



УДК 66.081:577.325

Закономерности формирования димерных комплексов молекулами экзо- и эндоинулиназ. Изменение состава потенциальных сайтов связывания с заряженными и гидрофобными носителями для их иммобилизации

© 2021 Сакибаев Ф.А.¹, Макин С.М.¹, Холявка М.Г.^{1,2}, Артюхов В.Г.¹¹Воронежский государственный университет, Воронеж²Севастопольский государственный университет, Севастополь

Поступила в редакцию 02.10.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3837

Инулиназы (КФ 3.2.1.80 и 3.2.1.7) относятся к семейству гликозидгидролаз и являются важной группой промышленных ферментов. В литературе имеются противоречивые данные о надмолекулярной организации энзимов данной группы, в связи с чем возникает необходимость в ее системном изучении.

Целью работы было выявление различий в составе консервативных последовательностей внутри групп инулиназ с экзо- и эндо-активностью, поиск на поверхностях молекул потенциальных сайтов связывания с матрицами заряженных и гидрофобных носителей для адсорбционной иммобилизации, а также изучение закономерностей изменения их состава в процессе димеризации.

В качестве объектов исследования были выбраны экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (CAC44220.1), *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1), *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* (ANY59682.1) и *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1). На основе их аминокислотных последовательностей (взятых из базы NCBI) были смоделированы пространственные структуры представленных в работе ферментов. Димерные комплексы энзимов получали с помощью программ Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX и SwarmDock.

После димеризации наблюдались изменения состава аминокислот на поверхности изученных в работе ферментов, затрагивающие выявленные нами консервативные последовательности.

Анализ представленных в работе инулиназ показал неравномерность распределения аминокислотных остатков на их поверхности с формированием локальных скоплений. Показано, что для иммобилизации экзоинулиназ из *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1) и *A. awamori* (CAC44220.1) и эндоинулиназ из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) и инулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286.1) перспективными являются отрицательно заряженные носители, которые, вероятно, будут связываться с участками, находящимися в области некаталитического С-концевого домена.

Молекулы мономеров всех обсуждаемых в работе инулиназ характеризуются наличием скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в непосредственной близости к активному центру, что может указывать на вероятную значительную потерю активности при иммобилизации данных энзимов на гидрофобных носителях.

В ходе димеризации макромолекул инулиназ наблюдается изменение состава скоплений заряженных и гидрофобных остатков. Это может происходить как за счет перехода аминокислот с поверхности во внутреннюю часть белка и наоборот, так и вследствие изменения расстояния между ними. Для большинства представленных в работе инулиназ характерно преобладание переходов заряженных и гидрофобных остатков с поверхности во внутреннюю часть молекулы и обратно.

Ключевые слова: эндоинулиназа, экзоинулиназа, иммобилизация, сайты связывания, димеризация, надмолекулярная организация.

Введение

Ферменты, катализирующие реакции гидролиза инулина, являются важной группой промышленных энзимов. Они относятся к семействам 32 и 91 гликозидгидролаз (GH). Семейство GH32 включает экзо- и эндоинулиназу, фруктан-экзогидролазу, фруктозилтрансферазу, осуществляющие гидролиз инулина с высвобождением фрагментов фруктозы/фруктоолигосахаридов. Экзоинулиназы (КФ 3.2.1.80) представляют собой гликозил-гидролазы, отделяющие терминальные единицы фруктозы от инулина. Эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7) гидролизуют инулин вдали от концевых участков с образованием фруктоолигосахаридов. Экзоинулиназы и эндоинулиназы различаются 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 и обеспечивая специфичность фермента [1].

Экзоинулиназы содержат в активном центре остаток аспарагиновой кислоты, который должен отвечать за нуклеофильную атаку [2]. Данный остаток в составе эндоинулиназы заменяется глутаминовой кислотой. Из-за большого размера молекул субстрата каталитический центр эндоинулиназы довольно широк и составляет около 90 из 516 остатков, тогда как каталитический центр экзоинулиназы существенно меньше и включает 42 из 493 аминокислот [1].

Общей особенностью структур эндоинулиназы и экзоинулиназы является наличие участка Arg-Asp-Pro (RDP), последовательность которого сохраняется

и в других ферментах, 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 [1, 2].

