	21	3,78	21	3,91
Глицин	42	7,57	47	8,75
Пролин	27	4,86	32	5,96
Цистеин	1	0,18	1	0,19
Метионин	7	1,26	10	1,86
Гистидин	13	2,34	13	2,42
Фенилаланин	37	6,67	28	5,21
Тирозин	32	5,77	27	5,03
Триптофан	15	2,70	17	3,16
Аспарагин	49	8,82	27	5,03
Глутамин	17	3,06	23	4,28
Серин	55	9,90	49	9,12
Треонин	41	7,39	48	8,94
Лизин	24	4,32	21	3,91
Аргинин	12	2,16	12	2,23
Аспарагиновая кислота	40	7,20	31	5,77
Глутаминовая кислота	18	3,24	21	3,91

ности в диапазоне температур 40—60° С с максимум при 50° С. Дрожжевая инулиназа также характеризуется оптимальным значением температуры гидролиза 50° С, но более узким диапазоном оптимальных температур. Показано, что наибольший вклад в термическую устойчивость бактериальных и дрожжевых гидролаз вносят остатки триптофана, кроме того, термостабильность энзимов обеспечивают дисульфидные связи, формирующиеся между двумя остатками цистеина [5]. При сравнении аминокислотных остатков инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus awamori* обнаружено, что молекула дрожжевого фермента содержит 15 остатков триптофана, то есть на 2 остатка меньше, чем инулиназа плесени. Данный факт позволяет сделать нам предположение о том, что именно триптофану принадлежит ключевая роль в проявлении инулиназами термостабильных свойств, поскольку дисульфидные связи в их молекулах отсутствуют.

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 [6]. Поэтому в тех случаях, когда полная информация о пространственной организации исследуемого белка отсутствует, изучение структурной вариативности может значительно расширить представления о локализации того или иного аминокислотного остатка в глобуле.

Для выявления консервативных областей первичных структур ферментов мы осуществили сравнительный анализ аминокислотных последовательностей инулиназ из различных источников: *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas mucedolens*, *Paenobacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Penicillium species TN-88*, *Kluyveromyces marxianus* (рис. 2). Выяснилось (табл. 3), что в состав константных областей полипептидных цепей инулиназ различного происхождения входят остатки Asp и Glu, карбоксильные группы которых, по мнению многих авторов, участвуют в разрыве фруктозидных связей в молекуле инулина в процессе катализа, и остатки Arg, Ser, Asn, Gln, Trp, выполняющие, по видимому, субстратсвязывающую функцию в молекуле инулиназы *Aspergillus awamori* [2, 3, 7—9].

Сопоставление первичных структур инулиназ показало, что частота замен остатков на протяже-

нии полипептидных цепей отличается высокой вариабельностью. Аминокислотные последовательности инулиназ *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* и *Penicillium species TN-88* характеризуются малой частотой замен остатков в каждой конкретной позиции, что свидетельствует об эволюционной близости продуцентов. Более эволюционно значимыми событиями являются вставки и пропуски отдельных остатков или целых групп аминокислот. Наличие подобных изменений затрудняет сопоставление первичных структур белковых молекул. Так, цепь N-концевого домена инулиназы *Aspergillus awamori* утратила несколько довольно протяженных фрагментов по сравнению с полипептидной цепью *Kluyveromyces marxianus* или *Penicillium species TN-88*.

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 [10]. В тех случаях, когда пространственная организация белка еще неизвестна, подобная структурная вариативность 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 плесневого происхождения содержат 1—2 остатка Cys: *Aspergillus awamori* — Cys 242 [2], *Penicillium species TN-88* — Cys 249 и Cys 539 [6], что может свидетельствовать о преимуществе поддерживающих четвертичную структуру не дисульфидных связей, а гидрофобных взаимодействий. Результаты наших экспериментов по ИК-спектроскопии отдельных субъединиц инулиназы *Kluyveromyces marxianus* также позволяют сделать заключение о том, что четвертичная структура фермента поддерживается именно гидрофобными взаимодействиями.

