

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРВИЧНЫХ СТРУКТУР ГЛИКОЗИДГИДРОЛАЗ

М. Г. Холявка^{1,2*}, В. Г. Артюхов¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

² ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

Аннотация. Фруктанмодифицирующие ферменты делятся на фруктанпродуцирующие (фруктозилтрансферазы) и фруктангидролизующие (инвертазы, инулиназы, леваназы). Фруктозилтрансферазы разрывают гликозидную связь сахарозы и используют энергию этой связи, чтобы присоединить образовавшийся фруктозил к другой молекуле сахарозы или другому акцептору, увеличивая цепь фруктана. Инвертазы гидролизуют сахарозу и небольшие фруктоолигосахариды. Олиго- и полифруктаны расщепляются инулиназами и леваназами.

Известно, что отличие всего на 3 аминокислотных остатка влияет на способность гликозидгидролаз расщеплять различные субстраты, в частности инулин и леван, или проявлять трансфруктозилазную активность. В связи с этим целью работы было осуществить сравнительный анализ первичных структур гликозидгидролаз различного происхождения.

В работе представлены результаты сравнительного анализа аминокислотных последовательностей гликозидгидролаз из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Процент перекрытия (Query cover) последовательностей и их идентичность (Ident) были рассчитаны в программе Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Установлено, что сродство эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* с 6-, и 1-фруктан экзогидролазами из *Arabidopsis thaliana* и *Arabidopsis lyrata* subsp. *Lyrata* оказалось выше (89 % перекрытия и 24 % идентичности), чем у экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (соответственно 38 и 57 % перекрытия, 29 и 26 % идентичности). Фруктан 1-экзогидролаза I из *Cichorium intybus* также оказалась ближе по первичной структуре к грибной эндоинулиназе (90 % перекрытия и 25 % идентичности), чем к дрожжевой экзоинулиназе (51 % перекрытия и 27 % идентичности).

Из полученных результатов можно сделать следующий вывод: далеко не во всех случаях механизм гидролиза субстрата определяет степень гомологии гликозидгидролаз и родственных им ферментов. Возможно, некоторые гликозидгидролазы, в том числе инулиназы, могут выступать и как эндо-, и как экзо-ферменты, т.е. обладают обоими типами каталитической активности по отношению к фруктанам.

Ключевые слова: гликозидгидролазы, инвертазы, инулиназы, леваназы, фруктозилтрансферазы, первичные структуры, степень гомологии

Фруктанмодифицирующие ферменты принято разделять на 2 группы: фруктанпродуцирующие (фруктозилтрансферазы) и фруктангидролизующие энзимы (инвертазы, инулиназы, леваназы). Фруктозилтрансферазы разрывают гликозидную связь сахарозы и используют энергию этой связи, чтобы присоединить образовавшийся фруктозил к другой молекуле сахарозы или другому акцептору (различные моно- или дисахариды), увеличивая цепь фруктана. Инвертазы гидролизуют сахарозу и небольшие фруктоолигосахариды. Олиго- и полифруктаны расщепляются инулиназами и леваназами [1-7].

На основе сходства аминокислотных последовательностей гликозидгидролазы (или гликозидазы, КФ 3.2.1) были сгруппированы в 96 семейств (GH1-GH100, кроме GH21, GH40, GH41 и GH60) по классификации углеводов-активных ферментов (CAZy) [8].

Семейство гликозидгидролаз 32 (GH32) – группа активных по отношению к углеводам ферментов, включающая инвертазу (КФ 3.2.1.26), инулиназы (КФ 3.2.1.7, КФ 3.2.1.64, КФ 3.2.1.80), леваназу (КФ 3.2.1.65), некоторые фруктозилтрансферазы с гидролазной активностью (КФ 2.4.1.99, КФ 2.4.1.100) и фруктозидазы (КФ 3.2.1.153, КФ 3.2.1.154) с гидролазной активностью. Ферменты

семейства GH32 катализируют гидролиз гликозидных связей углеводов (сахарозы, различных олиго- и полисахаридов, фруктанов – левана и инулина). Бактериальные фруктозилтрансферазы относятся к гликозидгидролазам семейства GH 68, но большинство фруктанмодифицирующих ферментов относится к семейству GH 32. GH32 и GH 68 вместе формируют клан GH-J [8-11].