Инулиназы (КФ 3.2.1.80 и 3.2.1.7) могут быть получены из клеток растений [3], животных [4] и микроорганизмов [5]. Выделение и очистка инулиназ из клеток микроорганизмов имеет ряд преимуществ по сравнению с растительными и животными источниками, таких как удобство обработки, культивирование в контролируемых условиях и высокий выход продукта. В течение последних нескольких десятилетий осуществлялся поиск микробных продуцентов инулиназ с высоким уровнем синтеза фермента. Ряд грибов (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*), бактерий (*Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*) и дрожжей (*Kluyveromyces sp.*, *Candida sp.*) считаются эффективными продуцентами инулиназы [4]. Однако в последнее время большое внимание уделяется использованию штаммов грибов, поскольку они обладают большей термостабильностью, способны расти на недорогих субстратах и показывают наличие синергетического эффекта как экзо-, так и эндоинулиназ. Грибные инулиназы могут быть получены как при глубоководной, так и при твердофазной ферментации. Кроме того, имеются данные о производстве рекомбинантных инулиназ из дрожжей и нитевидных грибов [6].

В литературе имеются противоречивые данные о надмолекулярной организации инулиназ. В работах некоторых авторов показано наличие четвертичной структуры в виде димеров или тетрамеров [7]. Структура таких комплексов во многом определяет их активность, в связи с чем возникает необходимость в изучении закономерностей процессов олигомеризации молекул энзимов с целью

их дальнейшего практического применения.

Фруктоза используется в качестве подсластителя, получаемого из различных природных источников (фрукты, ягоды и овощи). Она добавляется в безалкогольные напитки, хлебобулочные и кондитерские изделия. Благодаря низкому гликемическому индексу, фруктоза может выступать в качестве альтернативы глюкозе для пациентов с сахарным диабетом [8]. Было показано, что умеренные количества фруктозы оказывают положительное влияние на гликемический контроль [9]. Кроме того, фруктоза повышает биодоступность железа за счет образования железо-хелатного комплекса [10].

Фруктоолигосахариды представляют собой линейные короткоцепочечные олигомеры с повторяющимися молекулами фруктозы, соединенными вместе $\beta(2-1)$ гликозидной связью с терминальной молекулой глюкозы. Фруктоолигосахариды стимулируют рост колоний бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике [11] и способствуют синтезу короткоцепочечных жирных кислот, дополнительно стимулирующих рост колоректальных клеток слизистой оболочки, замедляющих ее атрофию и снижающих риск возникновения патологий толстой кишки. Фруктоолигосахариды могут быть получены кислотным или ферментативным гидролизом инулина, однако, ферментативный метод является экономически более выгодным [12].

Растворимые формы ферментов имеют ряд недостатков, осложняющих их промышленное использование. Так, поддержание высоких температур в реакционной среде способствует повышению скорости протекания реакций и предотвращению роста сторонней микрофлоры, но при этом температуры выше физиологических могут привести к полной или частичной инактивации ферментов. Очистка конечного продукта также является необходимой стадией промышленного цикла, которая осложняется

наличием в нем растворенных молекул энзимов. Данные проблемы решаются путем иммобилизации биокатализатора на нерастворимых носителях [13]. Было показано, что адсорбция инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на матрице катионитов и анионитов приводит к сдвигу температурного оптимума с 50 до 70 °C и повышению термостабильности энзима [14], что способствует использованию фермента в более экстремальных температурных условиях.

В связи с вышесказанным, целью работы было выявление различий в составе консервативных последовательностей внутри групп инулиназ с экзо- и эндоактивностью, поиск на поверхностях молекул потенциальных сайтов связывания с матрицами заряженных и гидрофобных носителей для адсорбционной иммобилизации, а также изучение закономерностей изменения их состава в процессе димеризации.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования выступали экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (CAC44220.1), *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1), *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* (ANY59682.1) и *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1) [15-26].

Пространственные структуры экзоинулиназ были получены из их аминокислотных последовательностей путем реконструкции методами высокопроизводительного компьютерного моделирования [27] на основе молекулы экзоинулиназы из *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W) [28]. Для реконструкции эндоинулиназ в качестве матрицы для построения пространственной структуры выступала эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) [29].

