



УДК 66.081:577.32:577.15

## Изучение *in silico* структурных особенностей липаз из различных продуцентов как потенциальных агентов для иммобилизации на заряженных и гидрофобных носителях

© 2021 Богомолов Д.Ю.<sup>1</sup>, Сакибаев Ф.А.<sup>1</sup>, Холявка М.Г.<sup>1,2</sup>,  
Артюхов В.Г.<sup>1</sup>, Селеменев В.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж

<sup>2</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь

Поступила в редакцию 10.04.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3640

Липаза – гидролитический фермент, получаемый из многих организмов, таких как животные, растения, грибы и бактерии. Она осуществляет расщепление триглицеридов до моноглицеридов и жирных кислот, при этом обладает широкой субстратной специфичностью. Липазы применяются в пищевой промышленности и других сферах человеческой деятельности. Характерная особенность многих липаз – явление поверхностной активации, обуславливающее свойственную им зависимость скорости каталитической реакции от концентрации и агрегатного состояния субстрата.

Доказано, что функционирование ферментов зависит от их структурных особенностей. Внутренние полости, туннели и поры являются неотъемлемыми компонентами нативной конформации белка. Они играют важную роль в транспорте субстрата, кофакторов и ионов к активному и регуляторным центрам фермента. Кроме того, их конфигурация может влиять на термостабильность энзимов, в связи с чем изучение вышеперечисленных структур является необходимым для понимания механизмов функционирования биокатализаторов. Также важным элементом структуры ферментов являются скопления заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на их поверхности. Данное свойство необходимо учитывать при планировании путей адсорбционной иммобилизации биокатализаторов на различных носителях для использования в промышленности и медицине.

В работе исследованы состав, локализация и конфигурация внутренних полостей, туннелей, пор, а также поверхностных скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков в молекулах липаз из *Rhizopus niveus* (PDB ID: 1LGY), *Rhizomucor miehei* (PDB ID: 3TGL), *Burkholderia cepacia* (PDB ID: 1OIL), панкреатических липаз *Homo sapiens* (PDB ID: 1N8S) и *Equus caballus* (PDB ID: 1HPL). Для расчета параметров и визуализации данных структур использовались программы MOLE и Maestro. Показано наличие соответственно 2, 1, 5, 5 и 2 туннелей и отсутствие пор для данных ферментов; а также наличие по 6 внутренних полостей для липаз из *R. niveus* и *E. caballus*, 5 внутренних полостей для молекулы из *R. miehei* и по 2 внутренних полости для энзимов из *B. cepacia* и *H. sapiens*. Приведены аминокислотный состав и профили туннелей изучаемых липаз. Выявлено, что данные структуры не сообщаются друг с другом общими пустотами. Установлено преобладание гидрофобных аминокислотных остатков в большинстве туннелей данных ферментов. Изучены структура, локализация и состав скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхностях макромолекул. Выявлено возможное влияние расположения данных скоплений на связывание липаз с носителем при их адсорбционной иммобилизации.

**Ключевые слова:** липазы, пространственная структура, внутренние полости, туннели, поры, иммобилизация, адсорбция.

### Введение

Липазы (КФ 3.1.1.3) – группа гидролитических ферментов, получаемых из рас-

тений, животных, грибов и бактерий. Липаза принадлежит к подклассу эстераз класса гидролаз. В живых организмах данный фермент осуществляет расщепление триглицеридов до моноглицеридов и

жирных кислот. При этом липазы обладают широкой субстратной специфичностью и способны к гидролизу не только триглицеридов, но и, к примеру, алифатических, ациклических и ароматических эфиров [1].

Липаза используется в пищевой промышленности при производстве сыров и в хлебопечении для осуществления переэтерификации триглицеридов и получения таким образом новых вкусовых свойств продуктов [2]. Другим направлением применения липазы в промышленности является получение биотоплива [3-5].

Липазы являются перспективными агентами для включения в состав фармацевтических препаратов. Было показано, что липаза *C. rugosa* снижает уровень холестерина в сыворотке крови. Липаза *S. marcescens* широко используется для асимметричного гидролиза эфира 3-фенилглицидной кислоты, который является жизненно важным промежуточным продуктом в синтезе гидрохлорида дилтиазема [6, 7].

Липаза проявляет низкую активность по отношению к мономерным субстратам, а в присутствии агрегатов молекул (мицеллы, ламеллы) активность фермента существенно увеличивается. Данное свойство связано с такой особенностью строения энзима, как наличие структуры, называемой «крышкой». Эта структура представлена в виде амфифильной петли, прикрывающей активный центр фермента при отсутствии поверхности раздела фаз и препятствующей доступу к нему субстрата. В результате контакта фермента с поверхностью раздела липид-вода происходит смещение петли, напоминающее «открывание крышки». Изменение положения «крышки» делает доступным активный центр и большую гидрофобную поверхность энзима, отвечающую за связывание липазы с гидрофобным субстратом. Вышеописанный механизм называется поверхностной активацией. Доказательством его существования может служить отсутствие эффекта поверхностной активации для липаз, в

структуре которых не имеется «крышки», либо крышка которых содержит в себе недостаточное количество аминокислотных остатков для того, чтобы закрывать активный центр [1, 8-10].

Известно, что функционирование ферментов во многом определяется их пространственной структурой. Строение биокатализаторов может оказывать значительное влияние на их каталитическую активность как непосредственно через механизм взаимодействия с субстратом, так и через изменение физико-химических свойств белка. Доказано, что изменения в составе и структуре внутренних полостей, туннелей и пор путем направленного мутагенеза приводят к изменению термостабильности макромолекул. Кроме того, данные структуры участвуют в транспорте веществ к активному центру фермента, что также играет значительную роль в функционировании энзимов [11-13].

