

НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКЗО- И ЭНДОИНУЛИНАЗ: СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ, СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АСПЕКТ

С. М. Макин, Ф. А. Сакибаев, М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 26.07.18 г.

Аннотация. Инулиназы имеют большие перспективы в качестве промышленных ферментов для производства сиропов с высоким содержанием фруктозы и для получения инулоолигосахаридов различной длины. Инулиназы подразделяются по механизму гидролиза субстрата на экзоинулиназы (КФ 3.2.1.80), которые отщепляют концевые остатки фруктозы от молекулы инулина, и эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7), которые осуществляют гидролиз инулина вдали от них с образованием инулоолигосахаридов. Экзоинулиназы и эндоинулиназы отличаются субстратной специфичностью, что обусловлено различием в строении их активных центров.

Эффективное использование инулиназ в промышленности с сохранением активности фермента на достаточно высоком уровне требует изучения его структурно-функциональных свойств, молекулярной и надмолекулярной организации. Понимание закономерностей ассоциации-диссоциации молекул энзима играет важную роль в практическом применении энзимов в свободном и иммобилизованном виде. Целью работы было создать компьютерные модели димеров экзо- и эндоинулиназ из различных продуцентов, выявив особенности их надмолекулярной организации и типы контактов между мономерами экзо- и эндо-форм фермента.

Пространственные структуры экзоинулиназ были получены из их аминокислотных последовательностей путем реконструкции методами высокопроизводительного компьютерного моделирования на основе молекулы экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W). В случае эндоинулиназ в качестве матрицы для реконструкции пространственной структуры их макромолекул выступала эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7).

Моделирование белковых комплексов (димеров) осуществляли в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock. Перед проведением численных расчетов центры молекул инулиназы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы обе молекулы фермента полностью были внутри расчетной области пространства. Каждый из лигандов в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу.

Визуализацию молекулярных структур осуществляли в программах Jmol, Maestro и Swis PDB Viewer. Расчет параметров пор, туннелей и полостей проводили в программном обеспечении Mole.

В статье обсуждаются вопросы об аминокислотном составе сайтов связывания между мономерами в составе димера и механизмах процесса димеризации инулиназ из различных продуцентов. Показано, что пространственная организация димерных комплексов дифференцируется в зависимости от принадлежности фермента к экзо- или эндоинулиназам. Установлено, что в процессе димеризации инулиназы при образовании контактов между мономерными формами фермента из всех исследуемых продуцентов определяющая роль принадлежит неполярным аминокислотным остаткам.

Ключевые слова: инулиназа, надмолекулярная организация, димер, сайты связывания, молекулярный докинг.

Инулин и инулинсодержащие материалы являются возобновляемым и недорогим субстратом для производства пребиотических фруктоолигосахаридов, которые пользуются высоким спросом в пищевой промышленности и производятся на коммерческой основе с использованием инулин-

расщепляющих ферментов [1]. Инулин выступает в качестве запасного полисахарида и накапливается в подземных корнях и клубнях некоторых растений, таких как топинамбур (*Helianthus tuberosus*), цикорий (*Cichorium intibus*, *Cichorium endivia*) и георгин (*Dahlia pinnata*) [2].

Инулиназы приобретают все большее значение в качестве промышленных ферментов [3].

Они представляют собой фруктофуранозилгидролазы, подразделяющиеся по механизму гидролиза на 2 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, энзимы из второй группы – для получения инулоолигосахаридов различной длины [4].

Экзоинулиназы и эндоинулиназы отличаются субстратной специфичностью, что обусловлено различием в строении их активных центров. Исследование эндоинулиназы из *Aspergillus niger* и экзоинулиназы из *Bacillus stearothermophilus* показывает, что на поверхности макромолекул ферментов присутствуют определенные аминокислоты, которые создают сложную сеть взаимодействий с несколькими другими остатками активного центра фермента, играя важную роль в поддержании его конформации, способствующей селективности фермента [5].

Экзоинулиназы имеют Asp-остаток в активном центре (Asp 24 в ферменте из *B. stearothermophilus* и Asp 41 – в *A. awamori*), который должен отвечать за нуклеофильную атаку [6], в активном центре эндоинулиназы Asp заменяется остатком Glu 43. Из-за большого размера субстратов каталитический центр эндоинулиназы довольно широк и составляет около 90 из 516 остатков. Для сравнения, каталитический центр экзоинулиназы существенно меньше и включает 42 из 493 аминокислот [5].

Общей особенностью структур эндоинулиназы и экзоинулиназы является наличие участка Arg-Asp-Pro (RDP), последовательность которого сохраняется и в других классах ферментов, таких как фруктозил-трансферазы или инвертазы. Предполагается, что присутствие этого фрагмента важно для распознавания пиранозидного кольца, что необходимо для обеспечения специфичности фермента в отношении фруктопиранозидных остатков [5-7].

Инулиназы могут быть получены из клеток растений, животных и микроорганизмов [5]. Использование растений и животных в качестве продуцентов инулиназ для промышленного применения осложнено тем, что выход фермента очень мал. Производство инулиназ путем микробного синтеза обладает многими преимуществами, такими как удобство обработки, культивирование продуцента в контролируемых условиях и высокий выход продукта. В течение последних нескольких

десятилетий были предприняты многочисленные усилия для поиска микробных источников для производства инулиназ. Ряд грибов (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*), бактерий (*Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*) и дрожжей (*Kluyveromyces sp.*, *Candida sp.*) были признаны эффективными продуцентами инулиназы [8].

Эффективное использование инулиназ в промышленности с сохранением активности фермента на достаточно высоком уровне требует изучения его структурно-функциональных свойств, молекулярной и надмолекулярной организации. Понимание закономерностей ассоциации-диссоциации молекул энзима играет важную роль в практическом применении энзимов в свободном и иммобилизованном видах.

По этой причине целью нашей работы было создать компьютерные модели димеров экзо- и эндоинулиназ из различных продуцентов, выявив особенности их надмолекулярной организации и типы контактов между мономерами экзо- и эндоформ фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (CAC44220.1), *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA25512.1), *Bacillus licheniformis* (AGR40655.1), *Geobacillus stearothermophilus* (BAC45010.1) и *Paenibacillus polymyxa* (AHN08014.1) и эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286), *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510), *Fusarium oxysporum* (ANY59682) и *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1) [9-21].

Пространственные структуры экзоинулиназ были получены из их аминокислотных последовательностей путем реконструкции методами высокопроизводительного компьютерного моделирования [22] на основе молекулы экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W) [6]. Для реконструкции эндоинулиназ в качестве матрицы для восстановления пространственной структуры выступала эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) [23].

Моделирование белковых комплексов (димеров) осуществляли в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock. Эти пять программ имеют несколько различающиеся алгоритмы расчетов моделей с минимальным значением общей энергии системы. Так как в нашем эксперименте все программы дали приблизительно одинаковый численный результат, мы считаем,

что расчет проведен адекватно, а полученные нами данные корректны.

Перед осуществлением численных расчетов центры молекул инулиназы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы обе молекулы фермента полностью были внутри расчетной области пространства. Каждый из лигандов в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Применяли так называемый «слепой» докинг. В программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock существует ранжирование по энергии комплекса: мы отбирали 10 «лучших» (с минимальной энергией) позиций лиганда (один мономер инулиназы), связанного с рецептором (второй мономер фермента). Результаты эксперимента мы считали корректными, если три «лучшие» позиции лиганда связывались в одной и той же области макромолекулы инулиназы.

Из полученных каждой программой данных мы рассчитывали средние значения количества неполярных, полярных незаряженных, заряженных отрицательно и заряженных положительно аминокислотных остатков. Визуализацию молекулярных структур осуществляли в программах Jmol, Maestro и Swis PDB Viewer.

Расчет параметров пор, туннелей и полостей проводили в программном обеспечении Mole. Под «полостью» понимали свободное замкнутое пространство внутри глобулы фермента, не сообщ-

ающееся с поверхностью молекулы. Под «порой» – свободное пространство внутри глобулы, сообщающееся с ее поверхностью только через одно отверстие, т.е. углубление на поверхности или в толще молекулы. Под «туннелем» мы подразумевали сквозное отверстие в белковой глобуле, т.е. свободное пространство внутри молекулы, сообщающееся с ее поверхностью через два и более отверстий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная организация димерных комплексов инулиназ, согласно рассчитанным нами моделям молекул с минимальной полной энергией, дифференцируется в зависимости от принадлежности фермента к экзо- или эндоинулиназам (рис. 1): наблюдается характерное расположение субъединиц относительно друг друга для энзимов, принадлежащих к одной из указанных групп.

Локализация заряженных (рис. 2) и гидрофобных (рис. 3) аминокислотных остатков на поверхности мономеров, а также внутренних полостей и туннелей внутри белковой глобулы сходна в наибольшей степени у экзоинулиназ из продуцентов рода *Aspergillus*. Кроме того, указанные молекулы отличаются отсутствием пор. Высокое сходство характерно также для димеров экзоинулиназ из *A. awamori* (CAC44220.1) и *A. ficuum* (ADM21204.1).

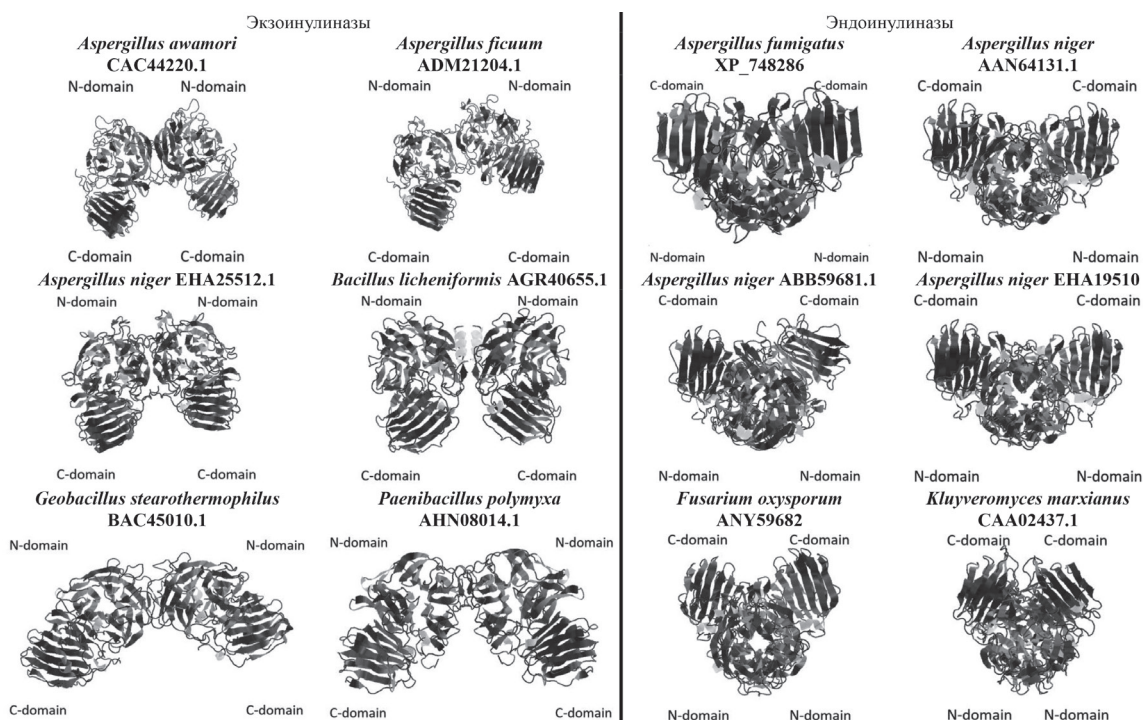


Рис. 1. Структура молекул димеров экзо- и эндоинулиназ

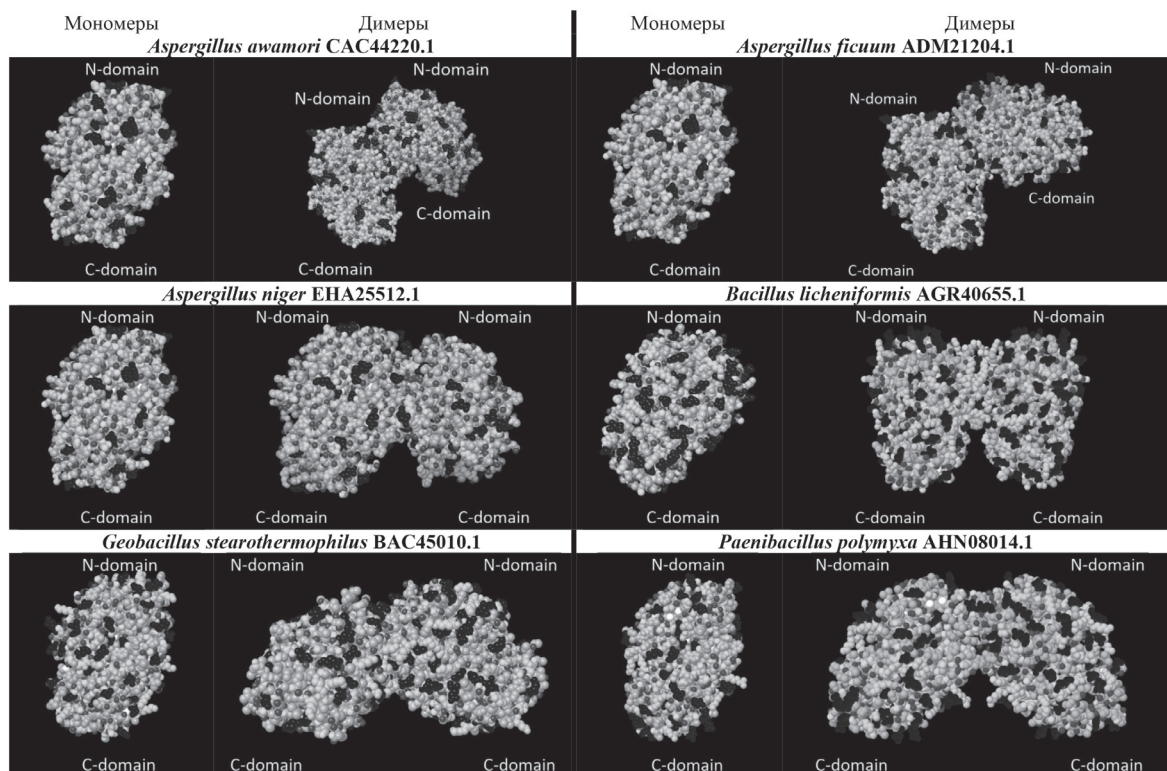


Рис. 2. Заряженные аминокислотные остатки на поверхности молекул мономеров и димеров экзоинулиаз (черным цветом выделены остатки, заряженные положительно, темно-серым – заряженные отрицательно)

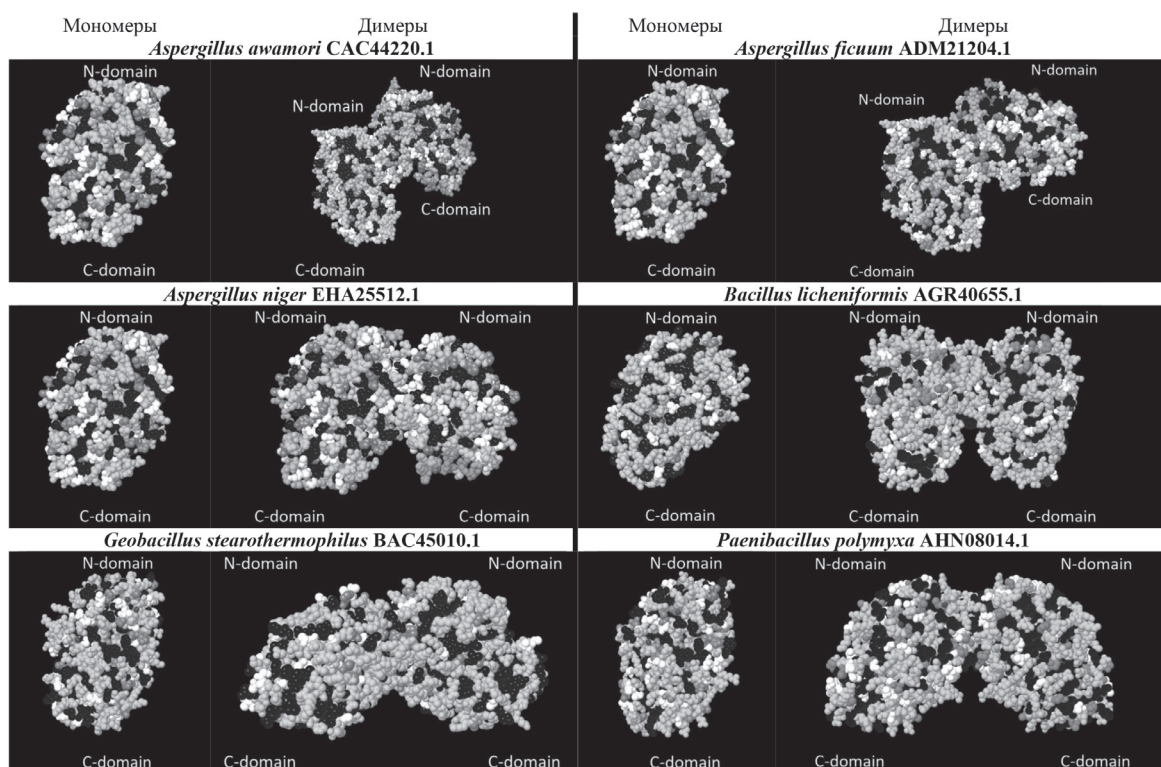


Рис. 3. Гидрофобные аминокислотные остатки на поверхности молекул мономеров и димеров экзоинулиаз (цветами черный→темно-серый→белый выделены гидрофобные аминокислотные остатки в порядке уменьшения гидрофобности)

Мономеры эндоинулиназ из продуцентов *Aspergillus sp.* также имеют сходную между собой локализацию заряженных (рис. 4) и гидрофобных (рис. 5) аминокислотных остатков на своих поверхностях, которая при этом отлична от таковой для экзоинулиназ из грибов того же рода. Наиболее ярко указанное сходство выражено у разных форм эндоинулиназ из *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510).