Таблица 1. Степень идентичности и перекрытия аминокислотных последовательностей инулиназ с белками, используемыми в качестве шаблона для реконструкции
 Table 1. Degree of identity and overlap of amino acid sequences of inulinases with proteins used as a template for reconstruction

Степень перекрытия, %	Степень идентичности, %	Моделируемый белок	Степень перекрытия, %	Степень идентичности, %	Моделируемый белок
100	98.64	EHA19510.1	100	100.00	CAC44220.1
100	98.45	ABB59681.1	100	90.88	ADM21204.1
95	93.64	AAN64131.1	94	34.68	EHA22512.1
98	63.92	ANY59682.1	90	40.08	AHN08014.1
94	64.21	XP 748286.1	93	37.55	BAC45010.1
64	30.58	CAA02437.1	93	30.39	AGR40655.1

Поиск шаблонов для моделирования, а также определение степени идентичности и степени (процента) перекрытия аминокислотных последовательностей инулиназ выполняли с помощью программы BLAST. Данные об идентичности и перекрытии аминокислотных последовательностей моделируемых белков с ферментами, используемыми в качестве шаблонов для реконструкции, представлены в таблице 1.

Основным инструментом для реконструкции фермента с известной аминокислотной последовательностью по гомологу с известной аминокислотной последовательностью и пространственной структурой был выбран расчетный пакет MODELLER 9.14.

Входным файлом для программы MODELLER является файл с выравниванием моделируемой последовательности и последовательностей шаблонов в формате PIR, имеющий расширение .ali и файл (файлы) с координатами атомов шаблона (или нескольких шаблонов) с расширением .pdb.

Для уточнения моделей применяли минимизацию энергии методом сопряженных градиентов (VTFM-optimization, 300 шагов) и методом молекулярной динамики (опция md_refine = slow), также проведенную в MODELLER, который использует силовое поле CHARMM21 и динамику белка в вакууме в этом поле. Выбранный режим молекулярной дина-

мики включал в себя серию 600-шаговых симуляций (2 фс на шаг) при температурах 1000, 600, 500, 400, 300K (600 шагов по 2 фс при каждой температуре).

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. В нашем эксперименте все программы дали приблизительно одинаковый численный результат, поэтому мы считаем, что расчет проведен адекватно, а полученные нами данные корректны.

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. 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.

Критерием группировки аминокислотных остатков в локальное скопление служила степень их удаленности друг от друга. Остатки были отнесены нами к одному скоплению, если расстояние (r) между ближайшими атомами данных аминокислот, вычисленные на основе их координат по формуле:

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

не превышали 10 Å. Аналогичным способом были вычислены расстояния от активного центра инулиназы до заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности ее молекул.

Обсуждение результатов

В табл. 2 представлены данные о наличии консервативных последовательностей в инулиназах, а также об отличиях их аминокислотного состава в данных ферментах. Последовательности WMNDPGL и FRDPKVFWH содержат остатки аспарагиновой кислоты, входящие в состав активного центра инулиназ.

Последовательность WMNDPGL сохраняется без изменений в составе экзоинулиназ из *A. niger* (EHA22512.1), *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. awamori* (CAC44220.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) и эндоинулиназе из *K. marxianus* (CAA02437.1). В составе эндоинулиназ из *A. niger* (EHA19510.1, ABB59681.1, AAN64131.1), *A. fumigatus* (XP_748286.1) и *F. oxysporum* (ANY59682.1) в данной последовательности происходит замена аспарагиновой кислоты, выступающей в роли нуклеофильного остатка в составе активного центра, на глутаминовую кислоту. Кроме того, обнаруживается замещение остатка лейцина остатком метионина в экзоинулиназе из *P. polytuxa* (AHN08014.1) и остатка метионина остатком изолейцина в энзиме из *B. licheniformis* (AGR40655.1).

Последовательность FRDPKVFWH сохраняется без изменений в экзоинулиназах из *P. polytuxa* (AHN08014.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) и в

эндоинулиназе *K. marxianus* (CAA02437.1). В экзоинулиназах из *A. niger* (EHA22512.1), *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. awamori* (CAC44220.1) наблюдается замена остатка лизина на остаток фенилаланина. В экзоинулиназе второй остаток фенилаланина замещается остатком триптофана, а остаток триптофана – остатком лизина. В эндоинулиназах из *A. niger* (EHA19510.1, ABB59681.1, AAN64131.1) вместо остатка фенилаланина присутствует остаток серина. Энзимы из *F. oxysporum* (ANY59682.1) и *A. fumigatus* (XP_748286.1) характеризуются замещением того же остатка изолейцином и треонином соответственно.