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 [3, 4, 7]. Показано, что п-хлормеркурийбензоат

Geobacill (1) MK-----THNSEKY----RPTFHFSFKKNWMDPNGLV
Pseudomon (1) MD-----KVYYQEKF----RPQFHFTPETNWMNDPNGLV
Paenibaci (1) MN-----VIRQEKY----RPSYHFSFKSGWMDPNGMV
Bacillus (1) MS---SLIAGLIEDPEDDFGYGKLRGLTAASLAAAI TVGRPI LHYTAKNTWLNDPNGLV
Asp. awa (1) MA---PLSKALSVFMLMGITYAFN-----YDQPY----RGQYHFSFKKNWMDPNGLL
Asp. nig (1) MA---RLLKAVTVCALAGIAHAFN-----YDQPY----RGQYHFSFKKNWMDPNGLL
Penicilli (1) MK---SISMLWEVLLLGAFLSQVDAAPTKE SYTELY----RPQYHFTPAQNWMNDPNGLL
Kluyverom (1) MKlaySLLLPLAGVSASVINYKR DGD-SKAITNTTF-SLNRPSVHFTPSHGWMNDPNGLV

Geobacill (30) Y--FKGEYHLFFQHNPND SIWG-PMHWGHAVSKDMIEWEELDIALY PDENGT-IFSGSVV
Pseudomon (31) Y--YEGEYHLFYQYHPFGNTWG-PMHWGHAVSKDLIHW DHPIALY PDHIGQ-IFSGSAV
Paenibaci (30) Y--YEGRYHLFYQHHPFGTTWG-PMHWGHAVSTDL MNWEEQP IALEPDELGT-IFSGSAV
Bacillus (58) W--HQGVYHLFYQNNPFDNVWG-NMSWGHATSTDLLHWTEHPVAIACNE-EEDVFSGSIV
Asp. awa (47) Y--HNGTYHLFFQYNPGGIEWG-NISWGHATSEDLTHWEEKPVALLARGFGSDVTE MYFS
Asp. nig (47) Y--HNGTYHLFFQYNPGGIEWG-NISWGHATSEDLTHWEEKPVALLARGYGS DVTE MYFS
Penicilli (54) Y--ADGTYHMYQYNPGGNTWG-AMSWGHATSEDLTHWEEKPVALLARGYPNNIT EMMFFS
Kluyverom (59) YdaKEEDWHLLYYQYNPAATIWGtPLYWGHAVSKDLT SWTDYGASLGP GSDDAGAFSGSMV

Geobacill (86) IDWNNTSGFF--PKEPGMVAIFTQNLHDADHTTPIQTQSLAFSHDRGR TWTKYEKNPVLK
Pseudomon (87) IDWQDTSGFF--NGGAGMVALFTHADKFPDSGRPRQRQSLAYSTDRGR TWIKYEGNPF FA
Paenibaci (86) VDEQDTSGFF--GGKPLVAIFTTHASLPGTEQVRQCQSLAYSTDSGKTWIKY TGNPVLE
Bacillus (114) VDHGNTSGFG-TAEDPALVAIYTSAFKEG SVHQGTQAQSLAFST DAGMTWSKYAGNPVLG
Asp. awa (104) GSAVADV NNT-SGFGKDGKTPLVAMYTSYYPVAQTLPSGQTVQEDQQSQS IAYSLDDGLT
Asp. nig (104) GSAVADV NNT-SGFGKDGKTPLVAMYTSYYPVAQTLPSGQTVQEDQQSQS IAYSLDDGLT
Penicilli (111) GSAVIDEHNT-SGFGKKGKAPWIAMYTSYYP TAQVLP SGKQVRDNQQAQSIAYSLDHGTT
Kluyverom (119) IDYNNTSGFFnSSVDPQR AV--AVWTL--SKGPSQAQHSYSLDGGYTFQHYS DNAVL D