Биотехнологическое использование ферментов в свободной форме накладывает ряд ограничений на организацию процесса. Так, возникает потребность в очистке конечного продукта от молекул энзима. Кроме того, свободный биокатализатор имеет низкую стабильность, в связи с чем он подвержен действию агрессивных факторов среды. Данная проблема может быть решена путем иммобилизации молекул фермента на матрице нерастворимого носителя.

Иммобилизация энзимов за счет сорбции на природных и синтетических носителях является наиболее предпочтительной с точки зрения сохранения их каталитической способности, поскольку реализуется за счет слабых взаимодействий, а конформационная подвижность фермента ограничивается в незначительной степени, что приводит к сохранению высокой доли его активности. Показано, что иммобилизация липазы из *Rhizopus oryzae* на неионогенном «Стиросорбе» позволяет получить гетерогенный препарат с незначительной потерей активности: массовая доля продуктов гидролиза

составляет  $7.5 \pm 0.39\%$  для адсорбированного энзима при  $9.84 \pm 0.49\%$  для свободного фермента [14].

Некоторые белки, в том числе липазы, можно использовать в качестве носителей для иммобилизации других лигандов (т.е. в качестве сорбатов). Известно, что многие ферменты в клетке функционируют в тесном контакте с липидами и белками. По этой причине полагают, что изучение поведения ферментов, иммобилизованных на белковых матрицах, позволит лучше понять закономерности их функционирования *in vivo*. С точки зрения практической значимости важными свойствами этих носителей являются высокая адсорбционная ёмкость и способность к биодegradации, а также возможность применения большинства из них в виде тонкой пленки (толщиной 80 мкм). Иммобилизацию на белковых носителях можно проводить как в присутствии, так и отсутствии сшивающих агентов. К недостаткам белков как носителей, в частности для медицинских препаратов, используемых *in vivo*, следует отнести высокую иммуногенность. При иммобилизации лигандов на носителях белковой природы необходимо учитывать диффузионные ограничения, определяемые их макромолекулярной структурой [15]. Кроме того, сложность белка как адсорбата и адсорбента связана с неоднородностью его свойств: присутствием на поверхности неодинаковых контактных участков, возможностью многоточечного связывания макромолекулы с носителем, для некоторых ферментов – с их олигомерностью. Поэтому при контакте белка с различными типами лигандов необходимо учитывать не только электростатические, но и возможные ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия между ними [16].

Изучение распределения заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности ферментов может быть полезным при разработке гетерогенных катализаторов для использования

в промышленности, так как от этого зависит, насколько сильно фермент может потерять свою активность в ходе иммобилизации [17, 18].

Целью нашей работы было изучение состава, локализации и структуры внутренних полостей, туннелей, пор в молекулах липаз из различных продуцентов, а также скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на их поверхности для разработки методов иммобилизации данных ферментов.

### Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования выступали панкреатическая липаза лошади *Equus caballus* (PDB ID: 1HPL) [19], липазы из *Rhizomucor miehei* (PDB ID: 3TGL) [20], *Burkholderia cepacia* (PDB ID: 1OIL) [21], *Rhizopus niveus* (PDB ID: 1LGY) [22], а также панкреатическая липаза человека *Homo sapiens* (PDB ID: 1N8S) [23].

Расчет определяемых параметров и визуализацию внутренних полостей, туннелей и пор осуществляли в программе MOLE 2.5.17.4.24. Под «полостью» понимали свободное замкнутое пространство внутри глобулы фермента, не сообщающееся 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» подразумевали сквозное отверстие в белковой глобуле, т.е. свободное пространство внутри молекулы, сообщающееся с ее поверхностью через два и более отверстий.

Визуализацию скоплений заряженных и гидрофобных аминокислот производили в программе Maestro. Критерием группировки аминокислотных остатков в локальное скопление являлась степень их удаленности друг от друга. Остатки мы относили к одному скоплению, если расстояния ( $r$ ) между ближайшими атомами данных аминокислот не превышали 10 Å.

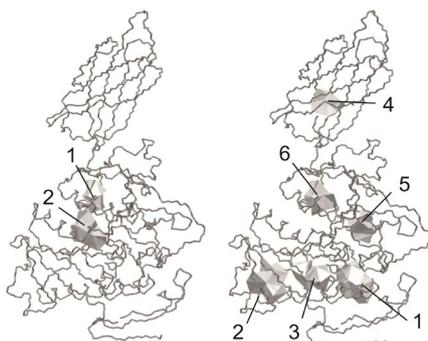


Рис. 1. Структура и расположение внутренних полостей (выделены серым цветом) в составе панкреатической липазы *H. sapiens* (слева) и *E. caballus* (справа)  
 Fig. 1. The structure and location of interior cavities (highlighted in grey) in the composition of the pancreatic lipase *H. sapiens* (left) and *E. caballus* (right)

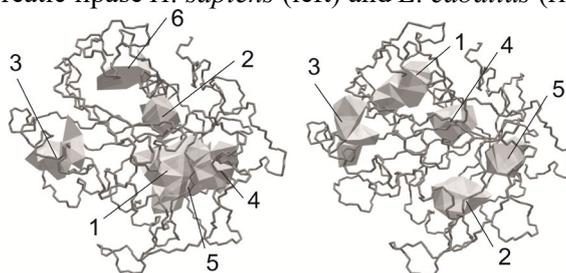


Рис. 2. Структура и расположение внутренних полостей (выделены серым цветом) в составе липаз из *R. niveus* (слева) и *R. miehei* (справа)  
 Fig. 2. The structure and location of interior cavities (highlighted in grey) in the composition of the lipases from *R. niveus* (left) and *R. miehei* (right)

## Обсуждение результатов

Состав, локализация и структура внутренних полостей и туннелей в молекулах липаз из различных продуцентов. В составе липаз из *R. niveus* и *E. caballus* обнаружено 6 внутренних полостей. По 2 внутренние полости наблюдалось в липазах из *B. ceracia* и *H. sapiens*. В структуре липазы из *R. miehei* выявлено наличие 5 внутренних полостей. Панкреатические липазы *H. sapiens* и *E. caballus* имеют сходную по локализации пару внутренних полостей (рис. 1). Кроме того, 5 пар внутренних полостей, схожих по расположению, но несколько различающихся по структуре, имеют молекулы липаз из *R. niveus* и *R. miehei* (рис. 2). Липаза из *B. ceracia* отличается по своей структуре от других представленных в работе энзимов. Вероятно, в связи с этим белок не имеет внутренних полостей и туннелей, схожих по расположению с остальными

представленными в работе макромолекулами (рис. 3).