Для мономеров всех анализируемых нами экзоинулиназ характерно наибольшее скопление внутренних полостей в области N-концевого домена (рис. 6), тогда как для мономеров эндоинулиназ такая закономерность не выявлена. После димеризации данная особенность сохраняется у всех экзоинулиназ, кроме фермента из *Geobacillus stearothermophilus* (BAC45010.1) (рис. 7).

Количество внутренних полостей в мономерах экзоинулиназ составляет 7 для энзимов из *Bacillus licheniformis* (AGR40655.1) и *Paenibacillus polymyxa* (AHN08014.1), 9 для инулиназ из *A. awamori* (CAC44220.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1), 11 для ферментов из *A. ficuum* (ADM21204.1) и *A. niger* (EHA25512.1). При формировании димера в области контакта субъединиц образуется одна но-

вая внутренняя полость в молекулах димеров экзоинулиназ из *A. awamori* (CAC44220.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1), две новые внутренние полости в молекуле экзоинулиназы из *B. licheniformis* (AGR40655.1). У экзоинулиназы из *A. niger* (EHA25512.1) в результате димеризации уменьшается количество внутренних полостей в одной из субъединиц в составе димера по сравнению с мономером. Локализация данных структур в субъединицах димеров экзоинулиназ из *A. niger* (EHA25512.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) в значительной степени отличается от таковой в мономерах (рис. 6).

Количество внутренних полостей в мономерах эндоинулиназ составляет 4 для разных форм фермента из *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510), 7 для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1), 8 для энзима из *A. fumigatus* (XP_748286) и 10 для фермента из *Fusarium oxysporum* (ANY59682). При формировании димерного комплекса одна новая внутренняя полость образуется в молекуле эндоинулиназы из *K. marxianus* (CAA02437.1) в области контакта субъединиц, две дополнительных внутренних полости образуются в молекуле одной из форм фермента *A. niger* (AAN64131.1) только

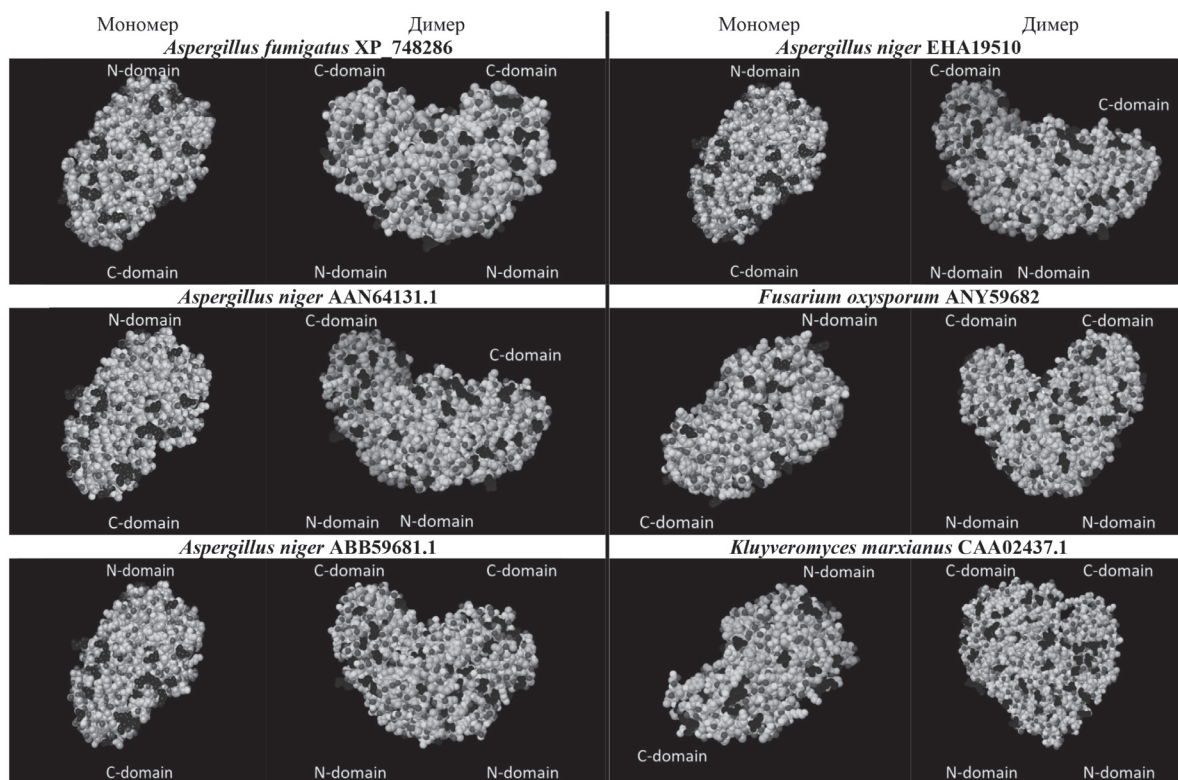


Рис. 4. Заряженные аминокислотные остатки на поверхности молекул мономеров и димеров эндоинулиназ (черным цветом выделены остатки, заряженные положительно, темно-серым – заряженные отрицательно)

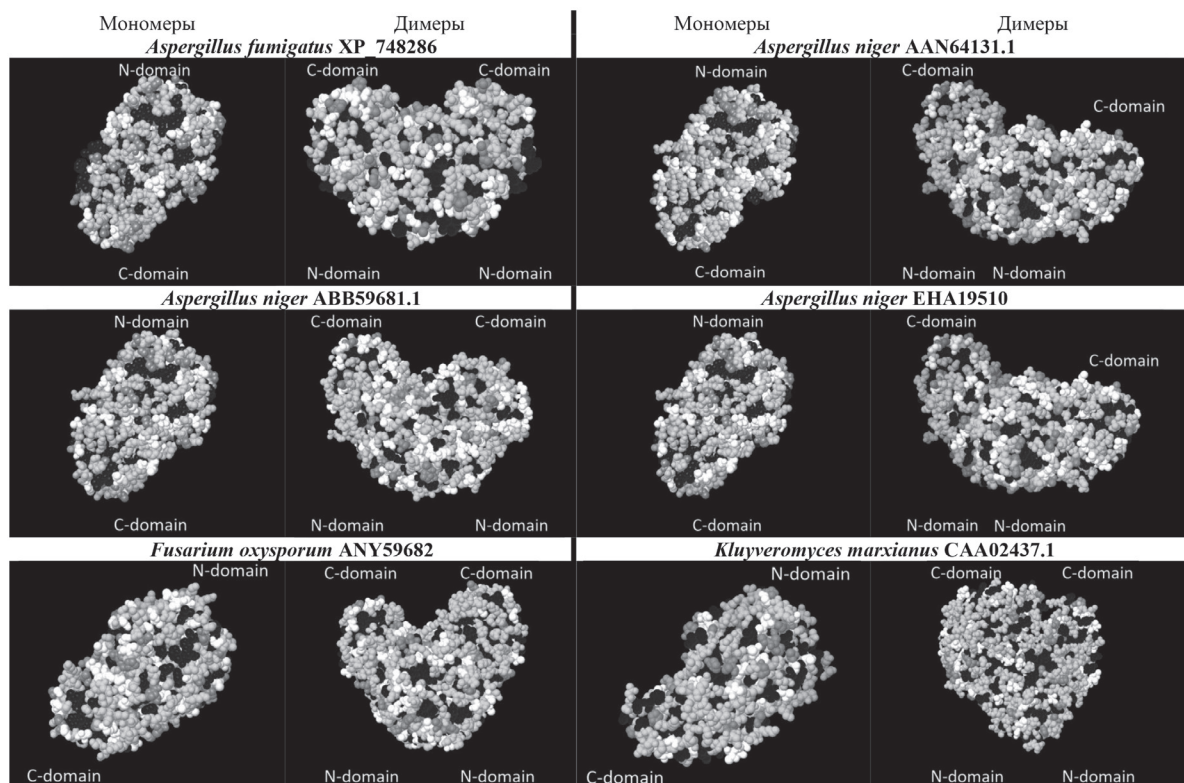


Рис. 5. Гидрофобные аминокислотные остатки на поверхности молекул мономеров и димеров эндоинулиаз (цветами черный→темно-серый→белый выделены гидрофобные аминокислотные остатки в порядке уменьшения гидрофобности)

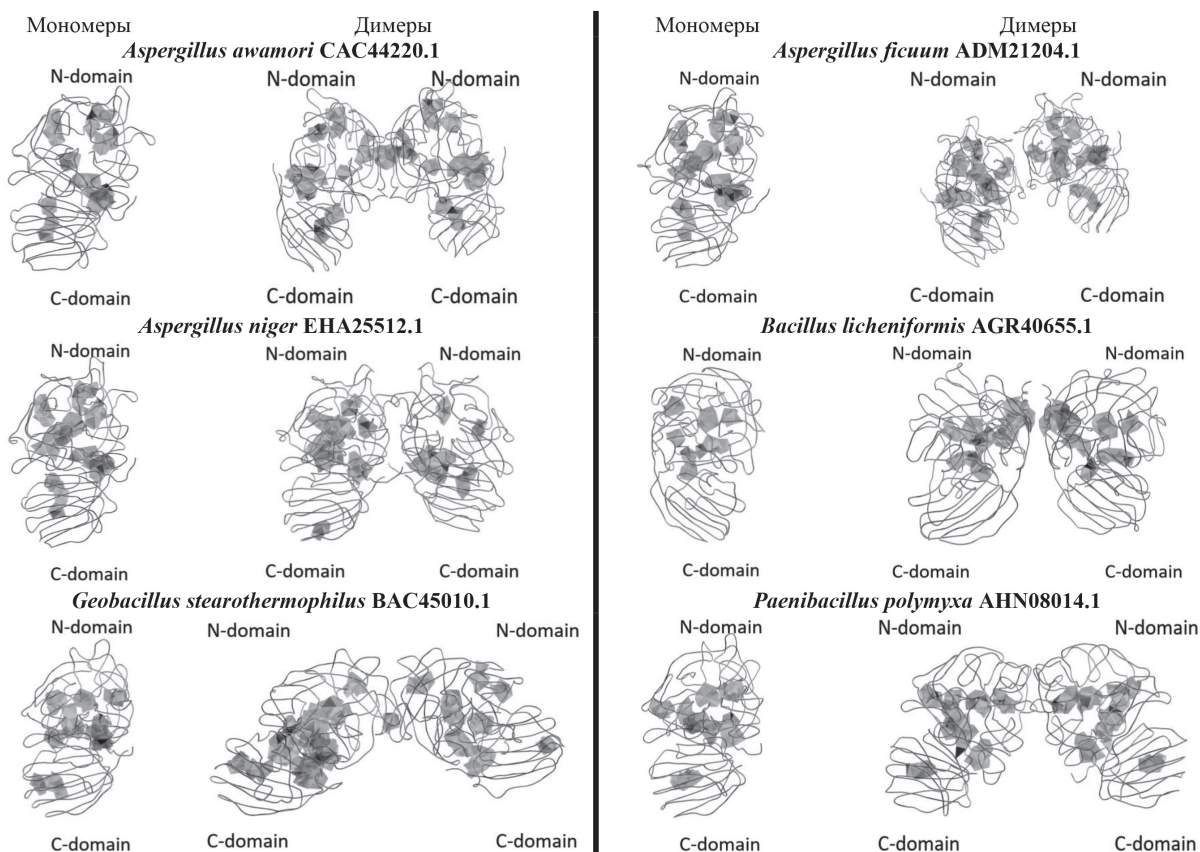


Рис. 6. Внутренние полости в молекулах мономеров и димеров экзоинулиаз

в одной субъединице, в другой форме инулиназы из указанного продуцента (ЕНА19510) данные структуры образуются в обеих субъединицах. Количество внутренних полостей уменьшилось в одной субъединице в молекуле эндоинулиназы из *F. oxysporum* (ANY59682), в двух субъединицах димера из *A. fumigatus* (XP_748286) (рис.7).

Количество туннелей в мономерах экзоинулиназ составляет 6 для фермента из *A. awamori* (САС44220.1), 7 для энзимов из *A. ficuum* (ADM21204.1) и *A. niger* (ЕНА25512.1), 8, 13 и 17 для инулиназ из *P. polymyxa* (АНН08014.1), *G. stearotherophilus* (ВАС45010.1) и *B. licheniformis* (AGR40655.1) соответственно. В мономерах экзоинулиназ из продуцентов рода *Aspergillus* обнаруживаются 2 идентичных туннеля. Кроме того, в молекулах ферментов из *A. ficuum* (ADM21204.1) и *A. niger* (ЕНА25512.1) имеются ещё 4 идентичных туннеля, отсутствующих в мономере из *A. awamori* (САС44220.1) (рис. 8).

Количество туннелей в мономерах эндоинулиназ составляет 3 для двух форм эндоинулиназ из *A. niger* (АВВ59681.1, ЕНА19510.1), 8 для ферментов из *A. niger* (ААН64131.1) и *F. oxysporum* (ANY59682), 13 и 20 для инулиназ из *A. fumigatus* (XP_748286) и *K. marxianus* (САА02437.1) соот-

ветственно. Туннели, имеющиеся в мономерах двух форм эндоинулиназ из *A. niger* (АВВ59681.1, ЕНА19510.1), имеют сходную локализацию, однако, отличаются по своей структуре (рис. 9).

Структура и локализация пор в молекулах мономеров и димеров экзо- и эндоинулиназ представлены на рис. 10 и 11.

Все туннели, имеющиеся в мономере экзоинулиназы из *A. awamori* (САС44220.1), без структурных изменений переходят в субъединицы димера. Также в результате димеризации в области контакта субъединиц образуются ещё 2 парных туннеля (рис. 12).

Все туннели, имеющиеся в мономере экзоинулиназы из *A. ficuum* (ADM21204.1), без структурных изменений переходят в субъединицы димера. В результате димеризации образуются ещё 2 туннеля, один из которых располагается в области контакта субъединиц, второй – в одной из субъединиц (рис. 13).