Главная реакция, характерная для гликозидгидролаз семейства GH32, включает протонирование гликозидного кислорода с последующей нуклеофильной атакой атома углерода субстрата (сахара) карбоксильной группой [12]. Нуклеофильная атака осуществляется консервативным остатком аспарагиновой кислоты в первой лопасти β -пропеллера (Asp), где остаток глутаминовой кислоты в четвертой лопасти β -пропеллера (Glu) действует как донор протона. Этот механизм отличается у ферментов семейства GH43 (β -ксилозидазы, β -ксилаказы, α -D-арабиназы и α -D-арабинофуранозидазы) и GH62 (α -D-арабинифуранозидазы) [11]. Описываемые выше аминокислотные остатки – это Asp41, Glu241 у экзоинулиназы из *A. awamori* и Asp17, Glu190 у инвертазы из *Thermotoga maritima* [12, 13].

Принято считать, что инулиназы гидролизуют, главным образом, инулин. Сахароза, раффиноза, мелицитоза, стахиоза, леван и леваноолигосахариды также гидролизуются, но с меньшей скоростью [14]. Экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* способна гидролизовать как β -2,1, так и β -2,6-фруктозидные связи в олигофруктозидах. Способность гидролизовать леван также отмечена и для эндоинулиназы, выделенной из рода *Penicillium*. [15]. Эндоинулиназы из *Aspergillus awamori* и *Aspergillus ficuum* гидролизуют только инулин и инулоолигосахариды, в то время как большие фруктоолигосахариды, по-видимому, связываются с образованием непродуктивных комплексов. Сравнительная активность в отношении инулина, инулопентозы, инулотетразы, инулотриозы, инулобиозы соответствует 370:16:8:3:1. Основным продуктом гидролиза всех субстратов является фруктоза [16, 17]. Для инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* выявлено, что их активность по отношению к инулоолигосахаридам зависит от длины цепи, а сродство к субстрату возрастает с увеличением степени полимеризации [13].

Доказано, что экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* отщепляет от инулина только фруктозу и не проявляет трансгликозилирующей активности.

Фермент гидролизует как β -(2,1) так и β -(2,6)-фруктозильные связи фруктоолигосахаридов. Установлено, что каталитический сайт инулиназы содержит по крайней мере 5 фруктозил-связывающих участков. Анализ продуктов гидролиза инулопентозы и инулогексозы показал, что фермент действует только как экзоинулиназа, исключая возможность механизма множественной атаки [1].

Известно, что отличие всего на 3 аминокислотных остатка влияет на способность различных гликозидгидролаз расщеплять инулин, леван или проявлять трансфруктозилазную активность [18, 19]. В связи с этим целью работы было осуществить сравнительный анализ первичных структур гликозидгидролаз из организмов различных таксономических групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты сравнительного анализа структур инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* (как промышленно перспективных ферментов [20-24]) с аминокислотными последовательностями других гликозидгидролаз из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Процент перекрытия (Query cover) последовательностей и их идентичность (Ident) были рассчитаны в программе Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Из табл. 1 видно, что первичные структуры инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* идентичны друг другу всего на 31 %. Интересно отметить, что при близких значениях степени идентичности с инулиназами из *Magnaportheopsis poae* ATCC 64411 (32 и 38 % соответственно) и *Papiliotrema aurea* (34 и 37 % соответственно) эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* и экзоинулиназа из *Kluyveromyces marxianus* существенно отличаются от названных выше структур в степени перекрытия аминокислотных последовательностей – соответственно 61 и 87 % с первой, 52 и 93 % – со второй молекулой.

