

## АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ГОМОЛОГИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЛИКОЗИД-ГИДРОЛАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ

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

Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г Воронеж, 394018, РФ; e-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию: 25.07.2019

**Аннотация.** Изучена степень гомологии аминокислотных последовательностей гликолитических ферментов: экзоинулиназ ADM21204.1, A.CAC44220.1, EHA22512.1, AHN08014.1, AGR40655.1 и BAC45010.1, эндоинулиназ AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510.1, XP\_748286.1, ANY59682.1 и AA02437.1,  $\beta$ -фруктозидаз САА04518.1 и САА52620.1, фруктан-1-экзогидролазы САС37922.1 и фруктозилтрансферазы АДК46938.1. Наибольшая степень идентичности аминокислотных последовательностей среди экзоинулиназ выявлена для ферментов из *A. awamori* и *A. ficuum* (90,88%), наименьшая – между энзимом из *A. niger* с ферментами из *B. licheniformis* и *G. stearothermophilus* (28,29%). Наибольшая степень идентичности для эндоинулиназ выявлена между двумя формами эндоинулиназы из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) и составляет 97,87%, что также является наибольшим показателем для всех представленных в работе ферментов, наименьшая – между ферментами из *A. fumigatus* и *K. marxianus* (27,89%). Наименьший показатель гомологичности среди всех представленных в работе ферментов выявлен между экзоинулиназой из *A. niger* и  $\beta$ -фруктозидазой из *T. maritima* и равен 20,45%. Приведенные в работе данные показывают значительную вариабельность аминокислотного состава карбогидраз, что указывает на широкие возможности их применения в различных условиях промышленного гидролиза инулина.

**Ключевые слова:** гликозид-гидролазы, гомология, аминокислотные последовательности.

В настоящее время перспективным субстратом для производства фруктозы, используемой в качестве подсластителя и заменителя сахарозы, и фруктоолигосахаридов, выступающих в качестве пребиотиков, является инулин – полидисперсный фруктан, состоящий в основном из  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1)-D-фруктозил-фруктозных звеньев с терминальным остатком сахарозы [1]. Он служит в качестве запасного полисахарида и накапливается в подземных корнях и клубнях многих растений, таких как топинамбур (*Helianthus tuberosus*), цикорий (*Cichorium intibus*, *Cichorium endivia*), георгин (*Dahlia pinnata*) и т.д. [2]. Использование дешевого и доступного сырья в совокупности с применением катализаторов с высокой степенью активности в значительной степени повышают эффективность производства. В связи с этим большим потенциалом в данной области обладают гликолитические ферменты, катализирующие гидролиз инулина.

Высокая активность энзимов определяется их пространственной организацией и, как следствие, степенью сродства к субстрату. При этом промышленное использование биокатализаторов требует учета оптимальных значений pH и температуры, которые также зависят от структуры фермента.

Было показано, что отношение числа аминокислотных остатков, образующих  $\beta$ -складчатости, к количеству остатков, расположенных в петлях, а также соотношение содержания гидрофобных аминокислотных остатков к гидрофильным отличаются для инулиназ разной природы и с различными оптимальными значениями pH и температуры. Несмотря на то, что прямая корреляция между данными показателями и оптимальными параметрами функционирования инулиназ не наблюдается, исследование аминокислотных последовательностей инулиназ от различных продуцентов представляется полезным на первых этапах изучения структурно-функциональных свойств ферментов [3].

Варьирование состава реакционной среды, конструктивных характеристик реакторов и других условий гидролиза также приводит к необходимости учета особенностей строения энзима.

Известно, что конформационные состояния белков определяются их аминокислотным составом. Так, согласно данным ИК-спектроскопии, инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 имеет более упорядоченную структуру по сравнению с энзимом из *Aspergillus awamori* ВКМФ 2250: у нее наблюдается меньшая протяженность нерегулярных участков и большая протяженность  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев [4]. Поэтому для удовлетворения потребностей, возникающих в связи с условиями проведения реакции, необходимо использование гомологичных ферментов, с одной стороны, способных к осуществлению одного типа реакции, с другой стороны, обладающих необходимыми для данного промышленного процесса параметрами.