При формировании димера экзоинулиназы из *A. niger* (ЕНА25512.1) в одну из субъединиц с некоторыми структурными изменениями перешел один туннель; 4 туннеля частично или полностью вошли в состав других туннелей, вероятно, образовавшихся в результате конформационных перестроек субъ-

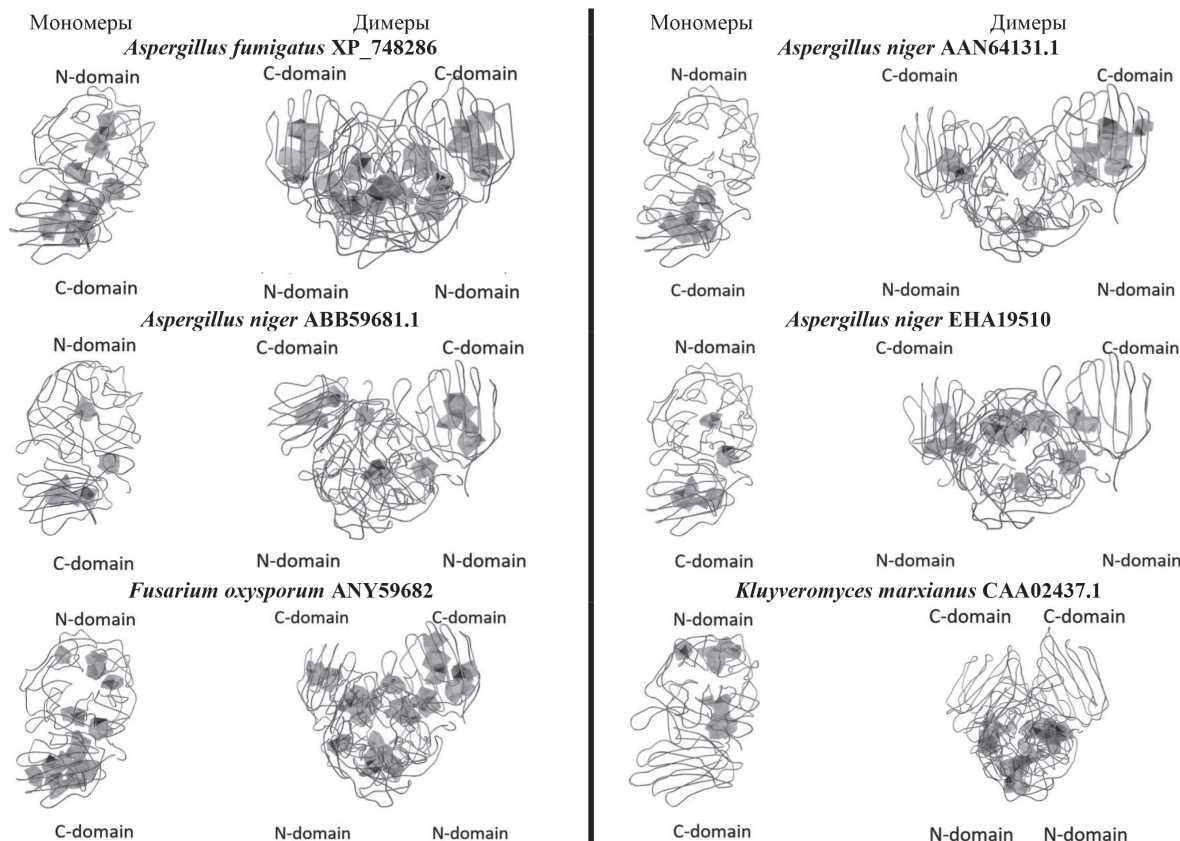


Рис. 7. Внутренние полости в молекулах мономеров и димеров эндоинулиназ

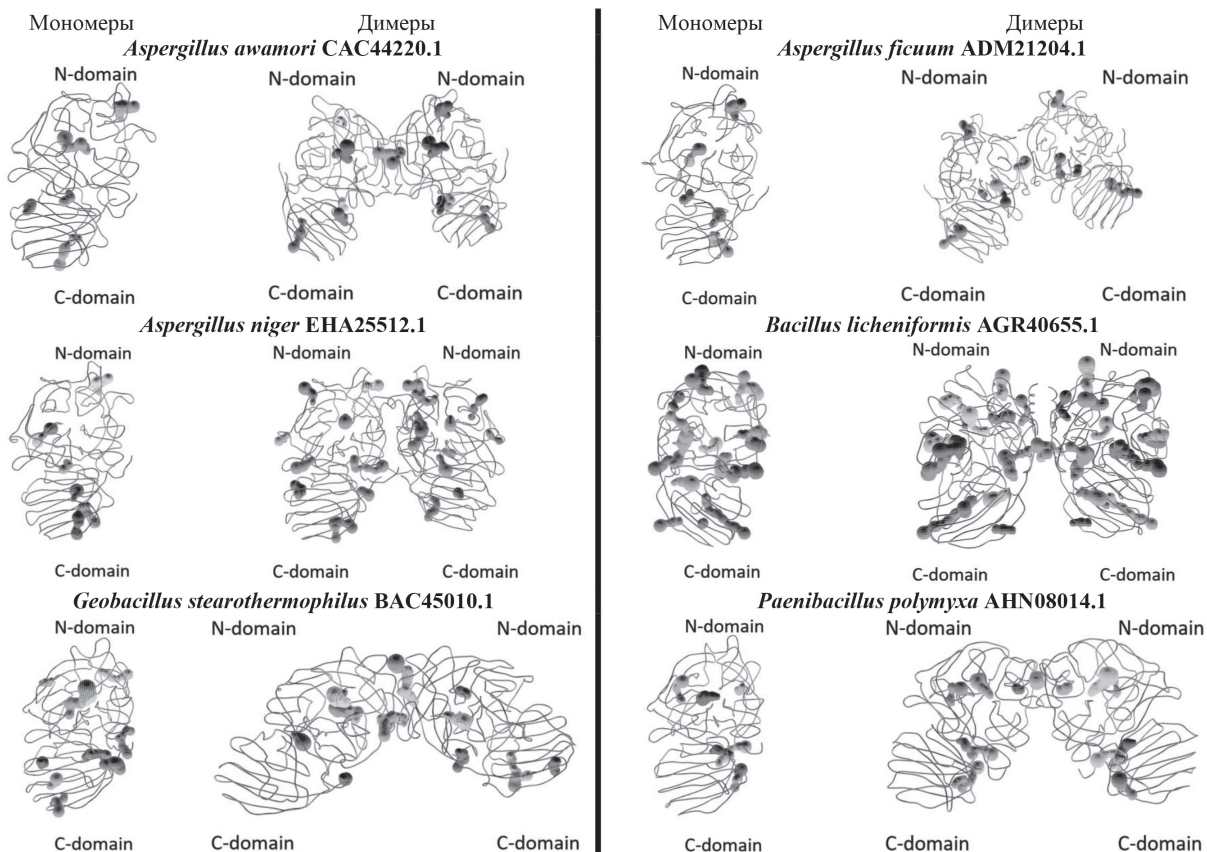


Рис. 8. Туннели в молекулах мономеров и димеров экзоинулиназ

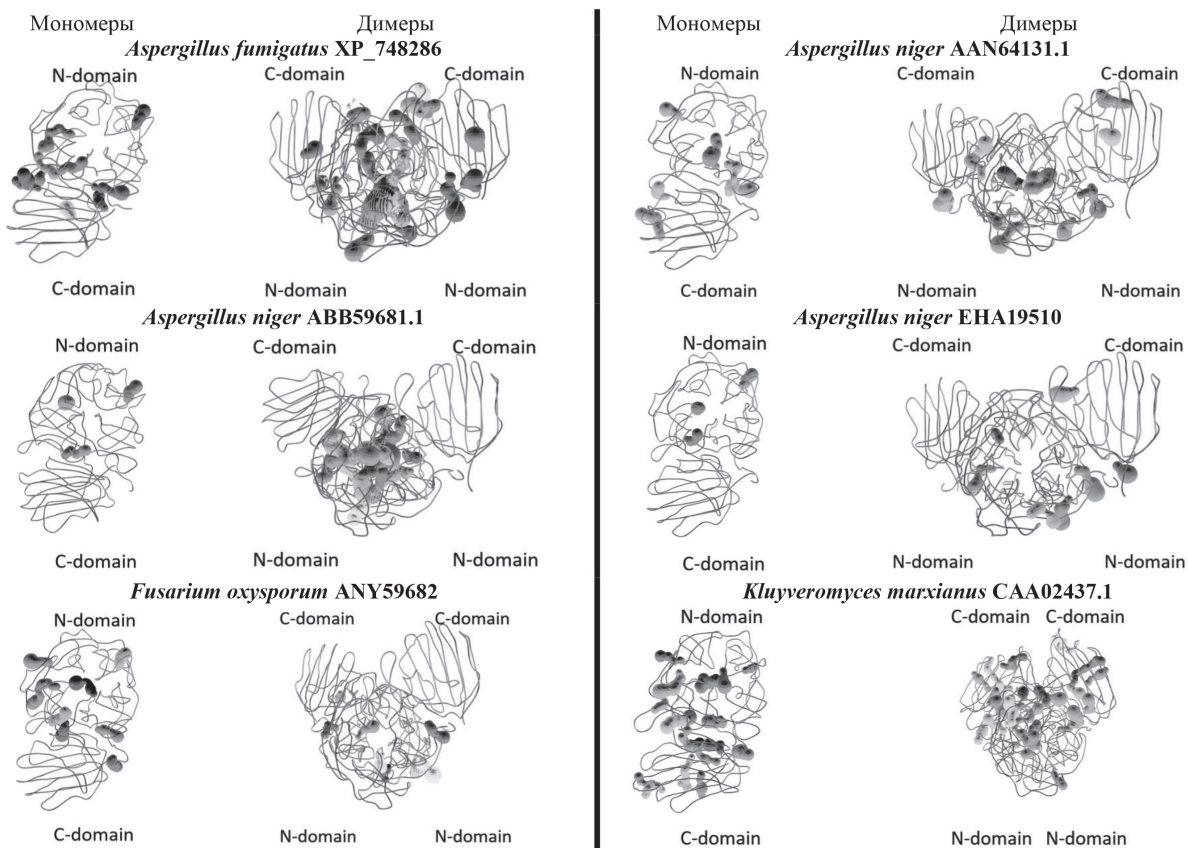


Рис. 9. Туннели в молекулах мономеров и димеров эндоинулиназ

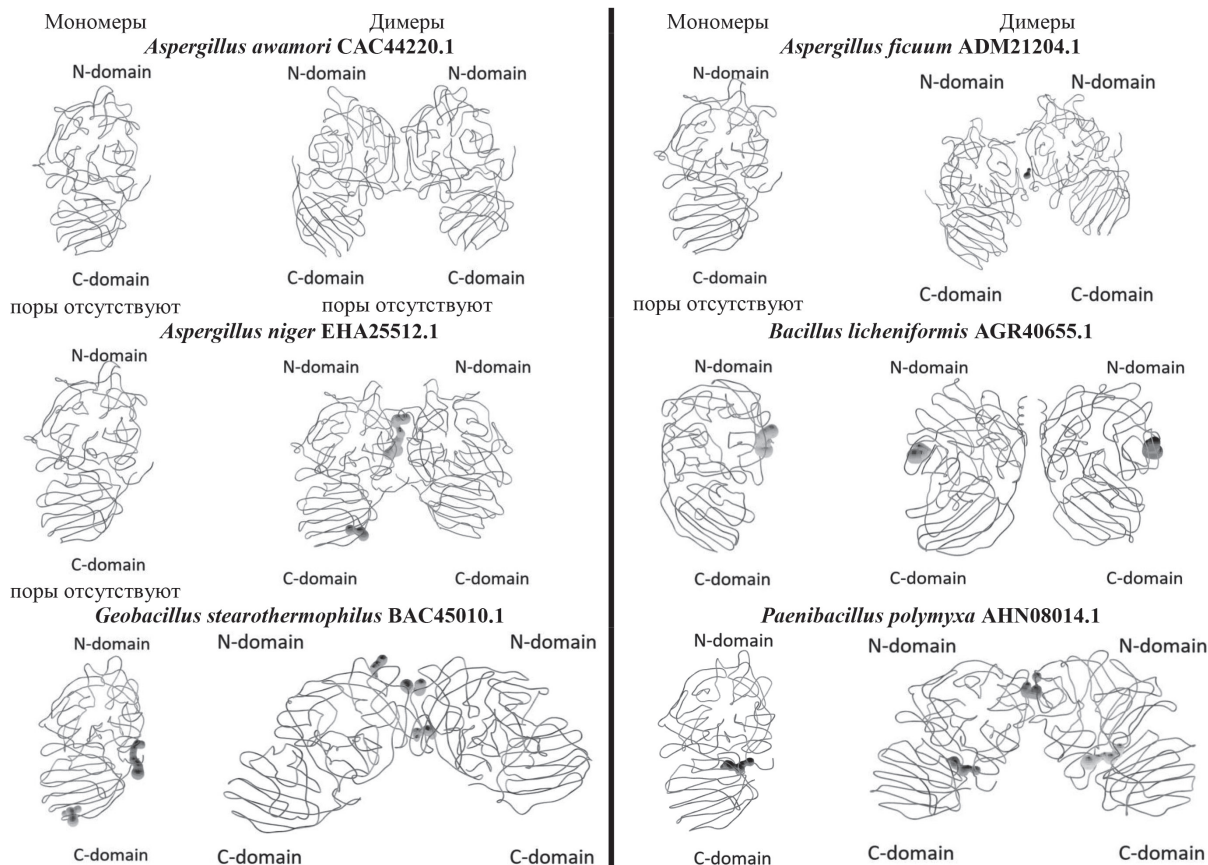


Рис. 10. Поры в молекулах мономеров и димеров экзоинулиназ

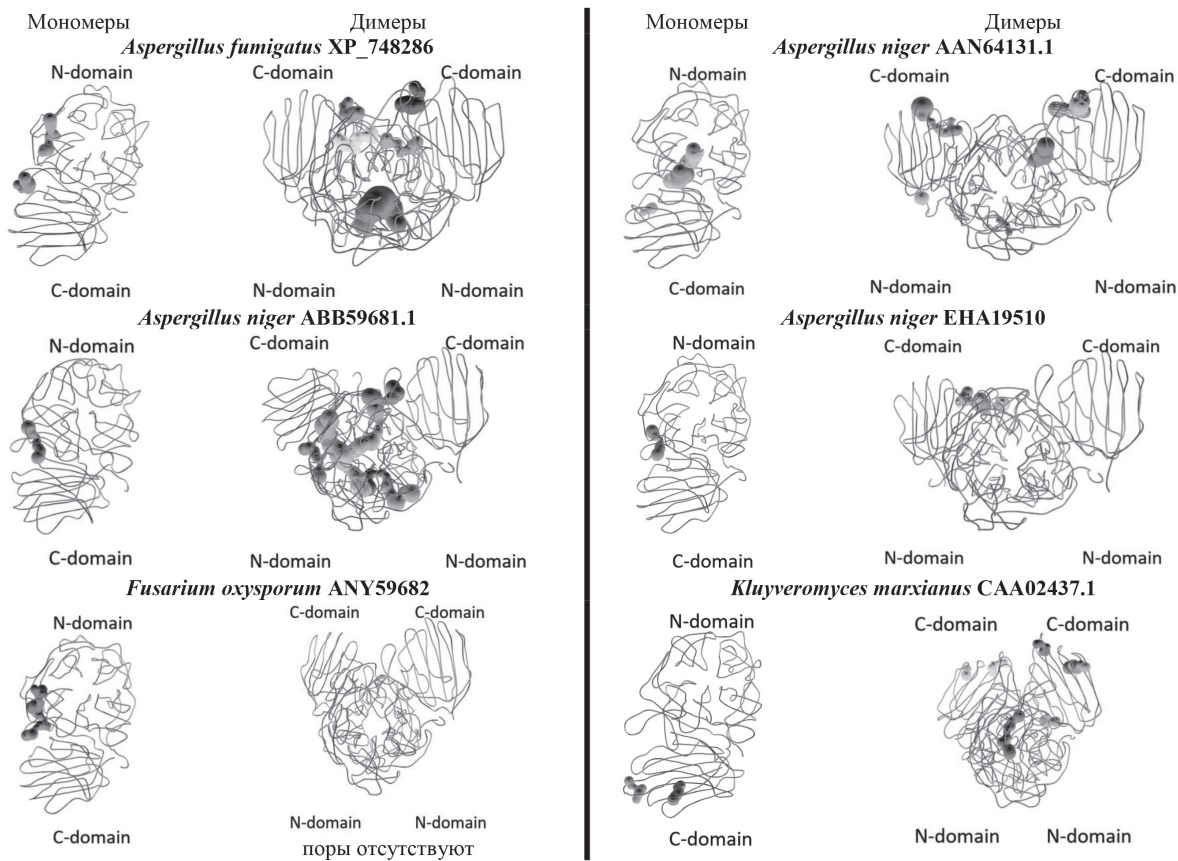


Рис. 11. Поры в молекулах мономеров и димеров эндоинулиназ

А. Туннели, встречающиеся только в составе субъединиц димера экзоинулиназы из *A. awamori* (CAC44220.1) (парные)



Б. Туннели, встречающиеся в составе мономера и димера экзоинулиназы из *A. awamori* (CAC44220.1)