Для инулиназ из *A. niger* характерен общий состав только в последовательности WGHATS, которая сохраняется без изменений в энзимах из указанного продуцента. Второй остаток аспарагина в последовательности NWMNEPGL расположен в непосредственной близости к остатку глутаминовой кислоты, входящему в состав активного центра, и находится на поверхности молекулы в составе всех эндоинулиназ, кроме *K. marxianus* (CAA02437.1). Такое расположение данного остатка аспарагина может указывать на его значительную роль в связывании субстрата. В составе экзоинулиназ остатки, относящиеся к данной последовательности, находятся внутри молекулы.

Последовательность FRDPKVFWH во всех представленных в работе инулиназах характеризуется наличием одного аминокислотного остатка, расположенного на поверхности молекулы. Однако в данном случае такие аминокислоты незначительно удалены от остатка аспарагиновой кислоты, входящего в состав активного центра. Последовательности WGHATS и DFYAA не содержат в своем составе аминокислот, находящихся на поверхности молекул, во всех исследуемых инулиназах, что может свидетельствовать об их значительной роли в под-

Таблица 2. Замены аминокислот в консервативных последовательностях экзо- и эндоинулиназ

Table 2. Amino acid substitutions in conserved sequences of exo- and endoinulinases

	ЕНА22512.1	ADM21204.1	CAC44220.1	AHN08014.1	BAC45010.1	AGR40655.1	ЕНА19510.1	ANY59682.1	XP_748286.1	ABB59681.1	AAAN64131.1	CAA02437.1
WMNDPGL	+	+	+	L/M;	+	M/I;	D/E;	D/E;	D/E;	D/E;	D/E;	+
TWHLFFQHNP	W/Y; H/Y	W/Y; H/Y	W/Y; H/Y	T/R; W/Y; F/Y; N/H	E/R; W/Y	E/R; W/Y; L/V; F/Y; N/H	+	T/K;	+	+	+	T/D; F/Y; F/Y; H/Y
WGHTS	+	+	T/I	T/V	T/V	A/L; T/K	+	+	+	+	+	T/V
FSGSAV	+	+	+	+	A/V	-	S/T; S/T; V/Y	S/T; S/T; A/S; V/F	S/T; S/T; V/Y	S/T; S/T; V/Y	S/T; S/T; V/Y	A/M
NNTSGF	+	+	+	N/R; N/D	+	N/G; N/C; T/F	F/L	N/A; F/L	N/E; T/L; F/L	T/A; F/L	T/A; F/L	+
DFYAA	+	+	+	F/N; A/G	F/N; A/G	A/Q; A/T	Y/D; A/G	F/W ; Y/D; A/G	Y/D; A/G	Y/D; A/G	-	F/Y; A/L
SVEVFGGQGE	+	+	+	V/I; G/F; G/D; Q/R	V/I; G/V; G/N; Q/E	V/I; G/A; G/N; Q/H	+	Q/L	V/L	+	E/D; V/L	-
LIFPS	L/Q	L/Q	L/Q	I/T; F/E	F/Y; S/D	L/R; F/Y	I/T; F/L	I/S; S/R	I/G; F/S	I/T; F/L	I/S; S/R	I/N; F/R
LAYS LD	L/I	L/I	L/I	L/T	Y/F; L/H	L/I; Y/V; L/K	Y/F; L/V	+	+	Y/F; L/V	Y/F; L/V	D/L
TWTKY	K/T	K/T	K/T	T/S; T/I	+	W/T; T/I	W/G; K/A	+	T/I	W/G ; K/A	W/G ; K/A	W/F; K/Q; Y/H
FRDPKVFWH	K/F	K/F	K/F	+	+	F/W; W/K	F/S	F/I	F/T	F/S	F/S	+
WEC PDLFELP	D/G; E/K	D/G; E/K	D/G; F/V; E/K	E/P; P/Y	+	L/F; P/D	C/V; L/M	C/V; L/F; P/T	C/V; L/F; P/A	C/V; L/M	C/V; L/M	W/Y ; D/G; F/V; E/K; L/V
GSGTQYF	+	+	+	G/R	G/R	G/L; S/Y; G/Q; Q/G; F/L	S/N; T/V; Q/L; Y/A; F/I	S/N; T/V; Q/F; Y/A; F/V	S/N; T/V; Q/F; Y/A; F/V	S/N; T/V; Q/L; Y/A; F/I	S/N; T/V; Q/L; Y/A; F/I	G/V
VQQP	+	+	+	V/A; Q/R	V/I; Q/N	V/L; Q/M; Q/N	+	Q/K	V/L; Q/L	+	+	V/N; Q/S
LDRT	+	+	+	L/V	+	R/C; T/S	L/V	L/V; D/N; T/N	L/V; T/N	L/V	L/V	T/G