Иммобилизованные ферменты обладают рядом преимуществ по сравнению с их свободными формами. Так, связывание молекул энзимов с нерастворимыми носителями позволяет регулировать оптимальные значения pH и температуры и приводит к повышению их стабильности. Установлено, что адсорбция инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на матрице катионита ВИОН КН-1 приводит к увеличению температурного оптимума с 50 до 70°C с сохранением активности на уровне 27,5% от каталитической способности свободного энзима [5, 6].

Таблица 1. Процент идентичности аминокислотных последовательностей гликозил-гидролаз

Анализируемые объекты и ферменты	Экзоинулиназы						Эндоинулиназы						β-фруктозидазы		Фруктан-1-экзогидролаза	Фруктозил-трансфераза
	<i>A. ficum</i>	<i>A. awamori</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>T. maritima</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>C. intybus</i>	<i>A. japonicus</i>		
Экзоинулиназы	<i>A. ficum</i>	90,88	39,92	37,15	35,84	37,12	35,34	35,65	33,9	32,52	30,98	28,69	26,22	25,18		
	<i>A. awamori</i>	90,88	40,08	37,55	34,68	35,3	34,56	34,37	32,89	33,27	30,39	28,1	26,27	25,09		
	<i>A. niger</i>	39,92	40,08	29,55	28,89	28,89	33,33	47,06	23,08	23,08	47,06	42,86	20,45	25,09		
	<i>P. polymyxa</i>	37,15	37,55	29,55	49,58	34,93	35,67	34,23	33,81	31,52	32,15	32,8	31,88	26,82		
	<i>B. licheniformis</i>	35,84	34,68	28,89	49,58	37,1	35,41	29,01	31,09	29,39	49,58	29,54	27,18	27,33		
Экзоинулиназы	<i>G. stearothermophilus</i>	37,12	35,3	28,89	34,93	37,1	32,66	34,01	33,81	32,72	33,27	34,36	31,36	27,43		
	<i>A. niger</i>	35,34	34,56	33,33	35,67	35,41	94,63	94,63	93,04	62,08	60,12	29,37	27,18	25,88	25,8	35,59
	<i>A. niger</i>	35,65	34,37	47,06	34,23	29,01	94,63	97,87	97,87	63,8	63,8	29,89	28,42	25,41	25,32	27,33
	<i>A. niger</i>	33,9	32,89	23,08	33,81	31,09	93,04	97,87	62,94	63,19	28,63	29,63	27,89	25,76	25,76	28,32
	<i>A. fumigatus</i>	32,52	33,27	23,08	31,52	29,39	62,08	63,53	62,94	63,19	28,63	27,89	28,16	24,33	24,33	25
Эндоинулиназы	<i>F. oxysporum</i>	30,98	30,39	47,06	32,15	29,39	60,12	63,8	63,19	68,17	68,17	29,62	27,31	26,3	25,81	44,44
	<i>K. marxianus</i>	28,69	28,1	42,86	32,8	29,54	29,37	29,89	28,63	27,89	29,62	30,79	27,03	26,48	26,48	25,15
	<i>T. maritima</i>	26,22	26,27	20,45	31,88	28,94	27,18	28,42	29,63	28,16	30,79	32,27	29,94	29,94	29,94	22,06
	<i>A. thaliana</i>	25,18	25,09	42,86	26,82	27,33	25,41	25,41	25,76	25,76	27,03	32,27	21,6	21,6	21,6	21,6
	<i>C. intybus</i>	23,12	21,11	30,00	24,82	29,71	25,8	25,32	25,76	24,33	26,48	26,3	24,73	24,73	24,73	24,73
β-фруктозидазы	<i>A. thaliana</i>	32,27	32,27	22,06	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6
	<i>A. japonicus</i>	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6

Необходимо отметить, что от пространственной структуры молекул фермента, а также от состава и локализации аминокислот на их поверхности зависит эффективность иммобилизации. В связи с вышеизложенной целью настоящей работы является выявление степени идентичности аминокислотных последовательностей карбогидраз из различных продуцентов.