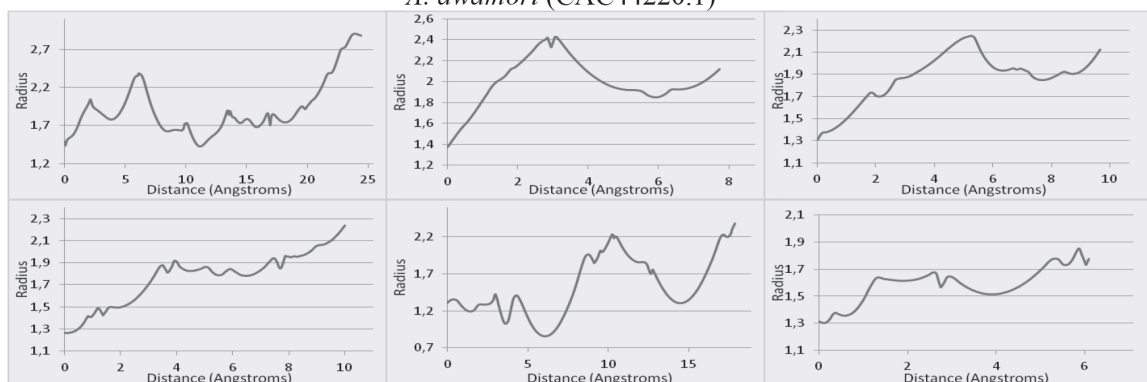
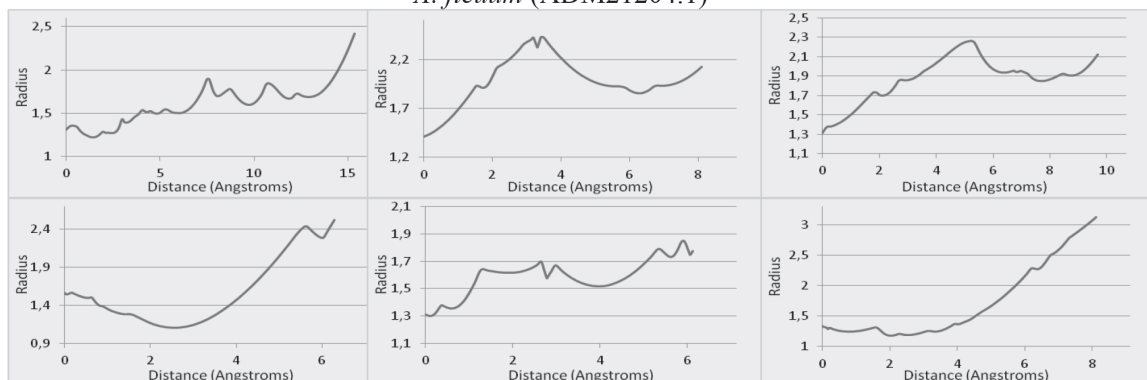


Рис. 12. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (CAC44220.1)

А. Туннели, встречающиеся в составе мономера и димера экзоинулиназы из *A. ficuum* (ADM21204.1)



Б. Туннели, встречающиеся только в составе субъединиц димера экзоинулиназы из *A. ficuum* (ADM21204.1)

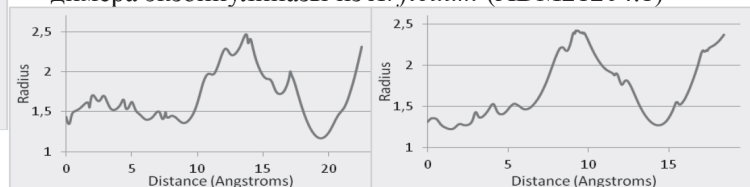


Рис. 13. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (ADM21204.1)

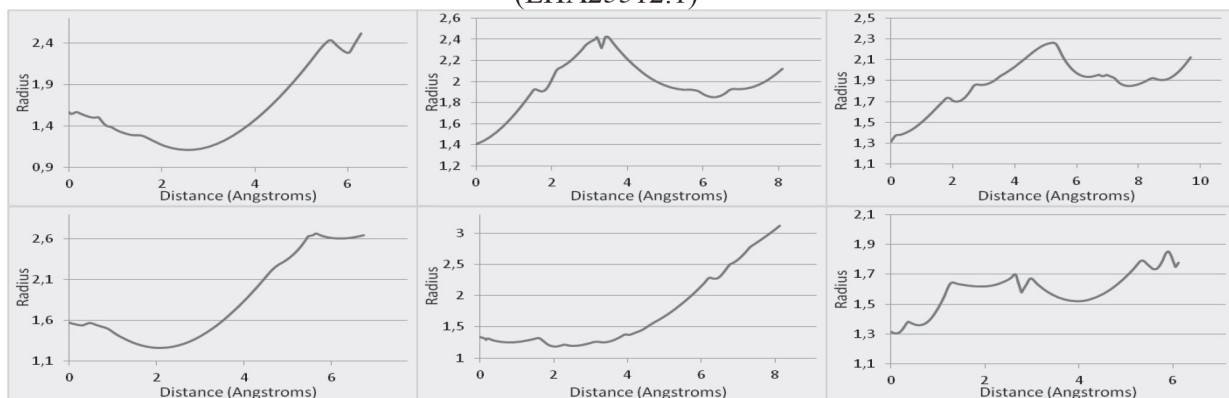
единиц. Кроме них, в составе димера зафиксировано наличие еще 18 непарных туннелей (рис. 14).

В состав субъединиц димера экзоинулиназы из *B. licheniformis* (AGR40655.1) без структурных изменений перешли 16 туннелей, присутствовавших в мономере фермента. Один туннель вошел в состав новых парных туннелей, образовавшихся в области контакта субъединиц. Кроме того, в

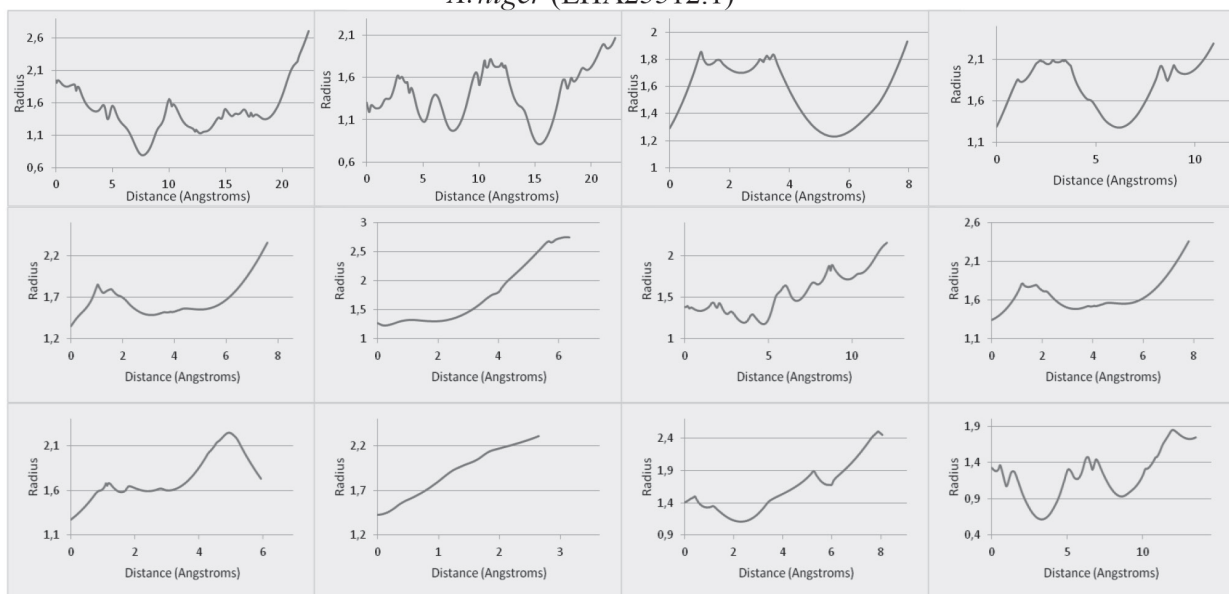
димере обнаруживается один туннель, отсутствовавший в составе мономера (рис. 15).

Туннели, имеющиеся в мономере экзоинулиназы из *G. stearothermophilus* (BAC45010.1), либо не переходят в состав субъединиц димера, либо претерпевают значительные структурные изменения. В области контакта субъединиц димера формируются 4 новых туннеля (рис. 16).

А. Туннели, встречающиеся только в составе мономера экзоинулиазы из *A. niger* (ЕНА25512.1)



Б. Туннели, встречающиеся только в составе субъединиц димера экзоинулиазы из *A. niger* (ЕНА25512.1)



(Парный)

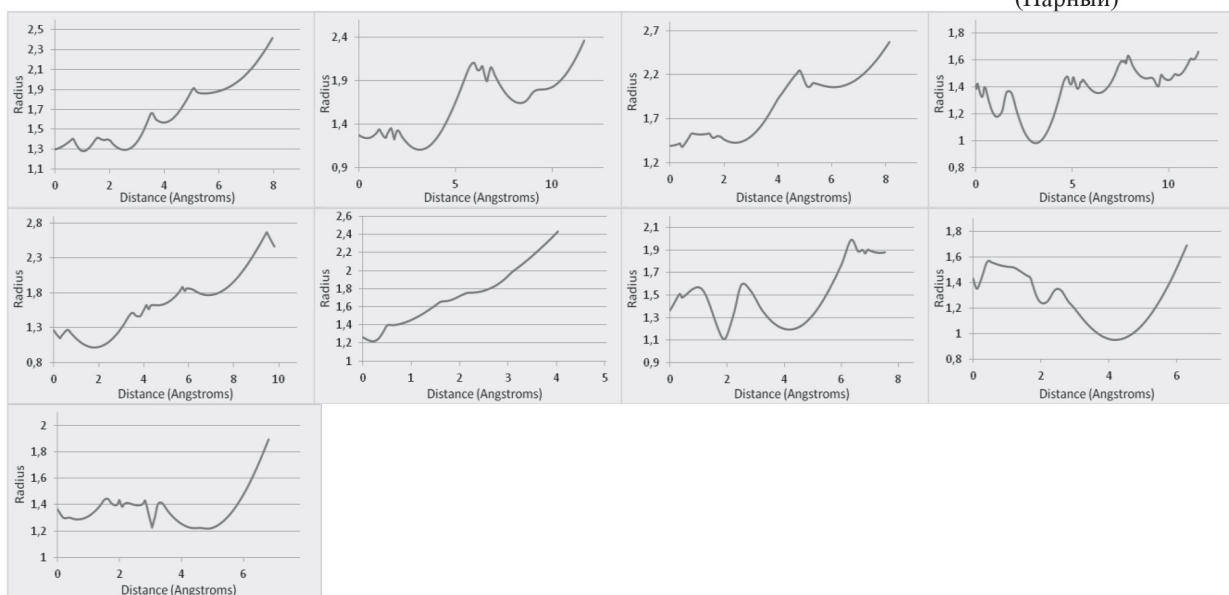


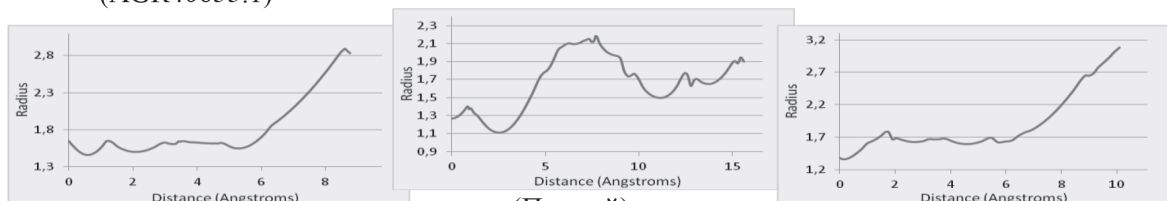
Рис. 14. Зависимость радиуса туннелей (\AA) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиазы из *Aspergillus niger* (ЕНА25512.1)

В результате образования димерного комплекса все туннели, имеющиеся в составе мономера экзоинулиназы из *P. rolyta* (AHN08014.1), без значительных структурных изменений переходят в состав субъединиц димера. Кроме того, в области контакта формируются 2 новых туннеля (рис. 17).

После димеризации 10 туннелей, присутствующих в мономере эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286), без изменений переходят в обе субъединицы димера, еще один туннель – только в одну субъединицу. В области контакта субъединиц фиксируется наличие 4 крупных парных туннелей (рис. 18).

А. Туннель, встречающийся только в составе мономера экзоинулиназы из *B. licheniformis* (AGR40655.1)

Б. Туннели, встречающиеся только в составе субъединиц димера экзоинулиназы из *B. licheniformis* (AGR40655.1)



(Парный)

В. Туннели, встречающиеся в составе мономера и димера экзоинулиназы из *B. licheniformis* (AGR40655.1)

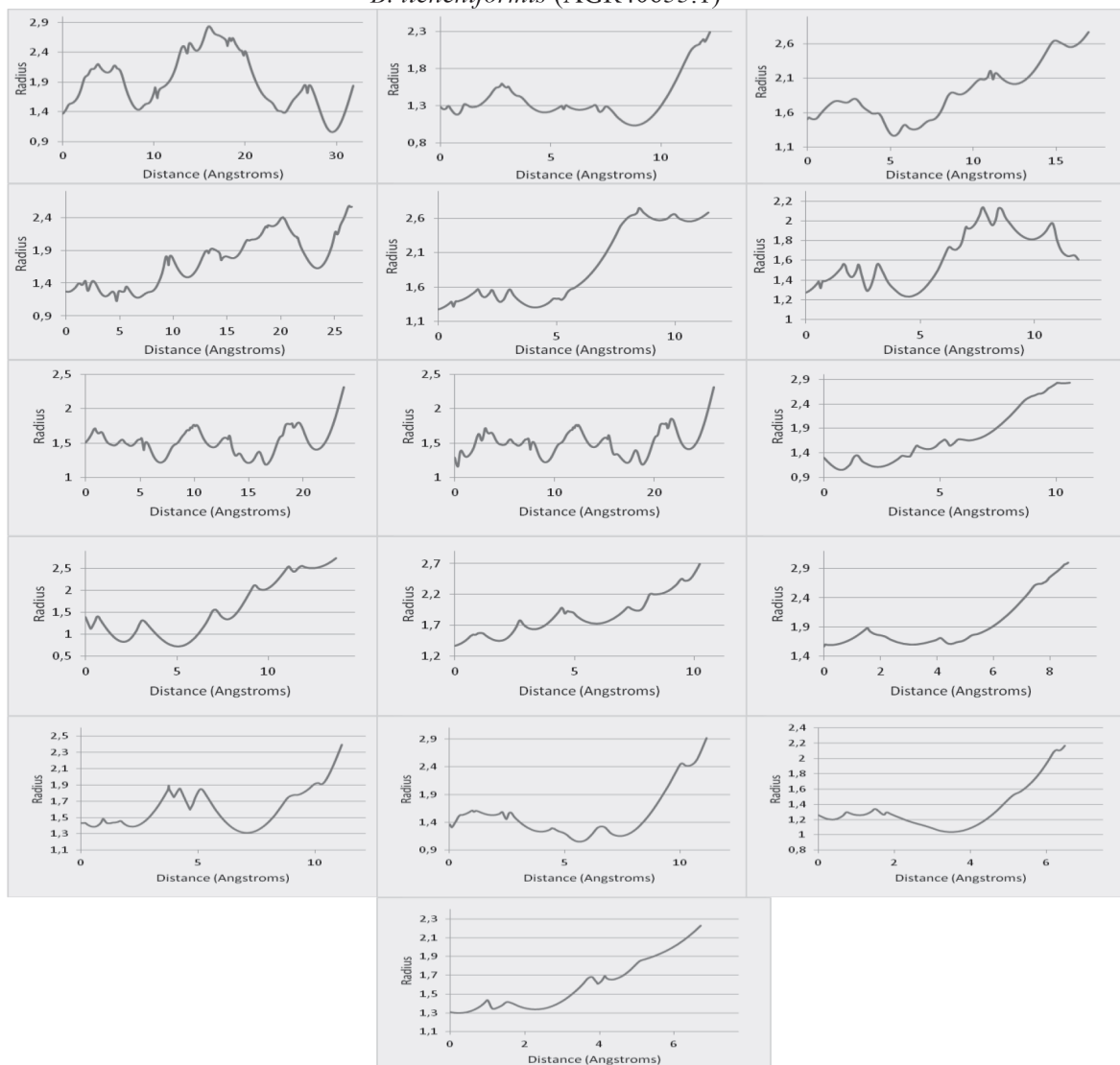
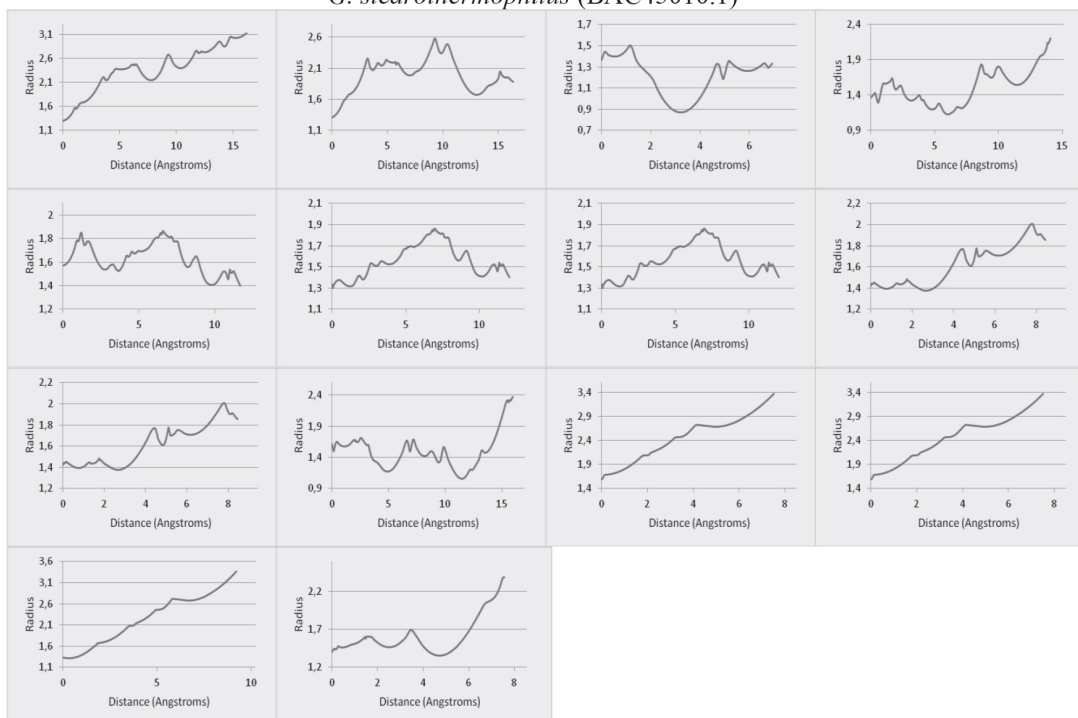