Требующим глубокого осмысления является также практически идентичный процент перекрытия (93 и 94 %) исследованных нами инулиназ с аминокислотной последовательностью инвертазы из *Saccharomyces cerevisiae*, которая по механизму действия близка к экзоинулиназам, что подтверждается идентичностью ее первичной структуры на 51 % с экзоинулиназой и лишь на 27 % с эндоинулиназой.

Экзоинулиназы из *Arthrobacter* sp. MN8, *Paenibacillus polymyxa*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas mucidolens* и *Aspergillus*

luchuensis идентичны эндоинулиназе из *Aspergillus ficuum* соответственно на 37, 34, 34, 34 и 35 % (процент перекрытия последовательностей составляет 93, 91, 93, 93 и 94 %), а экзоинулиназе из *Kluyveromyces marxianus* – на 33, 33, 35, 35 и 33 % (процент перекрытия последовательностей

– 87, 87, 85, 87 и 89 %). При этом степень перекрытия аминокислотной последовательности экзоинулиназы из *Bacillus licheniformis* с исследуемой нами грибной инулиназой составляет 93 %, с дрожжевым ферментом – 57 % (при идентичности структур 29 и 30 % соответственно).

Таблица 1

Сравнительный анализ структур инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* с аминокислотными последовательностями других гликозидгидролаз из базы данных NCBI

| Эндоинулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i> | | Фермент | Шифр последовательности в NCBI | Экзоинулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i> | |
|--|-------------------------|---|--------------------------------|---|-------------------------|
| Процент перекрытия (Query cover), % | Идентичность (Ident), % | | | Процент перекрытия (Query cover), % | Идентичность (Ident), % |
| 64 | 31 | Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i> | CAA48500.1 | 100 | 100 |
| 64 | 31 | Инулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i> | AAN32611.1 | 100 | 99 |
| 93 | 26 | Экзоинулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i> | AAT70412.1 | 95 | 98 |
| 93 | 27 | Инвертаза из <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | BAJ07815.1 | 94 | 51 |
| 98 | 28 | Инулиназа из <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | ABW75766.2 | 93 | 47 |
| 80 | 32 | Инулиназа из <i>Candida kutaonensis</i> | CCF77887.1 | 91 | 46 |
| 14 | 46 | β -фруктофуранозидаза из <i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> ATCC 15697 | ALY05367.1 | 14 | 45 |
| 91 | 27 | Инулиназа из <i>Papiliotrema aurea</i> | AFO84001.1 | 94 | 42 |
| 89 | 28 | Инулиназа из <i>Valsa mali</i> var. <i>pyri</i> | KUI59739.1 | 87 | 41 |
| 91 | 27 | Инулиназа из <i>Shiraia</i> sp. slf14 | AOY07795.1 | 87 | 40 |
| 89 | 28 | Инулиназа из <i>Valsa mali</i> | KUI64208.1 | 89 | 39 |
| 61 | 32 | Инулиназа из <i>Magnaportheopsis poae</i> ATCC 64411 | KLU89857.1 | 87 | 38 |
| 98 | 62 | Инулиназа из <i>Aspergillus udagawae</i> | GAO81637.1 | 87 | 38 |
| 52 | 34 | Инулиназа из <i>Papiliotrema aurea</i> | ACC61059.1 | 93 | 37 |
| 95 | 34 | β -фруктофуранозидаза из <i>Paenibacillus</i> sp. T145-13ar | ODP28006.1 | 92 | 33 |
| 91 | 34 | β -фруктофуранозидаза из <i>Microbulbifer</i> sp. JAM-3301 | BAL70274.1 | 90 | 33 |
| 93 | 37 | Экзоинулиназа из <i>Arthrobacter</i> sp. MN8 | AGC01505.1 | 87 | 33 |
| 91 | 34 | Экзоинулиназа из <i>Paenibacillus polymyxa</i> | AAL82575.1 | 87 | 33 |
| 93 | 34 | Экзоинулиназа из <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | BAC45010.1 | 85 | 35 |
| 93 | 34 | Экзоинулиназа из <i>Pseudomonas mucidolens</i> | AAF44125.1 | 87 | 35 |
| 89 | 32 | Инулиназа из <i>Arthrobacter</i> sp. MWB30 | KIA74147.1 | 87 | 33 |
| 94 | 35 | Экзоинулиназа из <i>Aspergillus luchuensis</i> | GAT18742.1 | 89 | 33 |
| 94 | 34 | Инулиназа из <i>Byssoschlamys spectabilis</i> No. 5 | GAD92596.1 | 88 | 32 |
| 94 | 34 | Инулиназа из <i>Penicillium citrinum</i> | AIY26830.1 | 91 | 32 |
| 100 | 100 | Инулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i> | CAA07345.1 | 73 | 31 |
| 94 | 36 | Фруктозилтрансфераза из <i>Paenibacillus polymyxa</i> | CAA81392.1 | 87 | 30 |
| 100 | 99 | Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i> | AAK43726.1 | 64 | 30 |
| 100 | 99 | Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 | EHA19510.1 | 64 | 30 |
| 93 | 29 | Экзоинулиназа из <i>Bacillus licheniformis</i> | AGR40655.1 | 57 | 30 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> 25433 | EXM16508.1 | 89 | 29 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> HDV247 | EHA30199.1 | 87 | 29 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> Fo47 | EWZ28230.1 | 87 | 29 |
| 98 | 63 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> race 2 54008 | EXL68891.1 | 87 | 29 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4 | EMT72224.1 | 87 | 29 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> tropical race 4 54006 | EXL91590.1 | 87 | 29 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> 26381 | EXL54341.1 | 87 | 29 |
| 94 | 64 | Инулиназа из <i>Aspergillus fumigatus</i> Z5 | KMK58827.1 | 87 | 29 |
| 91 | 66 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1 | ENH74256.1 | 85 | 29 |