Geobacill (144) -----HPTKVDFRDPKVFWHY--ESE--KWIMVLATGQT--VSIYSS
Pseudomon (145) ----DEAM-----TDFRDPKVFWHK--ASN--KWIMILAAGNC--VRIYHS
Paenibaci (144) ----DKEC-----IDFRDPKVFWHK--PTE--QWVMVLACGQT--IRIYHS
Bacillus (173) ---RGS AH-----FRDPKVF RYEGPAGS--RWIMVAVEAQHQQVVLYRS
Asp. awa (163) WTTYDAANPVI PNPPSPYEA EYQNF RDPFVFWHD--ESQ--KWVVVTSIAELHKLAIYTS
Asp. nig (163) WTTYDAANPVI PNPPQPYQAQYQNF RDPFVFWHD--ESQ--KWVVVTSIAELHKLAIYTS
Penicilli (170) WTTYDEANPVIDPPAPYQDQFLDFRDPNIFWHQ--PIR--KWVAVVSLAKLHKLIIYTS
Kluyverom (175) ---INSSN-----FRDPKVFWHEGENGEdgRWIMAVAESQVFSVLFYSS

Geobacill (180) PNLIDWQFESEFGENIGCHDGVWEC PDLFELP----VE---NSEEKK----WVMFVSI--
Pseudomon (181) SNLKQWKFASEFGANEGSHTGVWEC PDLFELP----VD--GDRNRKK----WVMVSI--
Paenibaci (180) PNLKEWTFASEFGHGIGSHDAVWEC PDLFPLY----ID--EKREQVK----WMLVSI--
Bacillus (212) ADLKDWEYLSTFGPANASD-GEWEC P----LP----VD--GDPDNVK----WVLV NINP
Asp. awa (219) DNLKDWKLVSEFGPYNAQG-GVWEC PGLVKLP----LD--SGNS-TK----WVITSGLNP
Asp. nig (219) DNLKDWKLVSEFGPYNAQG-GVWEC PGLFKLP----LD--GGSS-TK----WVITSGLNP
Penicilli (226) TNLKQWDLSEFGPFNAVG-GNWEC PNIFPLP----VD--GDKSKVK----WVAIVGINP
Kluyverom (216) PNLKNWTL ESNFTHHGWTG-TQYEC PGLVKVPydsvADs sSNSSDSKpds aWVLFVSI NP

Geobacill (227) GDNR-QFDSGSRTQYFIGSFDGSNFKVDENN----N-----
Pseudomon (229) GNSD-EYLEGSRTQYFIGQFDGIRFTNEND-----
Paenibaci (228) GDVP-EIREGSRTQYFTGEFDGTT FVADAES-----
Bacillus (257) G----AVAGGSGGQYFVGFDFG VQFPADPDSLVP TD-----
Asp. awa (267) GGPPGTV--GSGTQYFVGEFDGTTFTPDADTVYPGN-----
Asp. nig (267) GGPPGTV--GSGTQYFVGEFDGTTFTPDADTVYPGN-----
Penicilli (275) GGPPGTV--GSGVQYFLGDFNGTTFTADSNSIHGGGppdgsfifedfegnhsfsdrgwia
Kluyverom (275) GGP---L-GGSVTQYFVGFDFNGTHFTPIDD-----

Geobacill (258) -----
Pseudomon (258) -----
Paenibaci (258) -----
Bacillus (289) -----
Asp. awa (301) -----
Asp. nig (301) -----
Penicilli (333) tgdfigtspvagtlpgqnpvtgylgnqlvntflngdattgtltspstisykyinfligg
Kluyverom (301) -----

Рис. 2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей инулиназ из различных продуцентов