Рис. 15. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиназы из *Bacillus licheniformis* (AGR40655.1)

А. Туннели, встречающиеся только в составе мономера экзинулиназы из *G. stearotherophilus* (BAC45010.1)



Б. Туннели, встречающиеся только в составе субъединиц димера экзинулиназы из *G. stearotherophilus* (BAC45010.1)

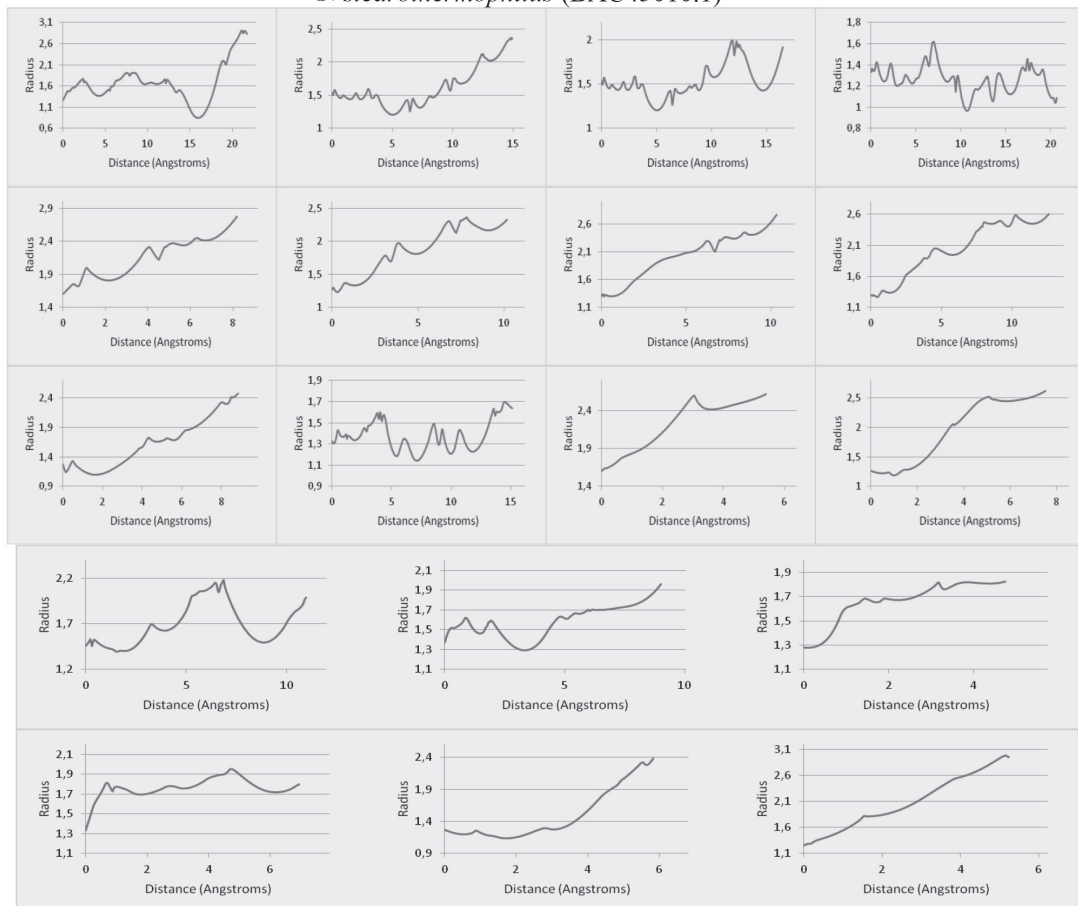
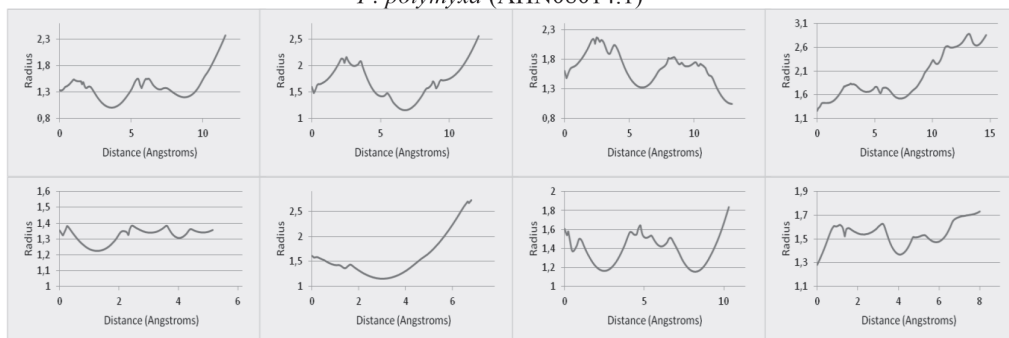


Рис. 16. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзинулиназы *Geobacillus stearotherophilus* (BAC45010.1)

А. Туннели, встречающиеся в составе мономера и димера экзоинулиназы из *P. polytuxa* (AHN08014.1)



Б. Туннель, встречающийся только в составе мономера экзоинулиназы из *P. polytuxa* (AHN08014.1)

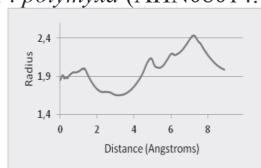
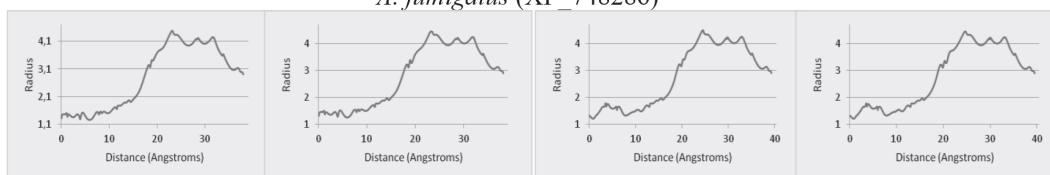
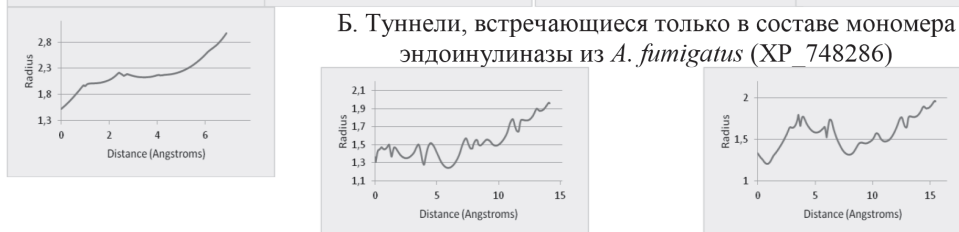


Рис. 17. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиназы *Paenibacillus polytuxa* (AHN08014.1)

А. Туннели, встречающиеся только в составе димера эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286)



Б. Туннели, встречающиеся только в составе мономера эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286)



В. Туннели, встречающиеся в составе мономера и димера эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286)

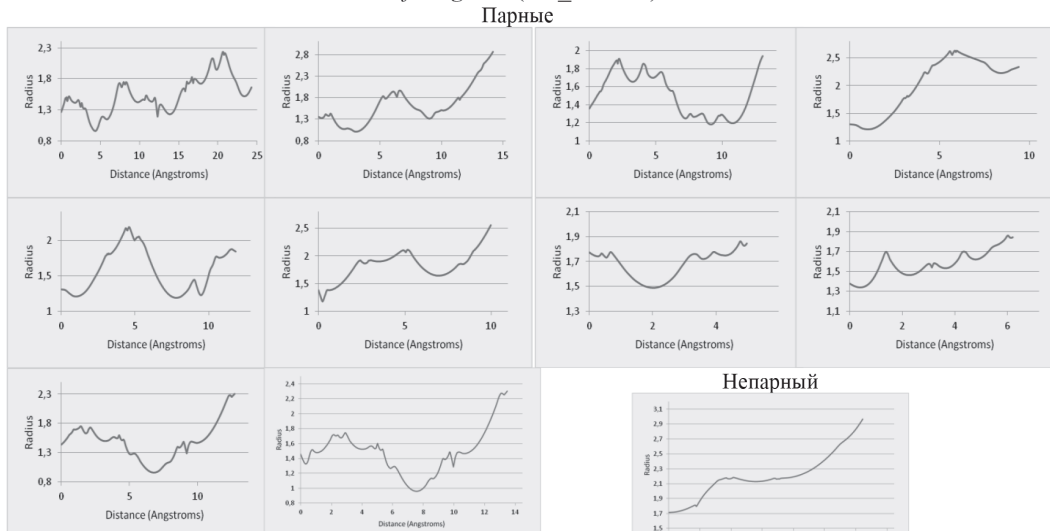


Рис. 18. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиназы *Aspergillus fumigatus* (XP_748286)

Туннели, имеющиеся в мономере эндоулиназы из *A. niger* (AAN64131.1), либо не переходят в состав субъединиц димера, либо претерпевают значительные структурные изменения (рис. 19).

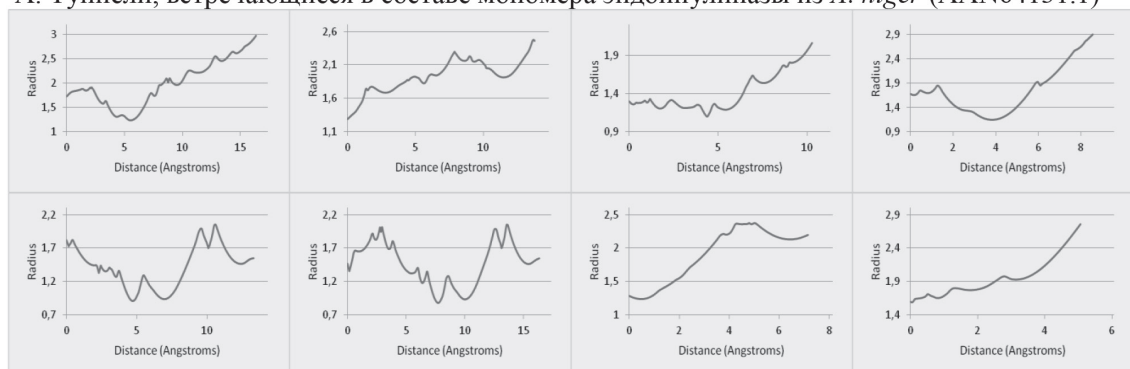
При формировании димера один туннель, присутствовавший в составе мономера эндоулиназы из *A. niger* (ABB59681.1), без структурных изменений переходит в обе субъединицы комплекса: два оставшихся туннеля переходят в разные субъединицы. В области контакта формируются 11 туннелей (рис. 20).

Туннели, имеющиеся в мономере эндоулиназы из *A. niger* (ЕНА19510), либо не переходят в состав субъединиц димера, либо претерпевают значительные структурные изменения. В области контакта субъединиц не формируются новые туннели (рис. 21).

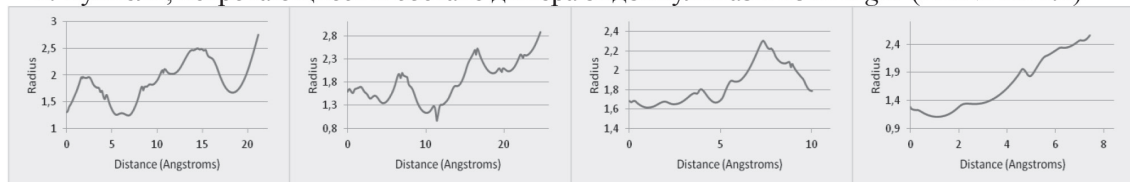
Туннели, имеющиеся в мономере эндоулиназы из *F. oxysporum* (ANY59682), либо не переходят в состав субъединиц димера, либо претерпевают значительные структурные изменения. Количество туннелей в субъединицах комплекса уменьшается по сравнению с таковым для мономера (рис. 22).

При формировании димера 12 туннелей, присутствовавших в составе мономера эндоулиназы из *K. marxianus* (САА02437.1), без структурных изменений переходит в обе субъединицы комплекса; 6 оставшихся туннеля переходят в разные субъединицы. В области контакта обнаруживаются 3 туннеля. Количество туннелей в субъединицах комплекса уменьшается по сравнению с таковым для мономера (рис. 23).

А. Туннели, встречающиеся в составе мономера эндоулиназы из *A. niger* (AAN64131.1)



Б. Туннели, встречающиеся в составе димера эндоулиназы из *A. niger* (AAN64131.1)



(Парный)

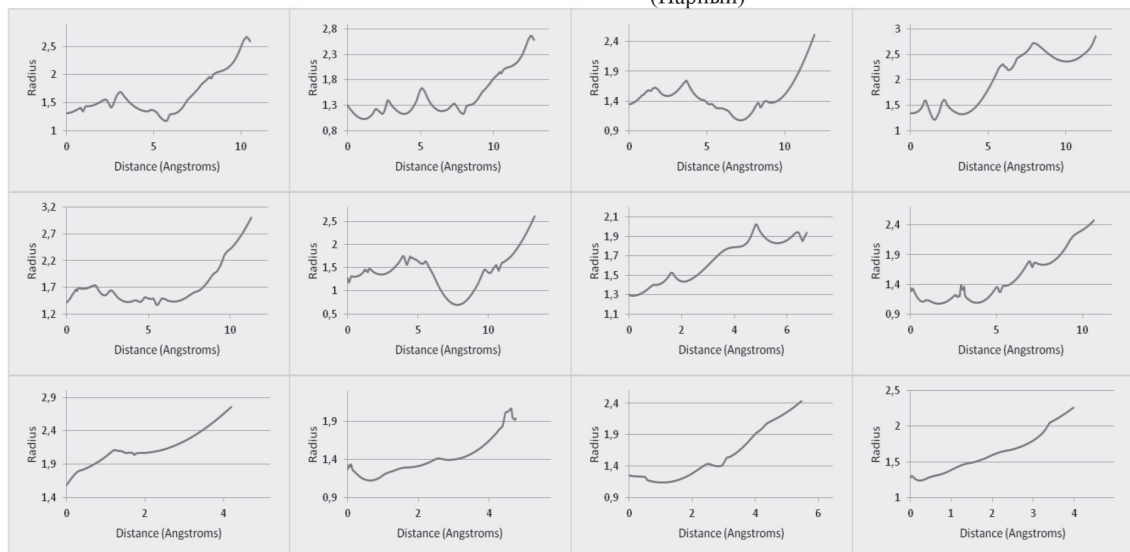
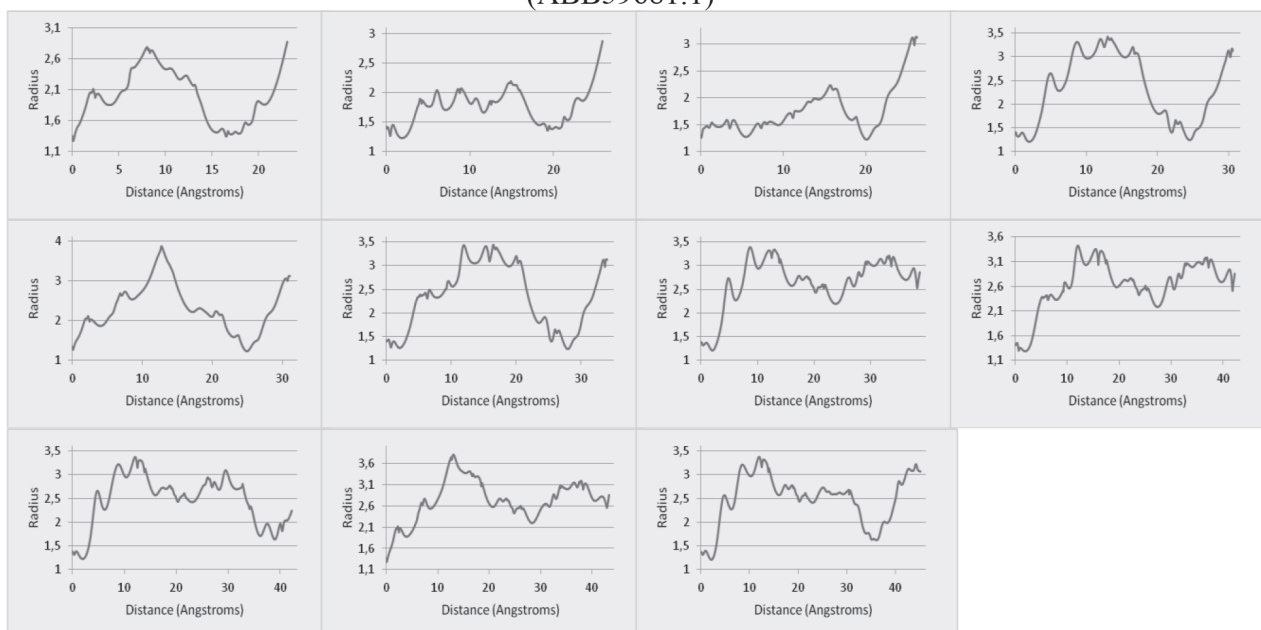
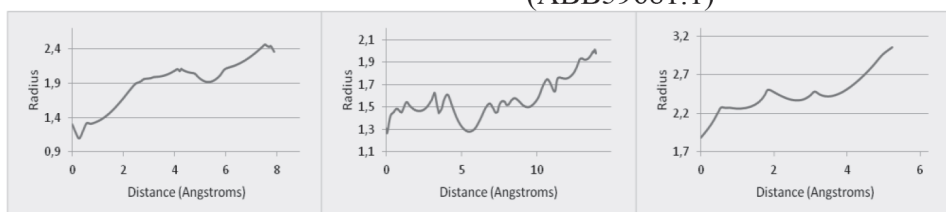