Анализ пространственных моделей исследуемых липаз показал отсутствие пор в них.

Только 1 туннель обнаружен в составе липазы из *R. miehei*. Ферменты из *R. niveus* и *E. caballus* имеют в своем составе по 2 туннеля. Панкреатическая липаза *H. sapiens* и молекула из *B. ceracia* имеют в своем составе по 5 туннелей. Аминокислотный состав туннелей липаз различного происхождения представлен в таблице 1.

Обнаружена сходная по расположению и аминокислотному составу пара туннелей в молекулах панкреатических липаз из *H. sapiens* и *E. caballus* (табл. 1, рис. 4). Также выявлены близкие по локализации и аминокислотному составу (табл. 1) туннели в ферментах из *R. niveus* и *R. miehei* (рис. 5). Молекула липазы из

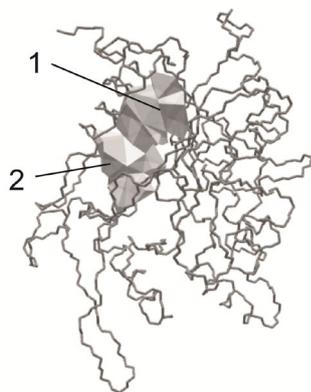


Рис. 3. Структура и расположение внутренних полостей (выделены серым цветом) в составе липазы из *B. ceracia*  
Fig. 3. The structure and location of interior cavities (highlighted in grey) in the composition of the lipase from *B. ceracia*

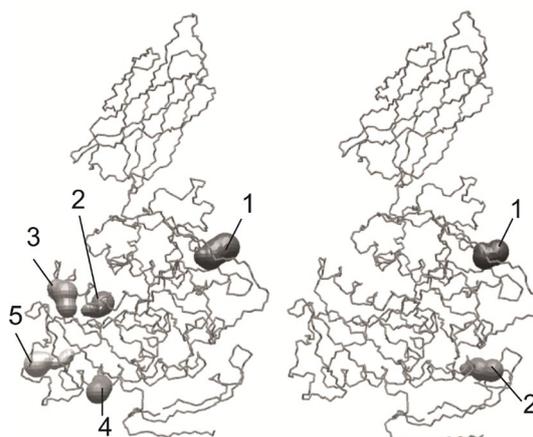


Рис. 4. Структура и расположение туннелей (выделены серым цветом) в составе панкреатической липазы *H. sapiens* (слева) и *E. caballus* (справа)  
Fig. 4. The structure and location of tunnels (highlighted in grey) in the composition of pancreatic lipase *H. sapiens* (left) and *E. caballus* (right)

Таблица 1. Аминокислотный состав туннелей в молекулах липазы из различных продуцентов

Table 1. Amino acid composition of tunnels in lipase molecules from different producers

Источник липазы	№ туннеля	Аминокислоты
<i>E. caballus</i>	1	Asp205, Ala207, Asn212, Lys232, Glu233, Lys239, Asn262
	2	Arg23, Pro24, Leu25, Ser115, Ser118, Gln119, Cys181
<i>R. niveus</i>	1	Ala25, Val41, Gln42, Asn264, Cys268, Leu269
	2	Ile194, Pro195, Phe196, Gly220, Val221, Glu238
<i>R. miehei</i>	1	Ala25, Asn26, Cys29, Ile41, His42, Asn264, Cys268, Thr269
<i>H. sapiens</i>	1	Ala207, Asn212, Gly233, Lys239, Asn240, Asn262
	2	Lys69, Thr70, Arg71, Ser144, Asn145, Val146, His147, Arg171, Asp312
	3	Tyr41, Pro46, Asn47, Ala87, Lys91
	4	Arg7, Phe38, Ala53, Ala54, Glu127, Tyr130, Phe131
	5	Ile59, Phe64, Thr66, Leu135, Phe139, Tyr141
<i>B. ceracia</i>	1	Asp55, Asp56, Leu91, Pro113, Gly116, Thr166, Leu167, Gln171, Ala172, Tyr175
	2	His15, Thr20, Asp21, Lys22, Glu28, Tyr29, Trp30, Val46
	3	Arg94, Tyr95, Ala98, Tyr175, Tyr179, Pro180, Ser181, Glu197, Val199
	4	Thr18, Gly19, Asn48, Leu49, Gly51, Gly147, Thr150, Ser151, Ser153, Asn155, Gln158
	5	Leu17, Ser87, Gln88, Leu167, Val266, His286

*B. ceracia* не имеет в своем составе туннелей, сходных по своему расположению с другими липазами, исследуемыми в данной работе (рис. 6).

Профили туннелей, входящих в состав липаз различного происхождения, пред-

ставлены на рис. 7. Установлено, что туннели, содержащиеся в макромолекулах липаз, не сообщаются общими пустотами.