Сравнительный анализ структур инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* с аминокислотными последовательностями других гликозидгидролаз из базы данных NCBI

| Эндоинулиназа из <i>Aspergillus ficuum</i> | | Фермент | Шифр последовательности в NCBI | Экзоинулиназа из <i>Kluyveromyces marxianus</i> | |
|--|-------------------------|--|--------------------------------|---|-------------------------|
| Процент перекрытия (Query cover), % | Идентичность (Ident), % | | | Процент перекрытия (Query cover), % | Идентичность (Ident), % |
| 98 | 63 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. raphani 54005 | EXK77357.1 | 68 | 29 |
| 98 | 63 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. conglutinans race 2 54008 | EXL66374.1 | 68 | 29 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> Fo47 | EWZ28461.1 | 68 | 29 |
| 95 | 94 | Эндоинулиназа из <i>Aspergillus niger</i> | AAN64131.1 | 64 | 29 |
| 89 | 24 | 6-, и 1- фруктан экзогидролаза из <i>Arabidopsis thaliana</i> | NP_568254.1 | 38 | 29 |
| 88 | 27 | β -фруктозидаза из <i>Lactobacillus paracasei</i> | AKA87712.1 | 88 | 28 |
| 97 | 73 | Инулиназа из <i>Talaromyces cellulosyticus</i> | GAM42287.1 | 87 | 28 |
| 98 | 64 | Инулиназа из <i>Fusarium oxysporum</i> FOSC 3-a | EWY84367.1 | 87 | 28 |
| 98 | 62 | Инулиназа из <i>Diaporthe helianthi</i> | OCW33198.1 | 87 | 28 |
| 90 | 25 | Фруктан 1-экзогидролаза I из <i>Cichorium intybus</i> | CAC19366.1 | 51 | 27 |
| 92 | 26 | Фруктан β -фруктозидаза из <i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC 43143 | BAK27009.1 | 91 | 26 |
| 93 | 26 | β -фруктофуранозидаза из <i>Vibrio scophthalmi</i> | ANU38700.1 | 88 | 26 |
| 89 | 24 | 6-, и 1- фруктан экзогидролаза из <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> | EFH47764.1 | 57 | 26 |
| 95 | 24 | Сахарозо-6-фосфат гидролаза из <i>Bifidobacterium adolescentis</i> L2-32 | EDN82157.1 | 86 | 25 |
| 93 | 27 | Эндоинулиназа из <i>Arthrobacter</i> sp. S37 | CAB63119.1 | 73 | 24 |
| 91 | 25 | β -фруктофуранозидаза из <i>Paenibacillus</i> sp. TI45-13ar | ODP26905.1 | 87 | 23 |
| 43 | 28 | Эндоинулиназа из <i>Microbulbifer</i> sp. JAM-3301 | BAL70275.1 | 78 | 22 |