Рис. 19. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоулиназы *Aspergillus niger* (AAN64131.1)

А. Туннели, встречающиеся только в составе димера эндоинулиназы из *A. niger* (ABB59681.1)



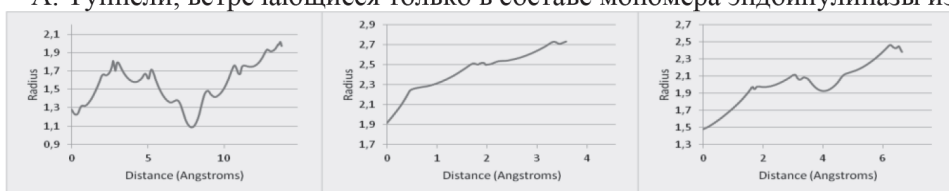
Б. Туннели, встречающиеся в составе мономера и димера эндоинулиназы из *A. niger* (ABB59681.1)



(Парный)

Рис. 20. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиназы *Aspergillus niger* (ABB59681.1)

А. Туннели, встречающиеся только в составе мономера эндоинулиназы из *A. niger* (ЕНА19510)



Б. Туннели, встречающиеся только в составе димера эндоинулиназы из *A. niger* (ЕНА19510)

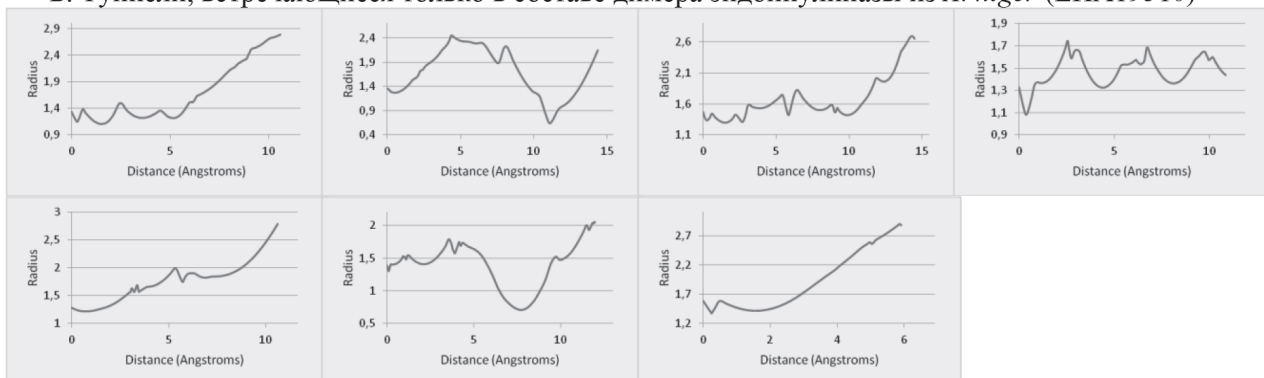


Рис. 21. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиназы *Aspergillus niger* (ЕНА19510)

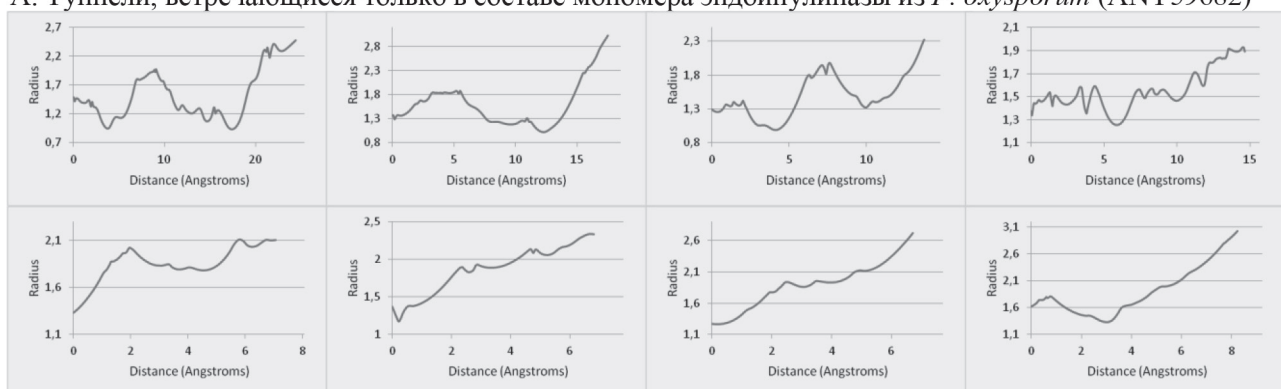
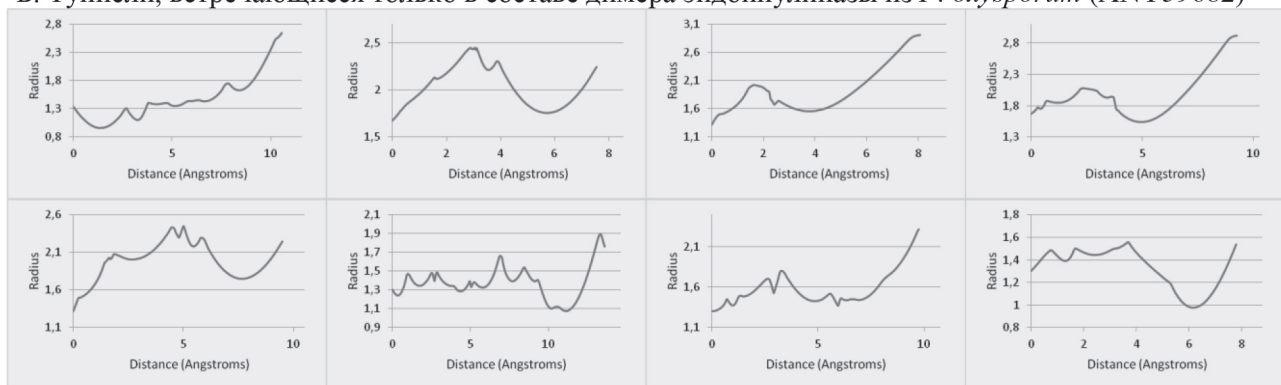
А. Туннели, встречающиеся только в составе мономера эндоинулиазы из *F. oxysporum* (ANY59682)Б. Туннели, встречающиеся только в составе димера эндоинулиазы из *F. oxysporum* (ANY59682)

Рис. 22. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиазы из *Fusarium oxysporum* (ANY59682)

Поры в экзоинулиазах из *A. ficuum* (ADM21204.1) и *A. niger* (ЕНА25512.1) присутствуют только в димерной форме в количестве 1 и 2 соответственно: в первом случае пора формируется только в области контакта субъединиц (рис. 24), во втором – образуется дополнительная пора в одной из субъединиц (рис. 25). В инулиназе из *A. awamori* (САС44220.1) поры отсутствуют как в димере, так и в мономере.

Мономеры экзоинулиаз из *B. licheniformis* (AGR40655.1) и *G. stearotherophilus* (ВАС45010.1) характеризуются наличием двух пор. Димеризация в первом случае приводит к переходу данных структур в субъединицы без изменений структуры, тогда как во втором случае поры либо претерпевают значительные структурные перестройки, либо не переходят в состав димера (рис. 26, 27).

В составе мономера экзоинулиазы из *P. polytuxa* (АНН08014.1) фиксируется наличие одной поры, которая после димеризации переходит в состав одной субъединицы без структурных изменений; во второй субъединице формируется новая пора. Кроме того, еще одна пора образуется в области контакта субъединиц (рис. 28).

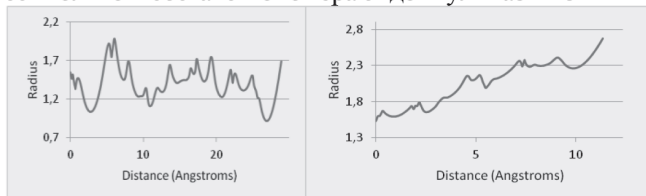
Мономеры эндоинулиаз из *A. fumigatus* (ХР_748286) и *K. marxianus* (САС02437.1) харак-

теризуются наличием двух пор (рис. 29, 30). В результате формирования димерного комплекса первого фермента только одна из пор переходит в состав субъединиц димера без изменения, тогда как в составе димера второго фермента переходят обе поры. Кроме того, в составе димера эндоинулиазы из *A. fumigatus* (ХР_748286) обнаруживаются ещё 2 поры, одна из которых парная, а другая находится в области контакта субъединиц. В структуре олигомера из *K. marxianus* (САС02437.1) присутствуют 5 пор, 3 из которых находятся в области контакта субъединиц.

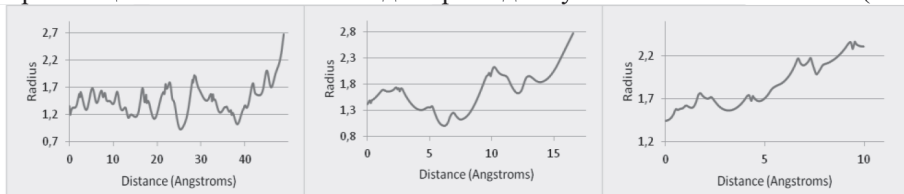
В составе мономеров двух форм эндоинулиаз из *A. niger* (АВВ59681.1, ЕНА19510.1) обнаруживается одна одинаковая пора. У первого из энзимов (АВВ59681.1) указанная структура присутствует в обеих субъединицах димера наряду с шестью новыми порами, образовавшимися в области контакта субъединиц. Однако в составе димера второго фермента (ЕНА19510.1) поры детектируются в составе только одной субъединицы, причем пора, наличие которой фиксировалось в мономере, отсутствует в составе комплекса (рис. 31, 32).

Поры, присутствующие в составе мономера третьей формы эндоинулиазы из *A. niger* (ААН64131.1), либо не переходят в состав диме-

А. Туннели, встречающиеся только в составе мономера эндоинулиназы из *K. marxianus* (САА02437.1)

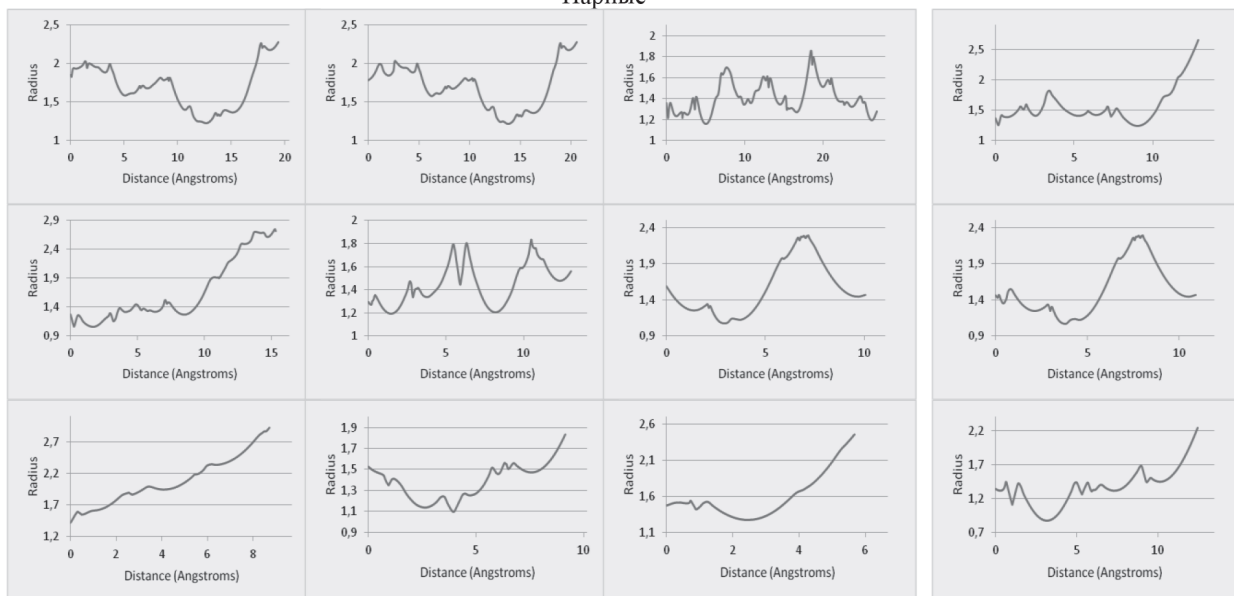


Б. Туннели, встречающиеся только в составе димера эндоинулиназы из *K. marxianus* (САА02437.1)



В. Туннели, встречающиеся в составе мономера и димера эндоинулиназы из *K. marxianus* (САА02437.1)

Парные



Непарные

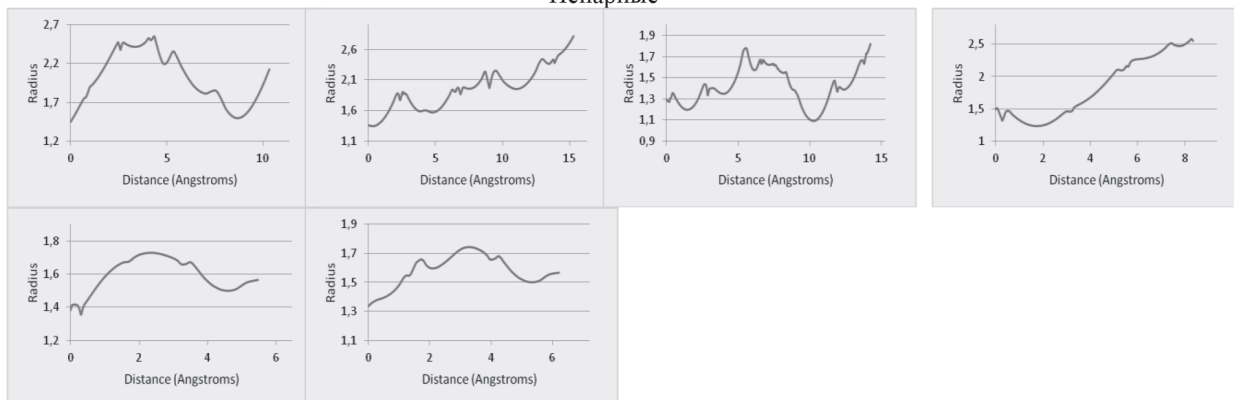


Рис. 23. Зависимость радиуса туннелей (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (САА02437.1)

ра, либо переходят со значительными структурными изменениями. В субъединицах комплекса регистрируется меньшее количество пор, чем в составе мономера (рис. 33).

В составе мономера эндоинулиназы из *F. oxysporum* (ANY59682) присутствуют 3 поры, однако, в субъединицах димера данного фермента они не обнаруживаются (рис. 34).