Доля гидрофобных аминокислотных остатков в составе туннелей составляет: для панкреатической липазы из

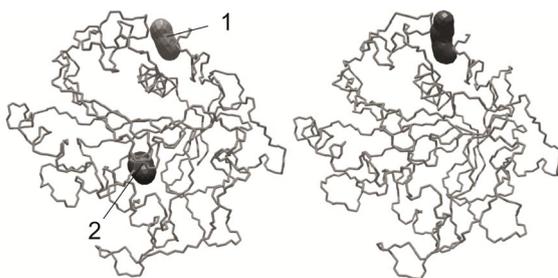


Рис. 5. Структура и расположение туннелей (выделены серым цветом) в составе липаз из *R. niveus* (слева) и *R. miehei* (справа)

Fig. 5. The structure and location of tunnels (highlighted in grey) in the composition of the lipases from *R. niveus* (left) and *R. miehei* (right)

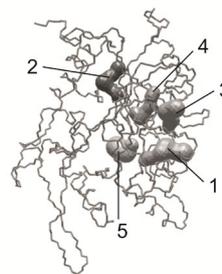


Рис. 6. Структура и расположение туннелей (выделены серым цветом) в составе липазы из *B. cepacia*

Fig. 6. The structure and location of tunnels (highlighted in grey) in the composition of the lipase from *B. cepacia*

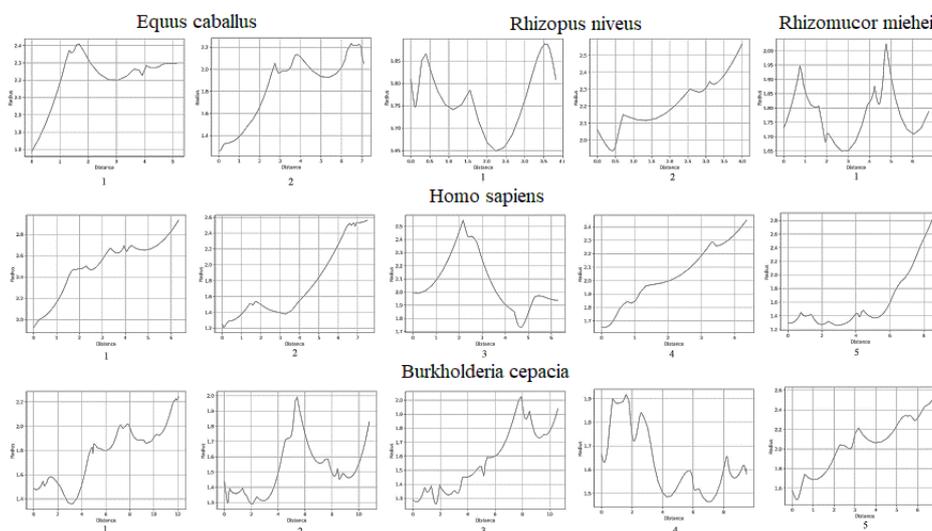


Рис. 7. Профили туннелей, входящих в состав липаз различного происхождения  
Fig. 7. Tunnel profiles present in lipases of various origins

*E. caballus* – 21%, для липазы из *R. niveus* – 58%, для фермента из *R. miehei* – 25%, для панкреатической липазы *H. sapiens* – 36%, для липазы из *B. cepacia* – 30%.

Доля заряженных аминокислотных остатков в составе туннелей для липаз различного происхождения составляет: *E. caballus* – 36%, *R. niveus* – 8%, *R. miehei* – 12.5%, *H. sapiens* – 27%, *B. cepacia* – 20%.

Состав и локализация скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности липаз из различных продуцентов. Нами были исследованы поверхности представленных в работе липаз. Вычислены расстояния ( $r$ ) между аминокислотными остатками на

поверхности ферментов на основе координат атомов в их составе по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2},$$

где  $x_1$  и  $x_2$  – координаты атомов двух аминокислот по оси абсцисс,  $y_1$  и  $y_2$  – координаты атомов аминокислот по оси ординат,  $z_1$  и  $z_2$  – координаты по оси аппликат. В случае, если расстояние между ближайшими друг к другу атомами двух аминокислот не превышало 10 Å, они были отнесены нами к одному скоплению.

Обнаружено по 6 скоплениям заряженных аминокислотных остатков на поверхности панкреатических липаз из *E. caballus* и *H. sapiens*, 4 таких скопления

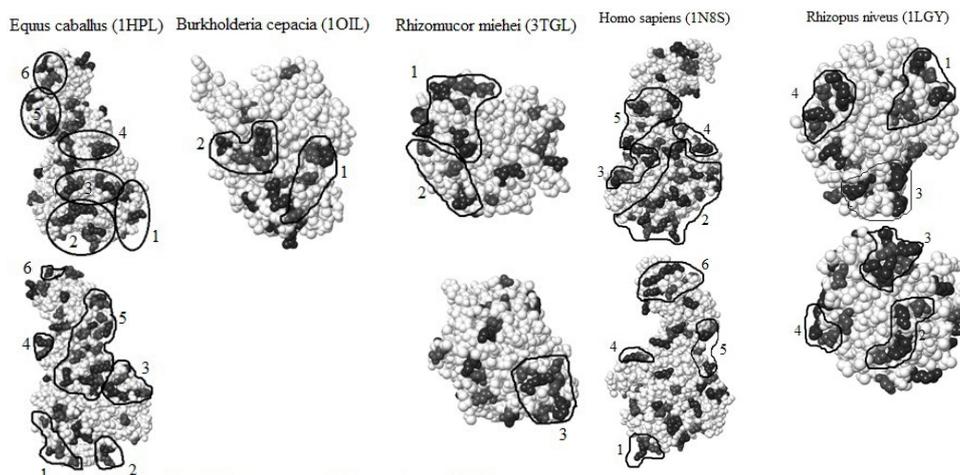


Рис. 8. Скопления заряженных аминокислотных остатков на поверхности липаз различного происхождения (снизу изображена модель, повернутая на  $90^\circ$  относительно изображения сверху; черным выделены отрицательно заряженные аминокислотные остатки, серым – положительно заряженные остатки)

Fig. 8. Accumulations of charged amino acid residues on the surface of lipases of various origins (the model shown below is rotated by  $90^\circ$  relative to the image above; negatively charged amino acid residues are highlighted in black, positively charged residues are highlighted in grey)

на поверхности липазы из *R. niveus*, 3 для фермента из *R. miehei* и 2 для энзима из *B. cepacia* (рис. 8, табл. 2).