Анализ аминокислотных последовательностей инулиназ из различных источников

Geobacill	(258)	-----
Pseudomon	(258)	-----
Paenibaci	(258)	-----
Bacillus	(289)	-----ADGN-----VDL-----
Asp. awa	(301)	-----
Asp/ nig	(301)	-----
Penicilli	(393)	gdninqtaiqlkIDGNvvyaatgsnseqltwqhwdvvsafqnqtavieiIDLatggwghin
Kluyverom	(301)	-----
Geobacill	(258)	-----EVLWLDGKDNAGVTFSDIPKEDGRRIY-IGWMSNWRYANEVPTV
Pseudomon	(258)	-----P---ETVLWVDHGRDNYAGVTWSDIPEEDGRRLF-IAWMSNWRYANHTPTE
Paenibaci	(258)	-----EKVRWLDYGRDNYAGVCWSDIPAEDGRRLF-MGWMSNWRYANQTPTE
Bacillus	(296)	-----RHCLWLDWGRDYAAVFSNAP--ENRRIM-IGWMNNDYANSLPTS
Asp. awa	(301)	-----STANWMDWGPDFYAAAGYNGLS--LNDHVH-IGWMNNDYGANIPTY
Asp. nig	(301)	-----STANWMDWGPDFYAAAGYNGLS--IKDHVH-IGWMNNDYGANIPTY
Penicilli	(453)	vdeisfantPatnNNANWLDWGPDFYATQGYNGLP--QYQRTI-ISWMNNDYGGVIPTS
Kluyverom	(301)	-----QTRFLDMGKDYALQTFNTP--NEKDVYgIAWASNWQYQQAPT
Geobacill	(303)	GWRGQMTLPRVLSLR---KIGDKLRVI--QNPVKELDNYFTKQIVIHDE----IISSGIQ
Pseudomon	(305)	IWRSAMTIPRSLSLR---STPEGTRLF--QTPVTELESLRLEKLEWKDLE---VTNNGNV
Paenibaci	(304)	RWRGAMSIPRELALR---TRKGTVALV--QRPVRELEGLRT--PVLSLTE---PSWEEVR
Bacillus	(340)	PWRSSMSLAREIELA---TVDGFPRLV--QRPVLPDSDGEPARTIQNME--LTPCCNCP
Asp. awa	(345)	PWRSAMAIPRHMALK---TIGSKATLV--QQPQEAWSISNKRPIYSRT--FKTLSEGST
Asp. nig	(345)	PWRSAMAIPRHLALK---TINNKTTLV--QQPQEAWSISSKHPLYSRT--YSTFSEGST
Penicilli	(510)	PWRSAMSIPRQLSLK---TIDESIAVV--QEPEECWKAITQTQIASTFP--SITGTHSLG
Kluyverom	(345)	PWRSSMSLVRQFTLkdfsTNPNSADVvlnSQPVLNYDALRKNGTTSYITNyTVTSENGKK
Geobacill	(354)	KKIDINQPSV--EIVLNVN-----NLGAKQFGLVLHHTEN--QSTTITIDLLTNLLSLD