В таблице представлены типы аминокислотных остатков в составе контактных площадок при образовании димера экзо и эндоинулиназ. Из расчетов следует, что количество неполярных и полярных незаряженных аминокислотных остат-

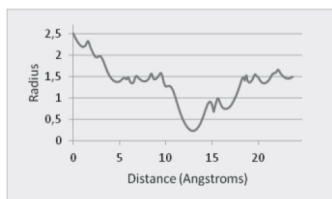


Рис. 24. Зависимость радиуса поры (Å) от степени удаления от её начальной точки в димерах экзоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (ADM21204.1)

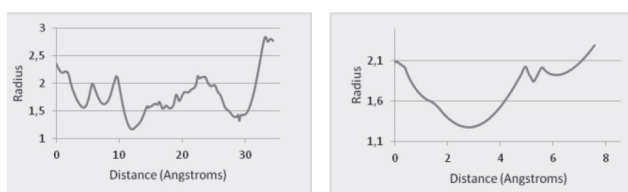


Рис. 25. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в димерах экзоинулиназы из *Aspergillus niger* (ENA25512.1)

ков, которые встречаются в составе контактных площадок (сайтов связывания) при формировании димера инулиназы, значительно выше, чем количество остатков, заряженных отрицательно и положительно (Приведенные результаты представляют собой анализ расчетов (среднее значение) по всем моделям, полученным в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock). В процессе димеризации инулиназы ключевая роль, вероятно, принадлежит неполярным аминокислотным остаткам, что хорошо согласуется с результатами ИК-спектроскопии, изложенными в нашей работе [24].

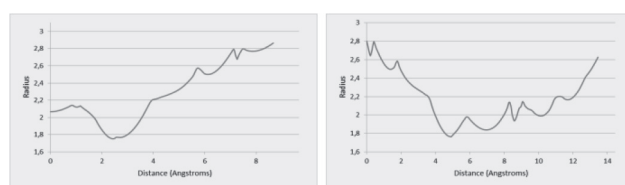


Рис. 26. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиназы из *Bacillus licheniformis* (AGR40655.1)

А. Поры, встречающиеся только в составе мономера экзоинулиназы из *G. stearothermophilus* (BAC45010.1)



Б. Поры, встречающиеся только в составе димера экзоинулиназы из *G. stearothermophilus* (BAC45010.1)

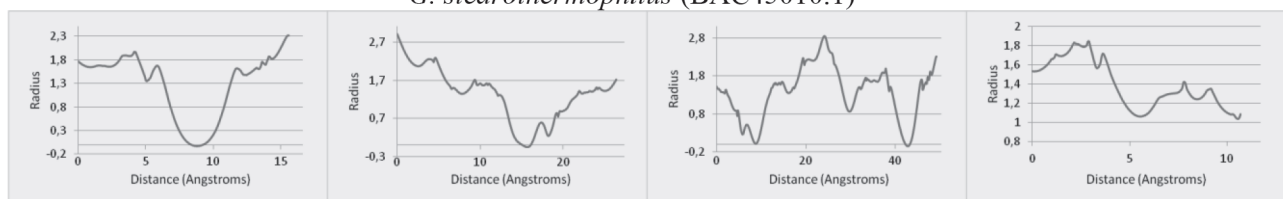
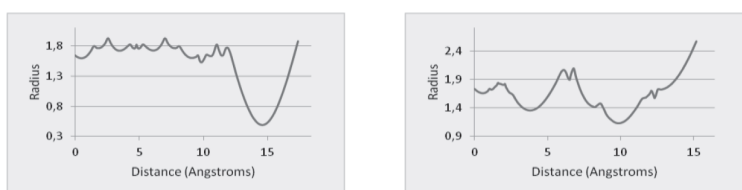


Рис. 27. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиназы из *Geobacillus stearothermophilus* (BAC45010.1)

А. Поры, встречающиеся только в составе димера экзоинулиназы из *P. polymyxa* (AHN08014.1)



Б. Пора, встречающаяся в составе мономера и димера экзоинулиназы из *P. polymyxa* (AHN08014.1)

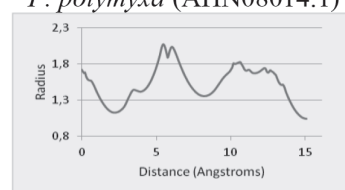


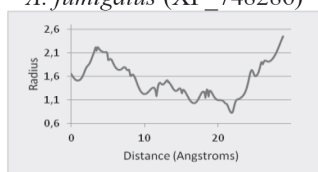
Рис. 28. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах экзоинулиназы из *Paenibacillus polymyxa* (AHN08014.1)

Таблица

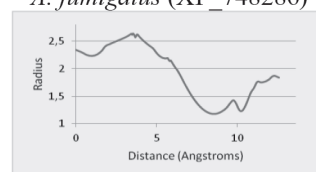
Аминокислотные остатки в составе контактных площадок при образовании димеров эндо- и экзоинулиназ

Экзо-инулиназы	<i>Aspergillus ficuum</i> ADM21204.1	<i>Aspergillus niger</i> EHA25512.1	<i>Aspergillus awamori</i> CAC44220.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> BAC45010.1	<i>Paenibacillus polymyxa</i> AHN08014.1	<i>Bacillus licheniformis</i> AGR40655.1
гидрофобные	38	50	40	34	38	31
незаряженные	43	36	40	34	30	20
отрицательно заряженные	13	9	15	23	20	29
положительно заряженные	7	5	5	9	12	20
Эндо-инулиназы	<i>Aspergillus niger</i> AAN64131.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> XP_748286.1	<i>Aspergillus niger</i> EHA19510.1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CAA02437.1	<i>Fusarium oxysporum</i> ANY59682.1	<i>Aspergillus niger</i> ABB59681.1
гидрофобные	31	44	30	44	39	32
незаряженные	45	39	45	38	45	45
отрицательно заряженные	17	10	17	10	12	17
положительно заряженные	7	7	8	8	4	8

А. Пора, встречающаяся только в составе мономера эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286)

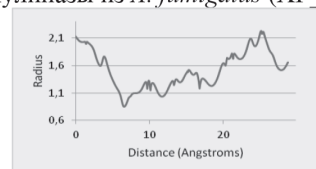
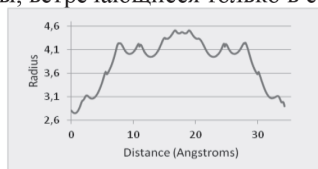


В. Пора, встречающаяся в составе мономера и димера эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286)



(В димере парная)

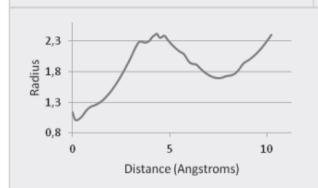
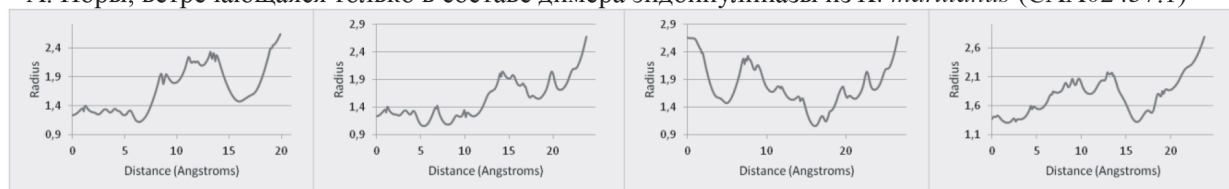
Б. Поры, встречающиеся только в составе димера эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286)



(Парная)

Рис. 29. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиназы из *Aspergillus fumigatus* (XP_748286)

А. Поры, встречающиеся только в составе димера эндоинулиназы из *K. marxianus* (CAA02437.1)



Б. Поры, встречающиеся в составе мономера и димера эндоинулиназы из *K. marxianus* (CAA02437.1) (в димере парные)

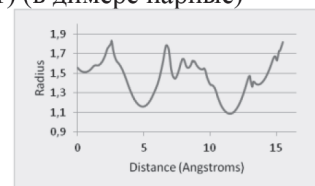
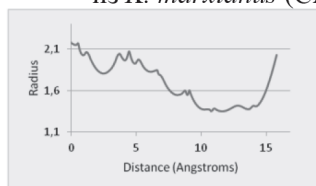
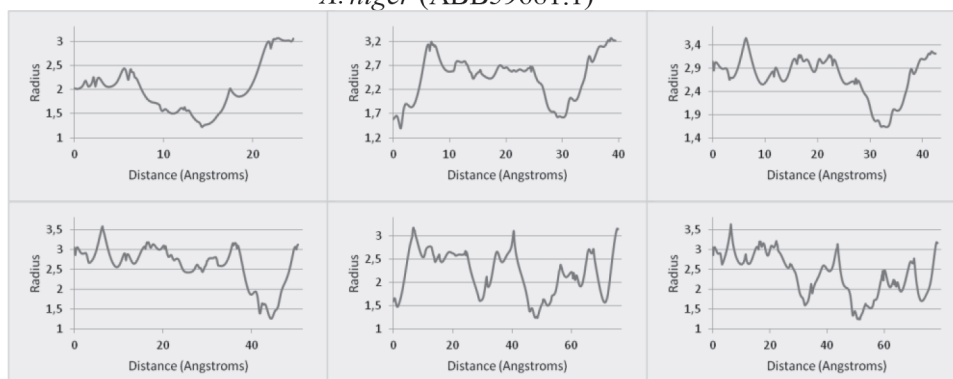


Рис. 30. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1)

А. Поры, встречающаяся только в составе димера эндоинулиазы из *A. niger* (ABB59681.1)



Б. Пора, встречающаяся в составе мономера и димера эндоинулиазы из *A. niger* (ABB59681.1) (в димере парная)

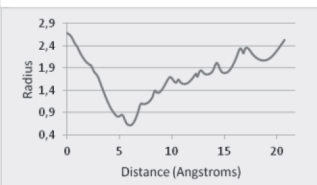
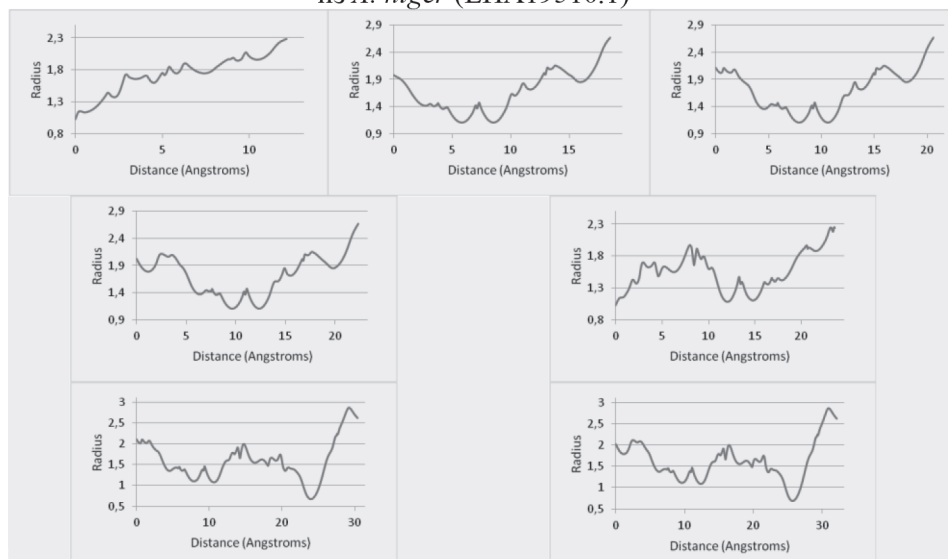


Рис. 31. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиазы из *Aspergillus niger* (ABB59681.1)

А. Поры, встречающаяся только в составе димера эндоинулиазы из *A. niger* (ЕНА19510.1)



Б. Пора, встречающаяся только в составе мономера эндоинулиазы из *A. niger* (ЕНА19510.1)

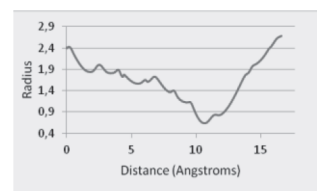


Рис. 32. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиазы из *Aspergillus niger* (ЕНА19510.1)

На рис. 35 приведен график, отражающий соотношение неполярных, полярных незаряженных, заряженных отрицательно и положительно аминокислотных остатков в составе сайтов связывания мономеров при формировании димерной молекулы. Отчетливо видно, что количество незаряженных остатков в области контакта мономеров выше у эндоинулиаз.

ключевая роль, по нашим данным, принадлежит неполярным аминокислотным остаткам, также возможно участие электростатических взаимодействий между мономерами молекул фермента. Количество незаряженных остатков, присутствующих в области контакта мономеров выше у эндоинулиаз, что, вероятно, и приводит к существенным отличиям их димеров от таковых экзоинулиаз.

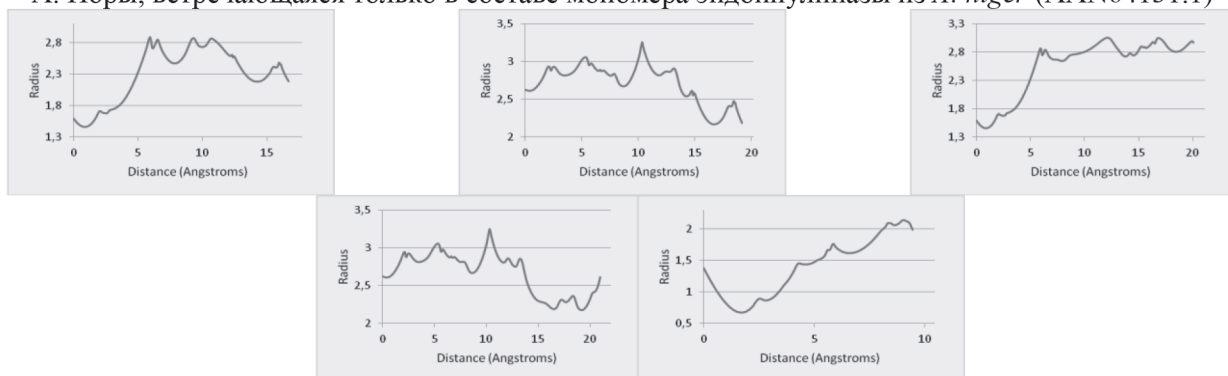
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая результаты приведенных в литературе работ и собственных экспериментов, можно констатировать, что молекулы экзо- и эндоинулиаз встречаются как в мономерной, так и в других (преимущественно димерных) формах. В процессе димеризации инулиазы при формировании контактных площадок

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ganaie M.A., Lateef A., Gupta U.S. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. Vol. 172, pp. 2143-2159.
2. Gupta, A.K., Kaur, M., Kaur, N., Singh, R. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1992. Vol. 5, pp. 293-296.
3. Hughes S.R., Qureshi N., López-Núñez, J.C., M.A. Jones, J.M. Jarodsky, L.Á. Galindo-Leva, M.R.

А. Поры, встречающаяся только в составе мономера эндоинулиназы из *A. niger* (AAN64131.1)



Б. Поры, встречающаяся только в составе димера эндоинулиназы из *A. niger* (AAN64131.1)

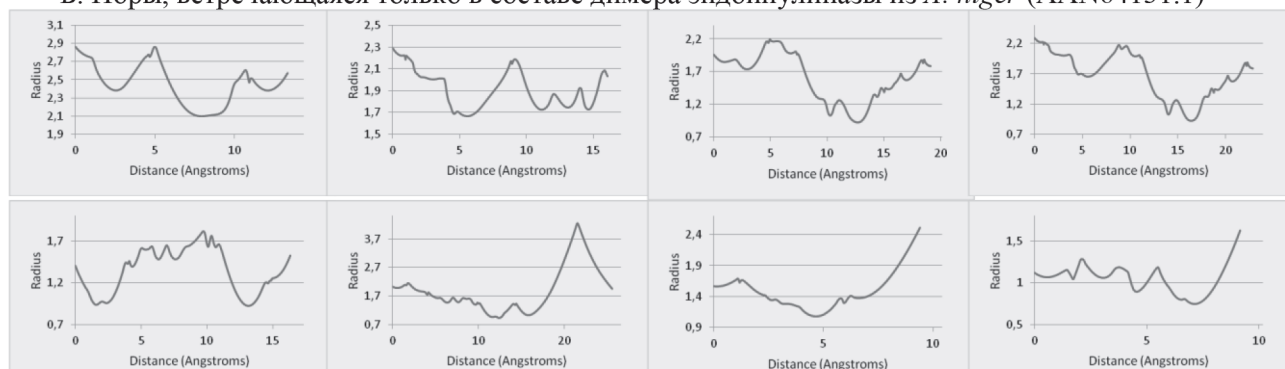


Рис. 33. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах и димерах эндоинулиназы из *Aspergillus niger* (AAN64131.1)

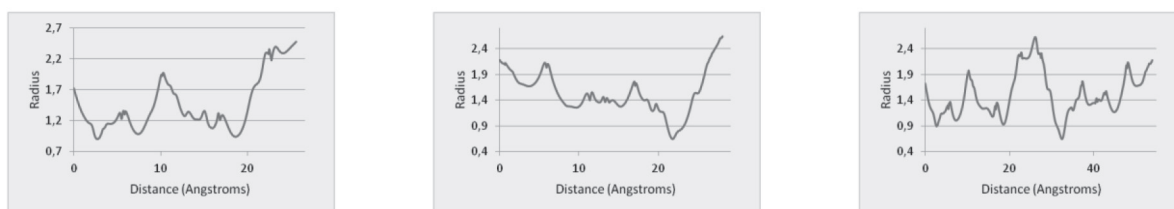


Рис. 34. Зависимость радиуса пор (Å) от степени удаления от их начальной точки в мономерах эндоинулиназы из *Fusarium oxysporum* (ANY59682)

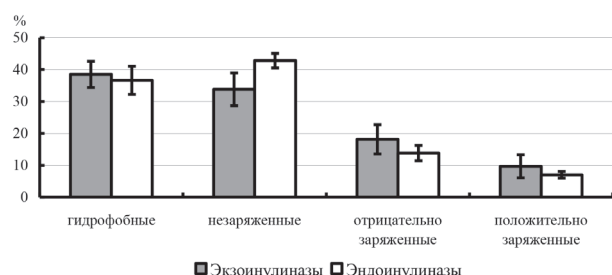


Рис. 35. Типы аминокислотных остатков в составе сайтов связывания мономеров при формировании димерной молекулы

Lindquist // World J. Microbiol. Biotechnol. 2017. Vol. 33, pp. 78.