*Через косую черту обозначены замены одних аминокислотных остатков другими, плюсом – сохранение последовательности без замен, минусом – отсутствие последовательности в составе фермента; серым выделены энзимы из продуцентов рода *Aspergillus*, жирным шрифтом обозначены инулиназы из *A. niger*

держании структуры энзимов (рис. 1, табл. 3).

После димеризации молекул инулиназ наблюдаются некоторые изменения в аминокислотном составе поверхностей энзимов, затрагивающие консервативные последовательности (табл. 3). В области контакта субъединиц в димерном комплексе оказывается остаток пролина, входящий в состав последовательности TWHLFFQHNP двух мономеров экзоинулазы из *P. polytuxa* (AHN08014.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1). Последовательность LAYSID характеризуется переходом в область связывания остатка аспарагиновой кислоты в составе двух мономеров из *A. niger* (ЕНА22512.1) и *P. polytuxa* (AHN08014.1) и

одного мономера из *B. licheniformis* (AGR40655.1). Димеризация энзимов из *A. niger* (ЕНА22512.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) также приводит к переходу в контактную область остатков треонина, входящих в состав последовательности TWTKY, а формирование комплекса мономеров *P. polytuxa* (AHN08014.1) показывает переход в область связывания остатков серина и изолейцина, замещающие остатки треонина, а также остатка лизина в составе данной последовательности.

Последовательность WECPDFLFLP характеризуется переходом одного из остатков глутаминовой кислоты в область контакта в составе двух мономеров димера экзоинулазы из *F. oxysporum*