Pseudomon	(357)	--LSNISGDI-FEIIAEFE-----LNTALEFGFKVRKSAD--QETIVGYDAEQQMLFID
Paenibaci	(354)	NALSALQLDC-YELVAEFA-----TTGDFGFKVRVS-D-EQETLVGYTSATQEVYVD
Bacillus	(393)	--TRRPPGSA-QLIEAEI-----LPGTARHIAFRLLGAPDGSAAATVLSFDALTSRLTLD
Asp. awa	(398)	--NTTTTGET-FKVDLSFS-----AKSKASTFAIALRASANFTEQTLVGYDFAKQQIFLD
Asp. nig	(398)	--NASTTGET-FRVDLFS-----ATSKASTFAIALRASANFTEQTLVGYDFAKQQIFLD
Penicilli	(563)	--DIGNAAEI-ELTFSSGD-----GTNGSSEFGIIVRASKDFSQQTRIGYDFTTQQVFVD
Kluyverom	(405)	IKLDNPSGSLeFHLEYVFNgspdiKSNVFADLSLYFKGNDDNEYLRRLGYETNGGAFFLD
Geobacill	(404)	RTNSGEVSF--SENF--LNNQVMKIHDTTKLNLR-RII--VDSSSVEIFVNEGAHALTSLI
Pseudomon	(406)	RTQSGVSDFC--EHFPCKHGAVMIPNQ-RIQM-HIF--VDRSSVEVFGNNGELTMTDLI
Paenibaci	(403)	RKRSGRSDF--HEDFAGKHGASLTILPD-RMDI-RIY--VDRSSIEVFFDRGQVAITDLI
Bacillus	(444)	RRNSGNTAF--TISSRRLNPQPVKASTGGALRL-KVI--IDQCSVEVFAQTAGLC-----
Asp. awa	(450)	RTHSGDVSF--DEFASVYHGPLTPDSTGVVVKL-SIF--VDRSSVEVFGGQGETTLTAQI
Asp. nig	(450)	RTKSGDVSF--DNTFASVYHGPLVPDSTGMVRL-SIF--VDRSSVEVFGGQGETTLTAQI
Penicilli	(615)	RTKSGDVSF--DSTFASVYYAPLSPASDKTVTL-RIF--VDWSSVEVFGGQQTMTTQI
Kluyverom	(465)	RGHT-KIPFVkenLFFNHQLAVTNPVSNYTTNVfDVYgvIDKNIIELYFDNGNVVSTNTF
Geobacill	(457)	YDPKACEKISIFSLGG---DIQLSNSYISFPNSIRRNF--GY
Pseudomon	(460)	FPDSSSTGIEVYAKEGNVKLVSMLFPLMPIHSHLKSFvmNN
Paenibaci	(457)	FPDAEAKGLEIFSAEEQITVFSLELYALK-----
Bacillus	(494)	-----
Asp. awa	(505)	FPSSDAVHARLASTGGTTEDVRADIYKIASTWN-----
Asp. nig	(505)	FPSNDAVHARLVSTGGATEDVRVDVHNITSTWN-----
Penicilli	(670)	FPDENATNAQLFSTGGSTKNVQLRISKVRSTWV-----
Kluyverom	(524)	FFSTNNVIGEIDIKSPYDKAYTINSFNVTFQFNV-----