4. Kango N., Jain S.C. // Food Biotechnology. 2011. Vol. 25, pp. 165-212.

5. Basso A., Spizzo P., Ferrario V., Knapic L., Savko N., Braiuca P., Ebert C., Ricca E., Calabrò V.,

Gardossi L. // Biotechnol. Prog. 2010. Vol. 26. № 2, pp. 397-405.

6. Nagem R.A., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Polikarpov I. // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 344. № 11, pp. 471-480.

7. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A. // Biocatalysis and Biotransformation. 2016. Vol. 34. № 1, pp. 1-17.

8. Singh R.S., Chauhan K. // Current Biotechnology. 2018. Vol. 7, pp. 242-260.

9. Neagu C., Bahrim G. // Innov. Rom. Food Biotechnol. 2011. Vol. 9, pp. 1-11.

10. Arand M., Golubev A.M., Neto B.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. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411111/>

nlm.nih.gov/protein/CAC44220.1 (дата обращения: 24.07.2018)

11. Chen X.-M., Xu X.-M., Jin Z.-Y. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADM21204.1> (date of the application: 24.07.2018)

12. Andersen M.R., Salazar M.P., Schaap P.J., van de Vondervoort P.J., Culley D., Thykaer J., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Albang R., Albermann K., Berka R.M., Braus G.H., Braus-Stromeier S.A., Corrochano L.M., Dai Z., van Dijck P.W., Hofmann G., Lasure L.L., Magnuson J.K., Menke H., Meijer M., Meijer S.L., Nielsen J.B., Nielsen M.L., van Ooyen A.J., Pel H.J., Poulsen L., Samson R.A., Stam H., Tsang A., van den Brink J.M., Atkins A., Aerts A., Shapiro H., Pangilinan J., Salamov A., Lou Y., Lindquist E., Lucas S., Grimwood J., Grigoriev I.V., Kubicek C.P., Martinez D., van Peij N.N., Roubos J.A., Nielsen J., Baker S.E. // *Genome Res.* 2011. Vol. 21(6), pp. 885-897.

13. Lu W.-D. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGR40655.1> (date of the application: 24.07.2018)

14. Tsujimoto Y., Watanabe A., Nakano K., Watanabe K., Matsui H., Tsuji K., Tsukihara T., Suzuki Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. Vol. 62(2-3), pp. 180-185.

15. Gao J., Xu Y.Y., Yang H.M., Xu H., Xue F., Li S., Feng X.H. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014. Vol. 173(6), pp. 1419-1430.

16. Nierman W.C., Pain A., Anderson M.J., Wortman J.R., Kim H.S., Arroyo J., Berriman M., Abe K., Archer D.B., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulsen R., Davies R., Dyer P.S., Farman M., Fedorova N., Fedorova N., Feldblyum T.V., Fischer R., Fosker N., Fraser A., García J.L., García M.J., Goble A., Goldman G.H., Gomi K., Griffith-Jones S., Gwilliam R., Haas B., Haas H., Harris D., Horiuchi H., Huang J., Humphray S., Jiménez J., Keller N., Khouri H., Kitamoto K., Kobayashi T., Konzack S., Kulkarni R., Kumagai T., Lafon A., Latgé J.P., Li W., Lord A., Lu C., Majoros W.H., May G.S., Miller B.L., Mohamoud Y., Molina M., Monod M., Mouyna I., Mulligan S., Murphy L., O'Neil S., Paulsen I., Peñalva M.A., Perlea M., Price C., Pritchard B.L., Quail M.A., Rabbinowitsch E., Rawlins N., Rajandream M.A., Reichard U., Renauld H., Robson G.D., Rodriguez de Córdoba S., Rodríguez-Peña J.M., Ronning C.M.,

Rutter S., Salzberg S.L., Sanchez M., Sánchez-Ferrero J.C., Saunders D., Seeger K., Squares R., Squares S., Takeuchi M., Tekaia F., Turner G., Vazquez de Aldana C.R., Weidman J., White O., Woodward J., Yu J.H., Fraser C., Galagan J.E., Asai K., Machida M., Hall N., Barrell B., Denning D.W. // *Nature.* 2005. Vol. 438(7071), pp. 1151-1156.

17. Wang J.-H., Teng D., Yao Y. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN64131.1> (date of the application: 24.07.2018)

18. Yuan X.L., Goosen C., Kools H., van der Maarel M.J., van den Hondel C.A., Dijkhuizen L., Ram A.F. // *Microbiology.* 2006. Vol. 152(10), pp. 3061-3073.

19. Andersen M.R., Salazar M.P., Schaap P.J., van de Vondervoort P.J., Culley D., Thykaer J., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Albang R., Albermann K., Berka R.M., Braus G.H., Braus-Stromeier S.A., Corrochano L.M., Dai Z., van Dijck P.W., Hofmann G., Lasure L.L., Magnuson J.K., Menke H., Meijer M., Meijer S.L., Nielsen J.B., Nielsen M.L., van Ooyen A.J., Pel H.J., Poulsen L., Samson R.A., Stam H., Tsang A., van den Brink J.M., Atkins A., Aerts A., Shapiro H., Pangilinan J., Salamov A., Lou Y., Lindquist E., Lucas S., Grimwood J., Grigoriev I.V., Kubicek C.P., Martinez D., van Peij N.N., Roubos J.A., Nielsen J., Baker S.E. // *Genome Res.* 2011. Vol. 21(6), pp. 885-897.

20. Yang J.-K., Zhang J.-W., Mao L., You X., Xiong, W. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ANY59682> (date of the application: 24.07.2018)

21. Chapman J.W., Musters W., Rouwenhorst R.J., Toschka H.Y., Verbakel, J.M. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA02437.1> (date of the application: 24.07.2018)

22. Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G. // *Biophysics.* 2016. Vol. 61(4), pp. 565-571.

23. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G., Perpete E.A., Wouters J., Housen I., Michaux C. // *Biochimie.* 2012. Vol. 94(11), pp. 2423-2430.

24. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Obraztsova T.B. // *Biophysic.* 2009. Vol. 54 (6), pp. 675-680.

Воронежский государственный университет
Макин С. М., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: integral_po_dx@mail.ru

Voronezh State University
Makin S. M., postgraduate student, Biophysics and Biotechnology Department
E-mail: integral_po_dx@mail.ru

Макин С.М., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Ковалева Т.А., Артюхов В.Г.

Сакибаев Ф. А. магистрант кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: farkhatlukum@gmail.com

Sakibaev F. A., master student, Biophysics and Biotechnology Department
E-mail: farkhatlukum@gmail.com

*Холявка М. Г. доцент кафедры биофизики и биотехнологии, кандидат биологических наук
Тел.: +7 (473) 220 85 86
E-mail: holyavka@rambler.ru

*Holyavka M. G. PhD., Associate Professor, Biophysics and Biotechnology Department
Ph.: +7 (473) 220 85 86
E-mail: holyavka@rambler.ru

Ковалева Т. А. доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии

Kovaleva T. A., PhD., DSci., Full Professor, Biophysics and Biotechnology Department

Артюхов В. Г., профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии
Тел.: +7 (473) 220-89-81
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, head of biophysics and biotechnology department
Ph.: +7 (473) 220-89-81
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

SUPRAMOLECULAR ORGANIZATION OF EXO- AND ENDOINULINASES: STRUCTURAL FEATURES, COMPARATIVE ASPECT

S. M. Makin, F. A. Sakibaev, M. G. Holyavka, T. A. Kovaleva, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

Abstract. Inulinases have great possibility as industrial enzymes for the production of high fructose syrups and inulo-oligosaccharides of various lengths. Inulinases are divided by the mechanism of the substrate hydrolysis to exoinulinases (EC 3.2.1.80), which cleave end fructose residues from the molecule of inulin, and endoinulinase (EC 3.2.1.7), which carry out hydrolysis of inulin far from end fructose residues to form inulo-oligosaccharides. Exoinulinases and endoinulinases differ in substrate specificity, which is due to the difference in the structure of their active sites.

The effective using of inulinase in industry with the conservation of enzyme activity at a high level requires the study of its structural and functional properties, molecular and supramolecular organization. Understanding the association-dissociation laws of enzyme molecules plays an important role in the practical application of enzymes in a free and immobilized form. The aim of this work was to create computer models of exo- and endoinulinases dimers from various producers, revealing the features of their supramolecular organization and the types of contacts between the monomers of exo- and endo- enzyme forms.

Spatial structures of exoinulinases were obtained from their amino acid sequences by reconstruction using high-performance computer simulation on the basis of the exoinulinase molecule from *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W). In the case of endoinulinases, endoinulinase from *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) acted as a template for the reconstruction of the spatial structure of their macromolecules.

Modeling of protein complexes (dimers) was carried out in programs Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock. Before carrying out numerical calculations, the centers of inulinase molecules and the parameters of the box were manually set, ensuring that both molecules of the enzyme were completely inside the computational region of space. Each of the ligands in the docking calculations had the maximum conformational freedom.

Visualization of molecular structures was carried out in programs Jmol, Maestro and Swis PDB Viewer. Calculation of the parameters of pores, tunnels and cavities was carried out in the software Mole.

The article discusses the amino acid composition of the contact sites (binding sites) between the monomers in the dimer composition and the mechanisms of the dimerization process of inulinases from various producers. It is shown that the spatial organization of dimeric complexes is differentiated depending

on the affiliation of the enzyme to exo- or endoinulinases. It was established that during the dimerization of inulinase, the formation of contacts between the monomeric enzyme forms from all studied producers is dominated by nonpolar amino acid residues.

Keywords: inulinase, supramolecular organization, dimer, contact sites, molecular docking.

REFERENCES

- Ganaie M.A., Lateef A., Gupta U.S., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, Vol. 172, pp. 2143–2159. DOI:10.1007/s12010-013-0661-9
- Gupta A.K., Kaur M., Kaur N., Singh R., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1992, Vol. 5, pp. 293–296.
- Hughes S.R., Qureshi N., López-Núñez, J.C., M.A. Jones, J.M. Jarodsky, L.Á. Galindo-Leva, M.R. Lindquist, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, Vol. 33, pp. 78.
- Kango N., Jain S.C., *Food Biotechnology*, 2011, Vol. 25, pp. 165–212.
- Nagem R.A., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Polikarpov I., *J. Mol. Biol.*, 2004, Vol. 344, № 11, pp. 471–480.
- Nagem R.A., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Polikarpov I., *J. Mol. Biol.*, 2004, Vol. 344, № 11, pp. 471–480.
- Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., *Biocatalysis and Biotransformation*, 2016, Vol. 34, № 1, pp. 1–17.
- Singh R.S., Chauhan K., *Current Biotechnology*, 2018, Vol. 7, pp. 242–260.
- Neagu C., Bahrim G., *Innov. Rom. Food Biotechnol.*, 2011, Vol. 9, pp. 1–11.
- Arand M., Golubev A.M., Neto B.J.R., Polikarpov I., Wattiez R., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Shabalín K.A., Shishliannikov S.M., Chepurnaya O.V., Neustroev K.N. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC44220.1> (date of the application: 24.07.2018)
- Chen X.-M., Xu X.-M., Jin Z.-Y. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADM21204.1> (date of the application: 24.07.2018)
- Andersen M.R., Salazar M.P., Schaap P.J., van de Vondervoort P.J., Culley D., Thykaer J., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Albang R., Albermann K., Berka R.M., Braus G.H., Braus-Stromeyer S.A., Corrochano L.M., Dai Z., van Dijck P.W., Hofmann G., Lasure L.L., Magnuson J.K., Menke H., Meijer M., Meijer S.L., Nielsen J.B., Nielsen M.L., van Ooyen A.J., Pel H.J., Poulsen L., Samson R.A., Stam H., Tsang A., van den Brink J.M., Atkins A., Aerts A., Shapiro H., Pangilinan J., Salamov A., Lou Y., Lindquist E., Lucas S., Grimwood J., Grigoriev I.V., Kubicek C.P., Martinez D., van Peij N.N., Roubos J.A., Nielsen J., Baker S.E., *Genome Res.*, 2011, Vol. 21(6), pp. 885–897.
- Lu W.-D. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGR40655.1> (date of the application: 24.07.2018)
- Tsujimoto Y., Watanabe A., Nakano K., Watanabe K., Matsui H., Tsuji K., Tsukihara T., Suzuki Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, Vol. 62(2–3), pp. 180–185.
- Gao J., Xu Y.Y., Yang H.M., Xu H., Xue F., Li S., Feng X.H., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, Vol. 173(6), pp. 1419–1430.
- Nierman W.C., Pain A., Anderson M.J., Wortman J.R., Kim H.S., Arroyo J., Berriman M., Abe K., Archer D.B., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulsen R., Davies R., Dyer P.S., Farman M., Fedorova N., Fedorova N., Feldblyum T.V., Fischer R., Fosker N., Fraser A., García J.L., García M.J., Goble A., Goldman G.H., Gomi K., Griffith-Jones S., Gwilliam R., Haas B., Haas H., Harris D., Horiuchi H., Huang J., Humphray S., Jiménez J., Keller N., Khouri H., Kitamoto K., Kobayashi T., Konzack S., Kulkarni R., Kumagai T., Lafon A., Latgé J.P., Li W., Lord A., Lu C., Majoros W.H., May G.S., Miller B.L., Mohamoud Y., Molina M., Monod M., Mouyna I., Mulligan S., Murphy L., O'Neil S., Paulsen I., Peñalva M.A., Perlea M., Price C., Pritchard B.L., Quail M.A., Rabinowitsch E., Rawlins N., Rajandream M.A., Reichard U., Renaud H., Robson G.D., Rodriguez de Córdoba S., Rodríguez-Peña J.M., Ronning C.M., Rutter S., Salzberg S.L., Sanchez M., Sánchez-Ferrero J.C., Saunders D., Seeger K., Squares R., Squares S., Takeuchi M., Tekaiia F., Turner G., Vazquez de Aldana C.R., Weidman J., White O., Woodward J., Yu J.H., Fraser C., Galagan J.E., Asai K., Machida M., Hall N., Barrell B., Denning D.W., *Nature*, 2005, Vol. 438(7071), pp. 1151–1156.
- Wang J.-H., Teng D., Yao Y. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN64131.1> (date of the application: 24.07.2018)
- Yuan X.L., Goosen C., Kools H., van der Maarel M.J., van den Hondel C.A., Dijkhuizen

L., Ram A.F., *Microbiology*, 2006, Vol. 152(10), pp. 3061-3073.

19. Andersen M.R., Salazar M.P., Schaap P.J., van de Vondervoort P.J., Culley D., Thykaer J., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Albang R., Albermann K., Berka R.M., Braus G.H., Braus-Stromeier S.A., Corrochano L.M., Dai Z., van Dijck P.W., Hofmann G., Lasure L.L., Magnuson J.K., Menke H., Meijer M., Meijer S.L., Nielsen J.B., Nielsen M.L., van Ooyen A.J., Pel H.J., Poulsen L., Samson R.A., Stam H., Tsang A., van den Brink J.M., Atkins A., Aerts A., Shapiro H., Pangilinan J., Salamov A., Lou Y., Lindquist E., Lucas S., Grimwood J., Grigoriev I.V., Kubicek C.P., Martinez D., van Peij N.N., Roubos J.A., Nielsen J., Baker S.E., *Genome Res.*, 2011, Vol. 21(6), pp. 885-897.

20. Yang J.-K., Zhang J.-W., Mao L., You X., Xiong, W. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ANY59682> (date of the application: 24.07.2018)

21. Chapman J.W., Musters W., Rouwenhorst R.J., Toschka H.Y., Verbakel, J.M. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA02437.1> (date of the application: 24.07.2018)

22. Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., *Biophysics*, 2016, Vol. 61(4), pp. 565–571.

23. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G., Perpete E.A., Wouters J., Housen I., Michaux C., *Biochimie*, 2012, Vol. 94 (11), pp. 2423–2430.

24. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Obraztsova T.B., *Biophysic*, 2009, Vol. 54 (6), pp. 675-680.