В составе панкреатической липазы из *E. caballus* выявлено 2 скопления заряженных аминокислотных остатков, расположенных близко к «крышке», прикрывающей активный центр фермента. Данные скопления характеризуются преобладанием отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Поэтому при адсорбционной иммобилизации данного биокатализатора на положительно заряженных носителях значительное снижение активности в результате экранирования активного центра фермента, а также вследствие нарушения механизма поверхностной активации более вероятно, чем в случае использования отрицательно заряженных полимеров в качестве матриц для иммобилизации.

Для панкреатической липазы *H. sapiens* также обнаружено 2 скопления, расположенных в непосредственной близости к активному центру фермента. Данная особенность может указывать на то, что экранирование субстрата возможно при связывании как с положительно заряженными, так и с отрицательно заряженными носителями.

На поверхности липазы из *R. niveus* не наблюдалось скоплений заряженных аминокислотных остатков, локализованных в непосредственной близости к «крышке», прикрывающей активный центр. Такое распределение аминокислотных остатков может говорить о вероятном связывании молекулы энзима с любым заряженным носителем без значительной потери каталитической активности.

В составе липазы из *R. miehei* также не обнаружено скоплений заряженных аминокислотных остатков, связывание с которыми при адсорбционной иммобилизации на заряженных носителях могло бы значительно снизить активность липазы путем перекрытия ее активного центра.

При адсорбционной иммобилизации липазы из *B. cepacia* на заряженных носителях тоже маловероятно значительное снижение каталитической активности фермента в связи с экранированием его активного центра, так как скоплений заряженных аминокислотных остатков, расположенных близко к активному центру, не обнаружено.

Адсорбционная иммобилизация липаз на гидрофобных носителях представляет большой интерес, так как существуют

Таблица 2. Состав скоплений заряженных аминокислотных остатков на поверхности липаз различного происхождения

Table 2. Composition of accumulations of charged amino acid residues on the surface of lipases of various origins

<i>Equus caballus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Glu2, Asp14, Glu22, Lys26	Lys1, Glu2, Asp14, His26	Asp2, Lys22, Glu28, Glu35
Glu6, Arg7, Glu32, Lys33, Arg37, Glu51, Asp55, Arg111, Arg163, Arg164	Glu6, Arg7, Lys32, Asp33, Arg37, Glu51, Asp55, Lys107, Asp79, Lys80, Glu83, Arg111, Glu133, Arg163, Arg164, Asp249, Glu253, Arg256, Asp257, Lys268	Lys283, Arg297, Glu302, Asp303
Asp79, Lys80, Glu83, Asp247, Asp249, Arg256, Asp257	Glu44, Lys65, Lys69, Lys91, Lys95	
Lys232, Glu233, Lys239, Asp331	Glu233, Lys238, Lys239, Asp331	
Asp278, Glu302, Asp312, Arg313, Arg317, Lys319, Lys363, Arg367, Asp389, Asp394, Glu396, Lys397, Asp426	Asp278, Arg313, Lys363, Lys367, Asp389, Asp394, Lys428	
Lys349, Lys350, Lys377, Asp379, Lys414, Lys419, Glu435, Glu436, Arg439, Glu440, Asp441	Lys349, Lys350, Lys377, Asp379, Arg414, Glu436	
<i>Rhizopus niveus</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>	
Lys5, Glu190, Lys226, Glu238, Lys242, Asp243	Arg30, Asp39, His42, Asp44, Glu47, Asp48, Lys50, Lys53, Asp70, Glu72, Lys73, Lys137	
Arg30, Lys37, Asp39, Asp62	Asp61, Lys109, Glu117, Glu121	
Lys51, Lys72, Lys74, Lys138, Arg164, Lys168	Asp128, Lys131, Glu161, Arg160, Glu162	
Asp99, Lys101, Lys104, Lys107, Glu117		

данные, согласно которым, благодаря явлению поверхностной активации, использование данного типа иммобилизации может не только не уменьшить, но и увеличить активность фермента, так как «крышка», прикрывающая активный центр, при связывании с гидрофобным носителем находится в «открытой» конформации, что повышает доступность каталитического центра для субстрата. Тем не менее, связывание носителя со скоплениями, частично входящими в состав «крышки», может привести к потере активности в связи с экранированием ак-

тивного центра, что необходимо учитывать при разработке гетерогенных катализаторов на основе представленных в работе ферментов.

На поверхностях молекул панкреатических липаз *H. sapiens* и *E. caballus* обнаружено по 5 скоплений гидрофобных аминокислотных остатков. В составе липаз из *R. niveus*, *R. miehei* и *B. cepacia* обнаружено 5, 3 и 7 скоплений гидрофобных аминокислотных остатков соответственно (рис. 9, табл. 3).

Скопления гидрофобных аминокислотных остатков, находящиеся в непо-

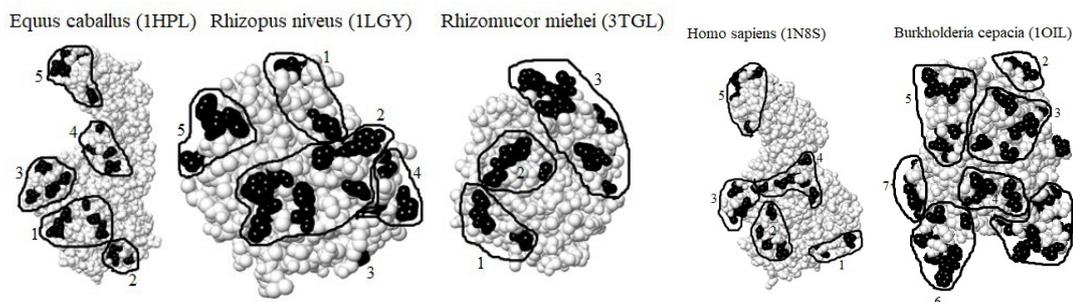


Рис. 9. Скопления гидрофобных аминокислотных остатков (выделены черным цветом) на поверхности липаз различного происхождения