В качестве объектов исследования были использованы экзоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (ADM21204.1), *A. awamori* (CAC44220.1), *A. niger* (EHA22512.1), *Paenibacillus polymyxa* (AHN08014.1), *Bacillus licheniformis* (AGR40655.1) и *Geobacillus stearothermophilus* (BAC45010.1), отщепляющие терминальные остатки фруктозы, эндоинулиназы из *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510.1), *A. fumigatus* (XP\_748286.1), *Fusarium oxysporum* (ANY59682.1) и *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1),  $\beta$ -фруктозидазы из *Thermotoga maritima* (CAA04518.1) и *Arabidopsis thaliana* (CAA52620.1), фруктан-1-экзогидролаза из *Cichorium intybus* (CAC37922.1) и фруктозилтрансфераза из *A. japonicus* (ADK46938.1) [7-21]. Анализ идентичности представленных в работе ферментов проводили с помощью программы BLAST [22].

В таблице 1 приведены показатели гомологичности представленных в работе гликозидаз друг другу. Среди экзоинулиназ наибольшая степень идентичности аминокислотных последовательностей выявлена для ферментов из *A. awamori* и *A. ficuum* и равна 90,88 %. Гомологичность инулиназы из *A. niger* с ферментами из *B. licheniformis* и *G. stearothermophilus* в обоих случаях составляет 28,29% и является наименьшим значением в группе экзоинулиназ. При этом последние идентичны друг другу на 37,1%.

Две формы эндоинулиназы из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) идентичны на 97,87%. Данный показатель является наибольшим для всех обсуждаемых в работе гликозидаз. При этом наименьшее значение идентичности в данной группе, составляющее 27,89 %, показывают ферменты из *A. fumigatus* и *K. marxianus*.

Аминокислотные последовательности  $\beta$ -фруктозидаз из *T. maritima* и *A. thaliana* идентичны друг другу на 32,27%.

Наименьшие значения идентичности с другими представленными в работе ферментами выявлены для экзоинулиназы из *A. niger*. Так, степень гомологии данного белка с одной из форм эндоинулиназы из того же продуцента (EHA19510.1) и энзимом из *A. fumigatus* составляет 23,08%. Кроме того, идентичность экзоинулиназы из *A. niger*  $\beta$ -фруктозидазе из *T. maritima* равна 20,45%, что является наименьшим показателем для всех описанных в работе ферментов.

Приведенные в работе данные показывают значительную вариабельность аминокислотного состава гликозид-гидролаз, что указывает на широкие возможности их применения в различных условиях промышленного гидролиза инулина.

#### Список литературы / References:

1. De Leenheer L. Production and use of inulin: industrial reality with a promising future. *Carbohydrates as organic raw materials*, 1994, vol. 3, pp. 67-92, DOI: 10.1002/9783527614899.
2. Gupta A.K., Kaur N. Fructan storing plants: a potential source of high fructose syrups. *Journal of scientific & industrial research*, 1997, vol. 56, no. 8, pp. 447-452.
3. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A. Structural and functional properties of inulinases. Ways to regulate their activity. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 493–501, DOI: 10.1134/S0006350913040039.
4. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. Исследование структурных особенностей инулиназ из различных продуцентов методом ИК-спектроскопии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2011, № 1, с. 3-7. [Kovaleva T.A., Holyavka M.G. the research of structure features of inulinases from various producers by the method of IR-spectroscopy. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 2011, no. 1, pp. 3-7 (In Russ.)]
5. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. Исследование иммобилизации инулиназы на ионогенных и неионогенных носителях. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 2007, т. 7, № 5, с. 804-810. [Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Taha A.S. Investigation of inulinase immobilization on ionogenic and nonionogenic carriers. *Sorbatic and chromatographic processes*, 2007, vol. 7, no. 5, pp. 804-810. (In Russ.)]
6. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Karpov S.I., Seredin P.V., Artyukhov V.G. Investigation of mechanisms of interaction between inulinase from *Kluyveromyces marxianus* and the matrices of ion exchange resins and fiber. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 223-229. DOI: 10.1134/S0006350914020122.
7. Chapman J.W., Musters W., Rouwenhorst R.J., Toschka H.Y., Verbakel J.M. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA02437.1>.
8. 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., Dijck P.W., Hofmann G., Lasure L.L., Magnuson J.K., Menke H. [et al.] Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome research*, 2011, vol. 21, no. 6, pp. 885-897. DOI: 10.1101/gr.112169.110.
9. Gao J., Xu Y.Y., Yang H.M., Xu H., Xue F., Li S., Feng X.H. Gene cloning, expression, and characterization of an exo-inulinase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2014, vol. 173, no. 6, pp. 1419-1430. DOI: 10.1007/s12010-014-0950-y.