Рис. 2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей инулиназ из различных продуцентов (продолжение)

Таблица 3
Константные области полипептидных цепей
инулиназ из различных источников

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(Asp41)
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-FSGSA V	99—108 ^{5,6} 102—113 ⁷	S-103(Ser103)
NFRDPFVFWHDES	186—199 ^{5,6}	R-188(Arg188)
FRDPKVFVWNH	151—159 ^{1,3} 152—160 ² 181—189 ⁸	—
GVW ECP	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(Glu241)
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)

Примечание: 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*.

инактивирует инулиназу *Bacillus polymyxa* 772, что свидетельствует об участии в акте катализа реакции гидролиза инулина сульфгидрильной группы цистеина [11].

Методом рентгеноструктурного анализа установлено, что в активный центр инулиназы *Aspergillus awamori* входят Glu 241 и Asp 41 [12]. Авторами 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.

Логично предположить, что в состав активного центра инулиназы *Kluyveromyces marxianus* так же входят остатки Asp и Glu, им соответствуют звенья Asp 51 и Glu 285 полипептидной цепи фермента. До конца не ясна роль Cys 239, который является константным во всех последовательностях первичных структур рассмотренных нами ферментов. 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.

На рис. 3 схематически представлен итог сравнения последовательностей аминокислот инулиназ из различных источников. Высокая степень гомо-

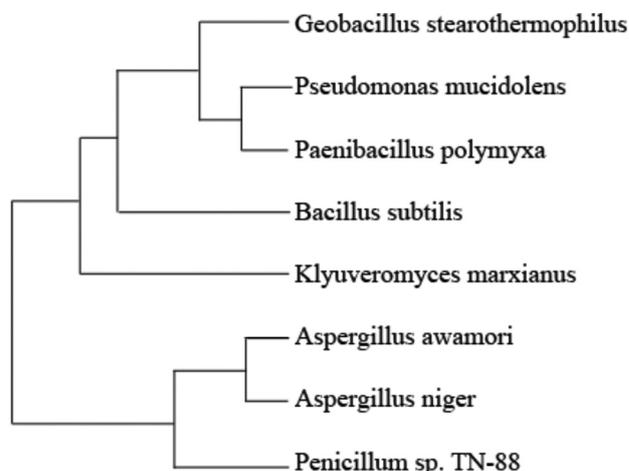


Рис. 3. Схематическое изображение степени гомологии аминокислотных последовательностей инулиназ различного происхождения

логичности показана для ферментов *Aspergillus awamori* и *Aspergillus niger*, самые существенные отличия обнаружены между инулиназами *Geobacillus stearothermophilus* и *Penicillium species TN-88*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wen T. Cloning of inulinase gene in *Kluyveromyces marxianus* / T. Wen, K. Huo, Y. Li // *Bioresource Technology*. — 1999. — Vol. 69. — P. 132—138.
2. Exo-inulinase from *Aspergillus awamori* var. 2250: enzymatic properties, sequence analysis and preliminary X-ray data / M. Arand [et al.] // *J. Biosci. Bioeng.* — 2001. — Vol. 96, № 6. — P. 324—331.
3. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды / О. С. Корнеева. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. — 184 с.
4. Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобилизованными амилазами: дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.02 : защищена 21.10.98 : утв. 1.04.99 / Т. А. Ковалева. — Воронеж, 1998. — 421 с.
5. Impact of tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability / K. Hsu [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. — 2001. — Vol. 1547, № 2. — P. 329—338.
6. Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88 / H. Akimoto [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2000 — Vol. 64, № 11. — P. 2328—2335.
7. Об особенностях строения активного центра и механизм действия инулазы / Т.А. Ковалева [и др.] // *Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов : материалы междунаро. симп. - Воронеж, 1995. — С. 68—72.*
8. Жеребцов Н.А. О механизме расщепления β -2,1-фруктозидных связей инулина инулазой *Aspergillus awamoti* 2250 / Н.А. Жеребцов, О.С. Корнеева, Т. Н. Тертычная // *Биохимия*. — 1995. — Т. 60, № 10. — С. 1580—1588.
9. Жеребцов Н.А. О механизме каталитического действия карбогидраз (обзор) / Н. А. Жеребцов, О. С. Корнеева, Т. Н. Тертычная // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 1999. — Т.35, № 2. — С. 123—132.
10. Шерман С.А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул / С. А. Шерман, А. М. Андрианов, А. А. Ахрем. — Минск : Наука и техника, 1989. — 240 с.
11. Идентификация каталитически активных групп инулиназы *Vacillus polymyxa* 722 / Н.А. Жеребцов [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2003. — Т. 39, № 6. — С. 619—624.
12. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition / R. A. P. Nagem [et al.] // *J. Mol. Biol.* — 2004 — Vol. 344, № 11 — P. 1—10.

Ковалева Тамара Андреевна — профессор Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-586; (4732) 208-578, факс: (4732) 208-308, e-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru

Холявка Марина Геннадьевна — аспирантка Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-308; e-mail: Holyavka@rambler.ru

Образцова Татьяна Борисовна — студентка Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-308

Kovaleva Tamara A. — professor of Voronezh State University; tel.: (4732) 208-586; fax: (4732) 208-308, e-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru

Holyavka Marina G. — post-graduate student of Voronezh State University; tel.: (4732) 208-308; e-mail: Holyavka@rambler.ru

Obrazcova Tatyana B. — student of Voronezh State University; tel.: (4732) 208-308