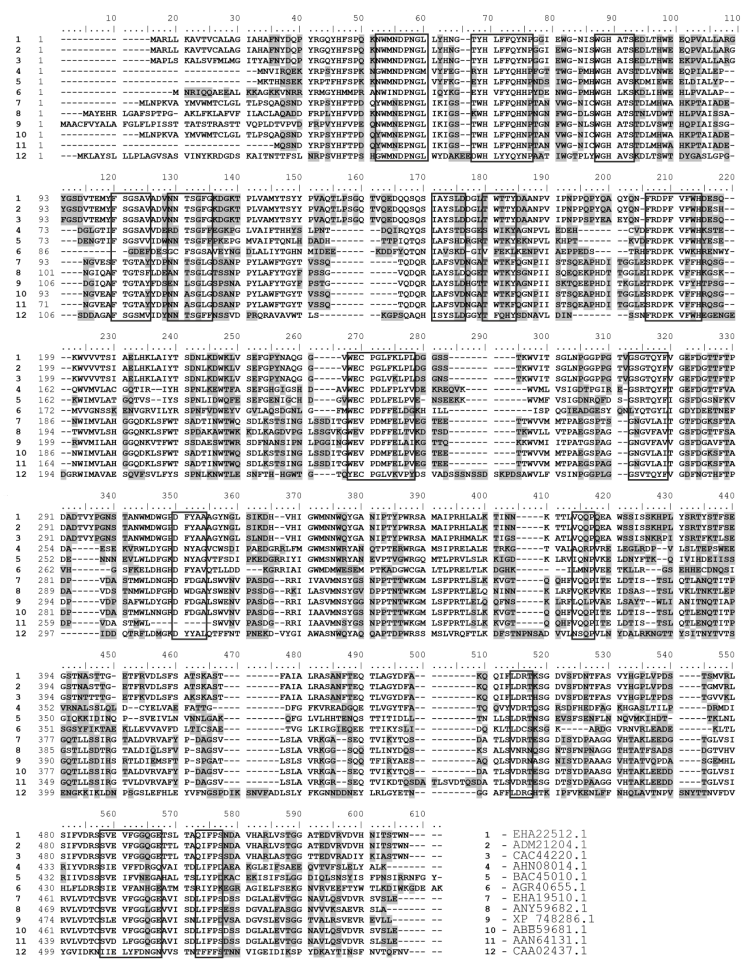


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей инулиназ (серым цветом обозначены аминокислоты, находящиеся на поверхности молекул, в рамку включены остатки, входящие в состав консервативных последовательностей).

Fig. 1. Alignment of amino acid sequences of inulinases (amino acids located on the surface of molecules are shown in grey, residues included in the conservative sequences are shown in the frame).

Таблица 3. Аминокислотные остатки, входящие в состав консервативных последовательностей и находящиеся на поверхности молекул инулиназ

Table 3. Amino acid residues included in conserved sequences and located on the surface of inulinase molecules

		ЕНА22512.1	ADM21204.1	САС44220.1	АНН08014.1	ВАС45010.1	АGR40655.1	ЕНА19510.1	АNY59682.1	ХР_748286.1	АВВ59681.1	ААН64131.1	СAA02437.1	
WMND PNGL	Мономер							N	N	N	N	N		
	Димер	А-цепь						N	N	N	N	N		
		В-цепь									N	N		
TWHLF FQHNP	Мономер				R, P	E, P		P	K, P	P	P	P	P	
	Димер	А-цепь				E		P	P	P	P	P	P	
		В-цепь							P	P	P	P	P	
NNTSG F	Мономер	N(1), G	N(1), G	N(1), G	R, D, G	N, N, G		N (1), T, G	A, T, G	E, L, G	N (1), A, G	N (1), A, G	N, N, T, G	
	Димер	А-цепь	N, N, G	N(1), G	R, G	N(1), T		N (1), T, G	A, T, G	E, L, G	N (1), A, G	N (1), A, G	N, N, T, G	
		В-цепь	N, N, G	N, N, T, G	N(1), G	R, D, G	N(1), T		N (1), G	A, T, G	E, L, G	N (1), G	N (1), A, G	N, N, T, G
LAYS LD	Мономер	L, D	L, D	L, D	T, D	H	V, K, D	V, D	L	L, D	V, D	V, D	L, D	
	Димер	А-цепь		L, D	L, D			V	V, D	L	L, D	V, D	V, D	L, D
		В-цепь		L, D				V	V, D	L	L, D	V	V, D	L, D
TWTKY	Мономер	T, T	T, T	T, T	S, I, K, Y	T, T, K	F, E, L	T, T, K	T, T, K	T, I, K	T, T, K	T, T, K	T, Q, H	
	Димер	А-цепь		T, T	T, T			L	T, T	T, T, K	T, I, K	T, T, K	T, T	T, Q, H
		В-цепь		T, T	T, T	Y		L	T	T, T, K	T, I, K	T, T, K	T, K	Q, H
FRDPK VFWH	Мономер	W	W	W	W	W	K	F(1)	F(1)	Y	F(1)	F(1)	W	
	Димер	А-цепь	W	W	W	W	W		F(2)		Y	F(2)	F(2)	W
		В-цепь	W	W	W	W		K			Y	F(2)		
WECPD LFELP	Мономер			K			E (2), D	E (2), P	E, E, T	E (2), A	E (2), P	E(2), P	K	
	Димер	А-цепь		K			E (2), D	E (2), P	E (2), T	E (2), A	E(2), P	E(2), P	K	
		В-цепь			K			E (2), D	E (2), P	E (2), T	E (2), L, A	E(2), P	E(2), P	K
GSGTQ YF	Мономер						L	N	N			N		
	Димер	А-цепь					L	N	N	N	N	N		
		В-цепь						L	N	N	N	N	N	