10. Tsujimoto Y., Watanabe A., Nakano K., Watanabe K., Matsui H., Tsuji K., Suzuki Y. Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *Applied microbiology and biotechnology*, 2003, vol. 62, no. 2-3, pp. 180-185. DOI: 10.1007/s00253-003-1261-3.
11. 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. [et al.] Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 2005, vol. 438, no. 7071, p. 1151. DOI: 10.1038/nature04332.
12. Chen H.Q., Chen X.M., Li Y., Wang J., Jin Z.Y., Xu X.M., Xie Z.J. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no. 4, pp. 1206-1212. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.067.
13. Arand M., Golubev A.M., Neto J.B., Polikarpov I., Wattiez R., Korneeva O.S., Chepurayeva, O.V. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochemical Journal*, 2002, vol. 362, no. 1, pp. 131-135. DOI: 10.1042/bj3620131.
14. Wang J.-H., Teng D., Yao Y. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN64131.1>.
15. Yang J.K., Zhang J.W., Mao L., You X., Xiong W. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ANY59682>.
16. Yuan X.L., Goosen C., Kools H., van der Maarel M.J., van den Hondel C.A. J., Dijkhuizen L., Ram A.F. Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 2006, vol. 152, no. 10, pp. 3061-3073. DOI: 10.1099/mic.0.29051-0.
17. Lu W.-D. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGR40655.1>.
18. Liebl W., Brem D., Gotschlich A. Analysis of the gene for  $\beta$ -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, vol. 50, no. 1, pp. 55-64. DOI: 10.1007/s002530051256.
19. Schwebel-Dugué N., El Mtili N., Krivitzky M., Jean-Jacques I., Williams J.H., Thomas M., Lecharny A. *Arabidopsis* gene and cDNA encoding cell-wall invertase. *Plant physiology*, 1994, vol. 104, no. 2, p. 809.
20. Van den Ende W., Michiels A., Van Wonterghem D., Clerens S.P., De Roover J., Van Laere A.J. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology*, 2001, vol. 126, no. 3, pp. 1186-1195. DOI: 10.1104/pp.126.3.1186.
21. Yao Y.H., Hsieh Y.Y., Hsieh C.Y., Lin C.H., Chiang C.M. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADK46938.1>.
22. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 1997, vol. 25, no. 17, pp. 3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.

## ANALYSIS OF THE AMINO-ACID SEQUENCE HOMOLOGY OF GLYCOSIDE-HYDROLASE FROM DIFFERENT PRODUCERS

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

Voronezh State University

Universitetskaya sq. 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

**Abstract.** We studied the homology of amino acid sequences of glycolytic enzymes: exo-inulinases ADM21204.1, A.CAC44220.1, EHA22512.1, AHN08014.1, AGR40655.1 and BAC45010.1, endo-inulinases AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510.1, XP\_748286 .1, ANY59682.1 and AA02437.1,  $\beta$ -fructosidases CAA04518.1 and CAA52620.1, fructan-1-exohydrolase CAC37922.1 and fructosyltransferase ADK46938.1. The highest amino acid sequences identity value among exo-inulinases was detected for the enzymes from *A. awamori* and *A. ficuum* (90.88%), the smallest is between the enzyme from *A. niger* with enzymes from *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* (28.29%). The highest identity value for endo-inulinases is detected between two forms of endo-inulinase from *A. niger* (ABB59681.1 and EHA19510.1) and amounts to 97.87%, which is also the highest indicator for all enzymes presented in the work, the smallest identity is between the enzymes from *A. fumigatus* and *K. marxianus* (27.89%). The smallest indicator of homology among all enzymes presented in the work was detected between exo-inulinase from *A. niger* and  $\beta$ -fructosidase from *T. maritima* and was equal to 20.45%. The data presented in the paper demonstrate a significant amino acid composition of carbohydrates, which indicates the wide possibilities of their use in various conditions of industrial hydrolysis of inulin.

**Key words:** glycoside-hydrolases, homology, amino acid sequences.