Сродство эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* с 6- и 1-фруктан экзогидролазами из *Arabidopsis thaliana* и *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* оказалось выше (89 % перекрытия и 24 % идентичности), чем у экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (соответственно 38 и 57 % перекрытия, 29 и 26 % идентичности). Фруктан 1-экзогидролаза I из *Cichorium intybus* также оказалась ближе по первичной структуре к грибной эндоинулиназе (90 % перекрытия и 25 % идентичности), чем к дрожжевой экзоинулиназе (51 % перекрытия и 27 % идентичности).

Эндоинулиназа из *Arthrobacter* sp. S37, как и ожидалось, более близка к инулиназе из *Aspergillus ficuum* (93 % перекрытия и 27 % идентичности), чем к ферменту из *Kluyveromyces marxianus* (73 % перекрытия и 24 % идентичности), однако, эндоинулиназа из *Microbulbifer* sp. JAM-3301 показала иной результат – 43 % перекрытия и 28 % идентичности с исследуемой нами эндоинулиназой и 78 % перекрытия и 22 % идентичности с дрожжевой экзоинулиназой.

Из всего изложенного выше можно заключить, что степень гомологии инулиназ и родственных

им ферментов не определяет механизм гидролиза субстрата. Возможно, некоторые гликозидгидролазы, в том числе инулиназы, могут выступать и как эндо, и как экзо-ферменты, т.е. обладают обоими типами каталитической активности по отношению к фруктанам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kulminkaya A.A., Arand M., Eneyskaya E.V., Ivanen D.R., Shabalin K.A., Shishlyannikov S.M., Saveliev A.N., Korneeva O.S., Neustroev K.N. // Biochim Biophys Acta. 2003. Vol. 1650. № 1. P. 22-29.
2. Akimoto H., Kiyota N., Kushima T., Nakamura T., Ohta K. // Biosci Biotechnol Biochem. 2000. Vol. 64. P. 2328-2335.
3. Ohta K., Akimoto H., Matsuda S., Toshimitsu D., Nakamura T. // Biosci Biotechnol Biochem. 1998. Vol. 62. P. 1731-1738.
4. Arand M., Golubev A.M., Neto J.R.B., Polikarpov I., Wattiez R., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminkaya A.A., Shabalin K.A., Shishliannikov S.M., Chepurnaya O.V., Neustroev K.N. // Biochem. J. 2002. Vol. 362. P. 131-135.

5. Kholiyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A. // *Biocatalysis and Biotransformation*. 2016. Vol. 34. № 1. P. 1-17.
6. Артюхов В.Г., Холявка М.Г., Ковалёва Т.А. // *Биофизика*. 2013. Т. 58. № 4. С. 635-644.
7. Жеребцов Н.А., Абрамова И.Н., Шеламова С.А., Попова Т.Н. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2003. Т. 39. № 6. С. 619-625.
8. Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. // *Nucleic Acids Res*. 2008. Vol. 37. P. 233-238.
9. Parrent J.L., James T.Y., Vasaitis R., Taylor A.F.S. // *BMC Evolutionary Biology*. 2009. Vol. 9. Article number 148.
10. Naumoff D.G. // *Proteins*. 2001. Vol. 42. P. 66-76.
11. Pons T., Naumoff D.G., Martinez-Fleites C., Hernandez L. // *Proteins*. 2004. Vol. 54. P. 424-432.
12. 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. P. 471-480.
13. Alberto F., Jordi E., Henrissat B., Czjzek M. // *Biochem. J*. 2006. Vol. 395. P. 457-462.
14. Абелян В.А., Манукян Л.С. // *Биохимия*. 1996. Т. 61, № 6. С. 1028-1036.
15. Vandamme E.J., Derycke D.G. // *Adv. Appl. Microbiol*. 1983. Vol. 29. P. 139-176.
16. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. 184 с.
17. Парк С., Хен И., Ким Х., Сонг С., Ум Т.-Б., Че К.-С. // *Биохимия*. 2003. Т. 68, № 6. С. 805-809.
18. Pons T., Chinae G., Beldarrain A., Marquez G., Acosta N., Rodriguez L., Valencia A. // *Protein Struct Funct Genet*. 2002. Vol. 33. P. 383-395.
19. Yuan X.L., Goosen C., Kools H., van der Maarel M.J.E.C., van den Hondel C.A.M.J.J., Dijkshuizen L., Ram A.F.J. // *Microbiology*. 2006. Vol. 152. P. 3061-3073.
20. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2007. Т. 7. № 5. С. 804-810.
21. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2011. № 1. С. 3-7.
22. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // *Биотехнология*. 2012. № 1. С. 43-63.
23. Холявка М.Г., Ковалёва Т.А., Хрупина Е.А., Волкова С.А., Артюхов В.Г. // *Биотехнология*. 2012. № 6. С. 31-42.
24. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Битюцкая Л.А., Гречкина М.В., Образцова Т.Б. // *Биофизика*. 2009. Т. 54. № 6. С. 1005-1011.

*Воронежский государственный университет
Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь
E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Voronezh State University
Holyavka M. G., DSci., prof., department of biophysics and biotechnology, Professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol
E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Artyukhov V. G., DSci., prof., Head of the Biophysics and Biotechnology Department
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE PRIMARY STRUCTURES OF GLYCOSIDE HYDROLASES

M. G. Holyavka^{1,2*}, V. G. Artyukhov¹

¹ Voronezh State University

² Sevastopol State University

Abstract. Fructan-modifying enzymes are divided into fructan-producing enzymes (fructosyl transferases) and fructan hydrolyzing enzymes (invertases, inulinases, levanases). Fructosyl transferases break the glycosidic bond of sucrose and use the energy of this bond to attach the resulting fructosyl to another sucrose molecule or other acceptor, increasing the fructan chain. Invertases hydrolyze sucrose and small fructooligosaccharides. Oligo- and polyfructans are cleaved by inulinases and levanases.

It is known that a difference of only 3 amino acid residues affects the ability of glycoside hydrolases to cleave various substrates, in particular inulin and levan, or to exhibit transfructosylating activity. In this regard, the aim of the work was to carry out a comparative analysis of the primary structures of glycoside hydrolases of various origins.

The paper presents the results of a comparative analysis of the amino acid sequences of glycoside hydrolases from the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The overlap percentage (Query cover) of the sequences and their identity (Ident) were calculated using the Blast program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

It was found that the affinity of endoinulinase from *Aspergillus ficuum* with 6- and 1-fructan exohydrolases from *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* was higher (89% overlap and 24% identity) than exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* (38% and 57% overlap, 29% and 26% identity, respectively). Fructan 1-exohydrolase I from *Cichorium intybus* was also closer in primary structure to fungal endoinulinase (90% overlap and 25% identity) than to yeast exoinulinase (51% overlap and 27% identity).