Fig. 9. Accumulations of hydrophobic amino acid residues (highlighted in black) on the surface of lipases of various origins

Таблица 3. Состав скоплений гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности липаз различного происхождения

Table 3. Composition of accumulations of hydrophobic amino acid residues on the surface of lipases of various origins

<i>Equus caballus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Val21, Pro24, Leu25, Gly184, Pro186, Leu188	Tyr130, Ala138, Phe139, Gly140	Leu17, Ala24, Gly25, Val26, Phe122, Val126, Ala128, Tyr129, Pro131, Leu134, Val138, Ile139, Ala141, Phe142, Val145, Phe146, Leu149, Leu161
Tyr5, Val53, Pro56, Tyr130	Gly184, Pro186, Leu188, Val220	Tyr45, Ala67, Ala74, Ala75, Gly77
Pro208, Ile210, Val241, Leu242, Ile245	Pro208, Val210, Val232, Ile241, Leu242, Ile245	Ala98, Val99, Pro180, Ala182, Gly200, Gly201
Ala286, Tyr288, Ala293, Leu324	Pro284, Ala286, Pro300, Gly302, Gly303, Pro315, Val426	Ala170, Ala173, Ala186, Pro187, Gly188
Phe372, Tyr403, Val407, Ile408, Leu410, Leu412, Val442, Leu443	Phe372, Tyr403, Val407, Ile408, Pro410, Leu412, Val442, Leu443	Pro195, Val277, Leu278, Leu317, Ala318, Gly319
		Pro216, Ile218, Val220, Phe221, Gly222, Val223, Gly259
		Tyr31, Ile232, Pro233, Leu234, Val235, Pro237, Ala240, Leu241, Pro243, Leu246, Ala247, Leu294, Ala299
<i>Rhizopus niveus</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>	
Val6, Val7, Ala8, Ile239	Val95, Pro96, Pro100, Pro101, Gly104, Tyr158, Pro182, Ala183, Val189, Gly192, Pro210, Ala211, Ala212, Phe213, Val249, Pro250, Phe251	
Val94, Phe95, Phe97, Gly105, Pro183, Tyr187, Phe214	Leu58, Ile59, Tyr60, Glu116	
Ile53, Pro125, Ala133, Pro135	Pro34, Gly35, Ala36, Ile52	
Pro102, Tyr159, Pro163, Pro167, Gly193, Pro195		

средственной близости к «крышке», прикрывающей активный центр, обнаружены по одному в составе панкреатических липаз из *E. caballus* и *H. sapiens*, а также два скопления выявлено на поверхности липазы из *B. ceracia*, что говорит о возможном сильном понижении активности из-за экранирования субстрата от активного центра фермента после его иммобилизации на гидрофобных носителях. Для липаз из *R. niveus* и *R. miehei* скопленных гидрофобных аминокислотных остатков, локализованных близко к активному центру, нами не обнаружено.

Особенности молекулярной организации липаз могут играть ключевую роль в появлении супрамолекулярных структур и мицеллярных микрореакторов [24], которые могут образовываться на твердых поверхностях, формируя гемимицеллы (полумицеллы) или адмицеллы (адсорбционные бислои) на границе с раствором [25].

### Заключение

Липазы являются перспективными агентами для применения в промышленности и медицине. Ферменты данной группы способны снижать уровень холестерина в крови, а также могут использоваться при производстве лекарственных препаратов.

Перспективным методом иммобилизации ферментов является сорбция на матрице нерастворимого носителя. Данный способ создания гетерогенного катализатора реализуется за счет слабых взаимодействий, что способствует сохранению значительной степени конформационной подвижности молекулы биокатализатора и, как следствие, низкой потере активности.

Подробное изучение пространственной структуры липаз необходимо для понимания особенностей их функционирования, а также является важным этапом разработки на их основе катализаторов для биотехнологического использования, например, путем адсорбционной иммобилизации.

В данной работе установлено наличие 6 внутренних полостей для панкреатической липазы из *E. caballus* и липазы из *R. niveus*, 2 внутренних полостей для ферментов из *H. sapiens* и *B. ceracia* и 5 структур названного типа для энзима, источником которого является *R. miehei*.

Липаза из *R. miehei* содержит 1 туннель. Ферменты из *R. niveus* и *E. caballus* включают по 2 туннеля. Панкреатическая липаза *H. sapiens* и молекула из *B. ceracia* содержат по 5 туннелей.

Показано, что в составе туннелей этих ферментов количество гидрофобных аминокислотных остатков преобладает над числом полярных заряженных. Однако исключением является панкреатическая липаза *E. caballus*, в составе туннелей которой больше заряженных аминокислотных остатков, чем гидрофобных. Установлено, что туннели в данных липазах не сообщаются друг с другом общими полостями. Кроме того, выявлено отсутствие пор во всех молекулах липаз, исследованных в нашей работе.

Помимо этого, изучены состав и локализация скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхностях липаз различного происхождения. Обнаружено по 6 скоплений заряженных аминокислотных остатков на поверхности панкреатических липаз из *E. caballus* и *H. sapiens*, 4 таких скопления на поверхности липазы из *R. niveus*, 3 для фермента из *R. miehei* и 2 для энзима из *B. ceracia*. Для иммобилизации фермента из *E. caballus* наиболее перспективными будут отрицательно заряженные носители, т.к. при связывании с ними наиболее вероятно не будет экранирован активный центр биокатализатора. Для липаз из *R. niveus*, *R. miehei* и *B. ceracia* не обнаружено скоплений заряженных аминокислотных остатков, при связывании с которыми носитель мог бы экранировать субстрат от активного центра фермента. Энзим из *H. sapiens* характеризуется наличием скоплений заряженных остатков в непосредственной близости к активному центру, что может приводить к

значительному снижению его активности при связывании с матрицами заряженных полимеров.