VQQP	Мономер		Q	Q	Q	R	N	N	Q	K	L	Q	Q	Q
	Димер	А-цепь	Q	Q	Q	R	N		Q		L	Q		Q
		В-цепь	Q	Q	Q	R			Q		L	Q	Q	
LDRT	Мономер		T	T		T	T	S	T	N	N	T	T	
	Димер	А-цепь	T	T		T	T	S	T	N		T	T	
		В-цепь	T	T			T	S	T	N		T	T	
SVEVF GGQGE	Мономер		G(2), Q	G(2), Q	G(2), Q	R	N, E	H	Q	L	Q	Q	Q	
	Димер	А-цепь	Q	G(2), Q	G(2), Q	R	N, E(2)	H, E(2)	Q	L	Q	Q	Q	
		В-цепь	Q	Q	Q	R	E(2)	E(2)	Q	L	Q	Q		
LIFPS	Мономер						D	K			D			S
	Димер	А-цепь					D	K	S		D			S
		В-цепь			S	D	D	K			D		S	S

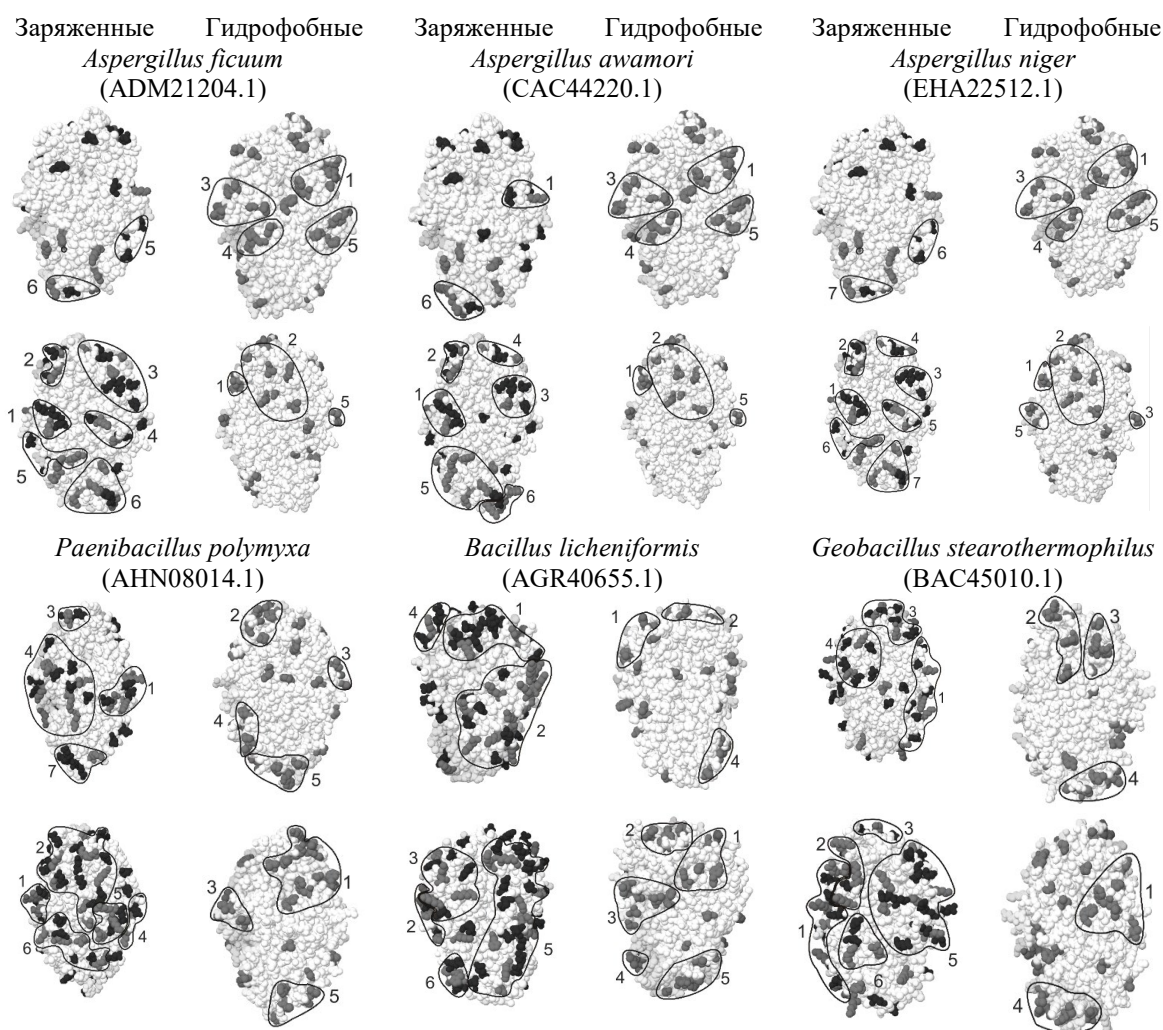


Рис. 2. Скопления (обозначены цифрами) заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул мономеров экзоинулиназ.
Fig. 2. Accumulations (indicated by numbers) of charged and hydrophobic amino acid residues on the surface of exoinulinase monomer molecules.

(ANY59682.1). Образование димерного комплекса мономеров инулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286) приводит к переходу в контактную область остатка аспарагина, входящего в состав VQQP.

Наибольший вклад в изменения аминокислотного состава поверхностей инулиназ, затрагивающие консервативные последовательности, вносят остатки, которые после димеризации не переходят в область контакта субъединиц. Такие аминокислоты могут оказываться на поверхности или переходить во внутреннюю часть молекул после формирования комплекса мономеров в результате конформационных перестроек субъединиц. Стоит отметить, что с внутренней части молекулы на поверхность или наоборот в двух субъединицах могут переходить разные аминокислоты. Это, вероятно, указывает на некоторые различия в закономерностях изменения конформации мономеров в составе димера.

Анализ молекул мономеров и димеров представленных в работе инулиназ показал неравномерность распределения аминокислотных остатков на их поверхности с формированием локальных скоплений. Количество скоплений заряженных остатков составило по 6 на поверхности мономеров экзоинулиназ из *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. awamori* (CAC44220.1), *B. licheniformis* (AGR40655.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) и по 7 на поверхности мономеров энзимов из *A. niger* (EHA22512.1) и *P. polymyxa* (AHN08014.1).