From the results obtained, the following conclusion can be drawn: the mechanism of substrate hydrolysis does not in all cases determine the degree of homology of glycoside hydrolases and related enzymes. It is possible that some glycoside hydrolases, including inulinases, can act both as endo and exo-enzymes, i.e. possess both types of catalytic activity towards fructans.

Keywords: glycoside hydrolases, invertases, inulinases, levanases, fructosyltransferases, primary structures, degree of homology.

REFERENCES

- Kulminskaya A.A., Arand M., Eneyskaya E.V., Ivanen D.R., Shabalin K.A., Shishlyannikov S.M., Saveliev A.N., Korneeva O.S., Neustroev K.N., *BiochimBiophysActa*, 2003, Vol, 1650, № 1, pp. 22-29.
- Akimoto H., Kiyota N., Kushima T., Nakamura T., Ohta K., *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, Vol. 64, pp. 2328-2335.
- Ohta K., Akimoto H., Matsuda S., Toshimitsu D., Nakamura T., *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, Vol. 62, pp. 1731-1738.
- Arand M., Golubev A.M., Neto J.R.B., 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., *Biochem. J.*, 2002, Vol. 362, pp. 131-135.
- Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., *Biocatalysis and Biotransformation*, 2016, Vol. 34, № 1, pp. 1-17.
- Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A., *Biophysics*, 2013, Vol. 58, № 4, pp. 493-501.
- Zherebtsov N.A., Abramova I.N., Shelamova S.A., Popova T.N., *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003, Vol. 39, No 6, pp. 544-548.
- Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B., *Nucleic Acids Res*, 2008, Vol. 37, pp. 233-238.
- Parrent J.L., James T.Y., Vasaitis R., Taylor A.F.S., *BMC Evolutionary Biology*, 2009, Vol. 9, article number 148.
- Naumoff D.G., *Proteins*, 2001, Vol. 42, pp. 66-76.
- Pons T., Naumoff D.G., Martinez-Fleites C., Hernandez L., *Proteins*, 2004, Vol. 54, pp. 424-432.
- 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, pp. 471-480.
- Alberto F., Jordi E., Henrissat B., Czjzek M., *Biochem. J.*, 2006, Vol. 395, pp. 457-462.
- Abelyan V.A., Manukyan L.S., *Biochemistry (Mosc)*, 1996, Vol. 61, № 6, pp. 1028-1036.
- Vandamme E.J., Derycke D.G., *Adv. Appl. Microbiol.*, 1983, Vol. 29, pp. 139-176.
- Korneeva O.S. *Karbohidrazy: preparativnoe poluchenie, struktura i mekhanizm dejstviya na oligo- i polisaharidy*. Voronezh: Izd-vo Voronezh. un-ta, 2001, 184 p.
- Park S., Han Y., Kim H., Song S., Uhm T.B., Chae K.S., *Biochemistry (Mosc)*, 2003, Vol. 68, № 6, pp. 658-661.
- Pons T., Chinea G., Beldarrain A., Marquez G., Acosta N., Rodriguez L., Valencia A., *Protein Struct Funct Genet*, 2002, Vol. 33, pp. 383-395.
- Yuan X.L., Goosen C., Kools H., van der Maarel M.J.E.C., van den Hondel C.A.M.J.J., Dijkshuizen L., Ram A.F.J., *Microbiology*, 2006, Vol. 152, pp. 3061-3073.
- Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Taha A.S., *Sorbcionnye i hromatograficheskie processy*, 2007, Vol. 7, № 5, pp. 804-810.
- Kovaleva T.A., Holyavka M.G., *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2011, № 1, pp. 3-7.
- Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., *Biotechnology in Russia*, 2012, № 1, pp. 43-63.
- Kholyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A., Volkova S.A., Artyukhov V.G., *Biotechnology in Russia*, 2012, № 6, pp. 31-41.
- Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V., Obratsova T.B., *Biophysics*, 2009, Vol. 54, № 6, pp. 675-680.