На поверхностях панкреатических липаз *H. sapiens* и *E. caballus* обнаружено по 5 скопления гидрофобных аминокислотных остатков. В составе липаз из *R. niveus*, *R. miehei* и *B. serasia* выявлено 5, 3 и 7 скопления гидрофобных аминокислотных остатков соответственно. В составе всех ферментов наблюдаются скопления гидрофобных аминокислот, находящихся

на «крышке», что может указывать на вероятное перекрытие активного центра исследуемых липаз при их иммобилизации на гидрофобных носителях и значительное снижение каталитической активности образцов.

Приведенные результаты необходимо учитывать при разработке промышленных биокатализаторов и медицинских препаратов путем адсорбционной иммобилизации исследуемых в работе липаз.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044*

### Список литературы

1. Adlercreutz P. // *Chemical Society Reviews*. 2013. Vol. 42(15). pp. 6406-6436.
2. Raveendran S., Parameswaran B., Beevi Ummalyma S., Abraham A. et al. // *Food Technol Biotechnol*. 2018. Vol. 56(1). pp. 16-30.
3. Iso M., Chen B., Eguchi M., Kudo T. et al. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2001. Vol. 16(1). pp. 53-58.
4. Quayson E., Amoah J., Hama S., Kondo A. et al. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020. Vol. 134. P. 110355.
5. Zeng H., Liao K., Deng X., Jiang H. et al. // *Process Biochemistry*. 2009. Vol. 44(8). pp. 791-798.
6. Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V. BioMed research international, 2013. Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/329121/>.
7. Sharma S., Kanwar S.S. // *The Scientific World Journal*, 2014. Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/625258/>.
8. Hjorth A., Carrière F., Cudrey C., Wöldike H. et al. // *Biochemistry*. 1993. Vol. 32(18). pp. 4702-4707.
9. van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Martinez C., Rugani N. et al. // *Nature*. 1993. Vol. 362(6423). pp. 814-820.
10. Zorica D., Knezevic Slavica S., Siler-Marinkovic et al. // *APTEFF*. 2004. pp. 151-164.
11. Coleman R.G., Sharp K.A. // *Journal of chemical information and modeling*. 2010. Vol. 50(4). pp. 589-603.
12. Kokkonen P., Bednar D., Pinto G., Prokop Z. et al. // *Biotechnology advances*. 2019. Vol. 37(6). p. 107386.
13. Wojcechowsky K.J., Seebeck F.P., Hilvert D. // *Protein science*. 2006. Vol. 15(5). pp. 1106-1114.
14. Шеламова С.А., Селеменев В.Ф., Крылов И.А., Янышева Н.В. и др. // *Биотехнология*. 2007. № 3. С. 52-57.
15. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Инулиназы в условиях различного микроокружения: биофизические, кинетические и структурно-функциональные свойства. Воронеж: Издательский дом ВГУ. 2018. 288 с.
16. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение. Воронеж: Издательский дом ВГУ. 2017. 261 с.
17. Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B. // *Adsorption*. 2014. Vol. 20(5-6). pp. 801-821.
18. Klibanov A.M. // *Nature*. 2000. Vol. 409(6817). pp. 241-246.
19. Bourne Y., Martinez C., Kerfelec B., Lombardo D. et al. // *Journal of molecular biology*. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1HPL>
20. Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E.J., Dodson G.G. et al. // *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3TGL>
21. Kim K.K., Song H.K., Shin D.H., Hwang K.Y. et al. // *Structure*. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1OIL>
22. Kohno M., Funatsu J., Mikami B., Kugimiya W. Et al. // *The Journal of Biochemistry*.

- Режим доступа: 24. Селеменов В.Ф., Рудаков О.Б., Елисеева Т.В., Воронюк И.В. и др. // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2021. № 1. С. 20-35.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1LGY>  
23. van Tilbeurgh H, Sarda L, Verger R, Cambillau C. // *Nature*. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1N8S>  
25. Морис П. Поверхность и межфазные границы в окружающей среде. От наноразмера к глобальному масштабу. М. Бином. Лаборатория знаний. 2015. 540 с.

## ***In silico* study of structural features of lipases from various producers as potential agents for immobilisation on charged and hydrophobic carriers**

© 2021 Bogomolov D.Yu.<sup>1</sup>, Sakibaev F.A.<sup>1</sup>, Holyavka M.G.<sup>1,2</sup>,  
Artyukhov V.G.<sup>1</sup>, Selemenev V.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Voronezh State University, Voronezh*

<sup>2</sup>*Sevastopol State University, Sevastopol*

Lipase is a hydrolytic enzyme derived from many organisms such as animals, plants, fungi, and bacteria. It splits triglycerides to monoglycerides and fatty acids. Additionally, it has a broad substrate specificity.

Lipases are used in the food industry and other areas of human activity. A characteristic feature of many lipases is the phenomenon of surface activation, which determines their characteristic dependence of the rate of the catalytic reaction on the concentration and the matter state of the substrate.

It has been proven that the functioning of enzymes depends on their structural features. Interior cavities, tunnels, and pores are integral components of the native protein conformation. They play an important role in the transport of the substrate, cofactors, and ions to the active and allosteric sites of the enzyme. In addition, their configuration can affect the thermal stability of enzymes. Therefore, the study of the above-mentioned structures is necessary to understand the mechanisms of biocatalysts' functioning. Also, an important element of the enzyme structure is the accumulation of charged and hydrophobic amino acid residues on their surface. This property must be taken into account when planning routes for the adsorption immobilisation of biocatalysts on various carriers to be used in industry and medicine.

The work investigated the composition, localisation, and configuration of interior cavities, tunnels, pores, and surface accumulations of charged and hydrophobic amino acid residues in lipase molecules from *Rhizopus niveus* (PDB ID: 1LGY), *Rhizomucor miehei* (PDB ID: 3TGL), *Burkholderia cepacia* (PDB ID: 1OIL), pancreatic lipases *Homo sapiens* (PDB ID: 1N8S) and *Equus caballus* (PDB ID: 1HPL). The MOLE and Maestro software were used to calculate the parameters and to visualise the structures. It was shown that there are 2, 1, 5, 5, and 2 tunnels, respectively, and no pores for these enzymes; as well as there were 6 interior cavities for lipases from *R. niveus* and *E. caballus*, 5 interior cavities for a molecule from *R. miehei* and 2 interior cavities for enzymes from *B. cepacia* and *H. sapiens*. The amino acid composition and profiles of the tunnels of the studied lipases were presented. It was revealed that these structures were not connected with each other via common voids. It was established that hydrophobic amino acid residues dominate in most of the tunnels of these enzymes. The structure, localisation, and composition of accumulations of charged and hydrophobic amino acid residues on the surfaces of macromolecules were studied. It was revealed that the location of these accumulations might influence the binding of lipases with the carrier during their adsorption immobilisation.

**Keywords:** lipases, spatial structure, interior cavities, tunnels, pores, immobilisation, adsorption.

### **References**

1. Adlercreutz P., *Chemical Society Reviews*, 2013, Vol. 42(15), pp. 6406-6436.
2. Raveendran S., Parameswaran B., Beevi Ummalyma S., Abraham A. et al., *Food Technol Biotechnol.*, 2018, Vol. 56(1), pp. 16-30.
3. Iso M., Chen B., Eguchi M., Kudo T. et al., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, Vol. 16(1), pp. 53-58.
4. Quayson E., Amoah J., Hama S., Kondo A. et al., *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2020, Vol. 134, p. 110355.
5. Zeng H., Liao K., Deng X., Jiang H. et al., *Process Biochemistry*, 2009, Vol. 44(8), pp. 791-798.

6. Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V., *Bio-Med research international*, 2013. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/329121/>.
7. Sharma S., Kanwar S.S., *The Scientific World Journal*, 2014. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/625258/>.
8. Hjorth A., Carrière F., Cudrey C., Wöldike H. et al., *Biochemistry*, 1993, Vol. 32(18), pp. 4702-4707.
9. van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Martinez C., Rugani N. et al., *Nature*, 1993, Vol. 362(6423), pp. 814-820.
10. Zorica D., Knezevic S.S., Siler-Marinkovic, Ljiljana V., *APTEFF*, 2004, pp. 151-164.
11. Coleman R.G., Sharp K.A., *Journal of chemical information and modeling*, 2010, Vol. 50(4), pp. 589-603.
12. Kokkonen P., Bednar D., Pinto G., Prokop Z. et al., *J. Biotechnology advances*, 2019, Vol. 37(6), p. 107386.
13. Woycechowsky K.J., Seebeck F.P., Hilvert D., *Protein science*, 2006, Vol. 15(5), pp. 1106-1114.
14. Shelamova S.A., Selemenev V.F., Krylov I.A., Yanysheva N.V. et al., *Biotehnologiya*, 2007, No 3, pp. 52-57.
15. Holyavka M.G., Artyuhov V.G. Inulinazy v usloviyah razlichnogo mikrookruzheniya: biofizicheskie, kineticheskie i strukturno-funkcional'nye svoystva, Voronezh, Izdatel'skij dom VGU, 2018, 288 p.
16. Holyavka M.G., Artyuhov V.G. Immobilizovannyye biologicheskie sistemy: biofizicheskie aspekty i prakticheskoe primenenie (uchebnoe posobie). Izdatel'skij dom VGU, 2017, 261 p.
17. Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B., *Adsorption*, 2014, Vol. 20(5-6), pp. 801-821.
18. Klibanov A.M., *Nature*, 200, Vol. 409(6817), pp. 241.
19. Bourne Y., Martinez C., Kerfelec B., Lombardo D. et al., *Journal of molecular biology*, 1994, Vol. 238(5), pp. 709-732. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1HPL>
20. Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E.J., Dodson G.G. et al. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 1992, Vol. 48(3), pp. 307-319. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3TGL>
21. Kim K.K., Song H.K., Shin D.H., Hwang K.Y. et al. *Structure*, 1997, Vol. 5(12), pp. 1571-1584. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1OIL>
22. Kohno M., Funatsu J., Mikami B., Kugimiya W. et al., *The Journal of Biochemistry*, 1996, Vol. 120(3), pp. 505-510. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1LGY>
23. van Tilbeurgh H., Sarda L., Verger R., Cambillau C., *Nature*, 1992, Vol. 359(6391), pp. 159-162. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1N8S>
24. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Eliseeva T.V., Voronyuk I.V. et al., *Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*, 2021, No 1, pp. 20-35.
25. Moris P. Poverhnost' i mezhfaznye granicy v okruzhayushchej srede. Ot nanourovnya k global'nomu masshtabu. M., Binom. Laboratoriya znaniy, 2015, 540 p.

**Богомолов Даниил Юрьевич** – студент кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Сакибаев Фархат Адильжанович** – аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Холявка Марина Геннадьевна** – доцент кафедры биофизики и биотехнологии, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет, Севастополь

**Артюхов Валерий Григорьевич** – д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Семенов Владимир Федорович** – профессор кафедры аналитической химии, д.х.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

**Bogomolov Daniil Yu.** – student, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [danyabogomoloff@yandex.ru](mailto:danyabogomoloff@yandex.ru)

**Sakibaev Farkhat A.** – postgraduate student, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [farkhatlukum@gmail.com](mailto:farkhatlukum@gmail.com)

**Holyavka Marina G.** – Ph.D. (biology), associate prof., department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

**Artyukhov Valery G.** – Ph.D. (biology), professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [artyukhov@bio.vsu.ru](mailto:artyukhov@bio.vsu.ru)

**Selemenev Vladimir V.** – Ph.D. (chemistry), professor of Department of Voronezh State University, Voronezh