Скопления заряженных аминокислот на поверхности мономеров экзоинулиназ из продуцентов рода *Aspergillus* расположены в основном в области каталитического N-концевого домена (рис. 2) и характеризуются преобладанием отрицательно заряженных остатков. В составе ферментов из *A. ficuum* (ADM21204.1) и *A. niger* (EHA22512.1) имеется один участок локального скопления, расположенный в области некаталитического C-концевого домена и характеризую-

щийся преобладанием положительно заряженных аминокислотных остатков: Arg387, Glu394, Lys417, Arg479, Glu523, Asp524, Arg526. На поверхности инулиназы из *A. awamori* (CAC44220.1) расположены два таких скопления: Lys381, Arg382, Arg387, Glu404, Lys407, Asp524, Arg526, Lys531 и Lys390, Glu394, Lys415, Lys417, Glu523. Кроме того, C-концевые домены данных ферментов в целом также характеризуются преобладанием положительно заряженных остатков. Такое распределение аминокислот может свидетельствовать о вероятном связывании отрицательно заряженного носителя с некаталитическим доменом экзоинулиназ из *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1) и *A. awamori* (CAC44220.1) без значительной потери активности.

Мономеры инулиназ из *P. polymyxa* (AHN08014.1), *B. licheniformis* (AGR40655.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) имеют на своей поверхности в области каталитического домена скопления, характеризующиеся преобладанием как отрицательно, так и положительно заряженных аминокислот. Кроме того, у данных ферментов наблюдается наличие скоплений заряженных остатков, расположенных в непосредственной близости к активному центру. В связи с этим использование носителей, связывающих молекулы посредством электростатических взаимодействий, для иммобилизации энзимов из *P. polymyxa* (AHN08014.1), *B. licheniformis* (AGR40655.1) и *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) может привести к значительной потере активности.

Поверхности мономеров эндоинулиназ из *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1 и EHA19510.1) характеризуются наличием 4 участков локального скопления заряженных аминокислотных остатков мономеров инулиназ из *A. fumigatus* (XP_748286.1), *F. oxysporum* (ANY59682.1) и *K. marxianus* (CAA02437.1) – 3, 5 и 7 соответственно (рис. 3).

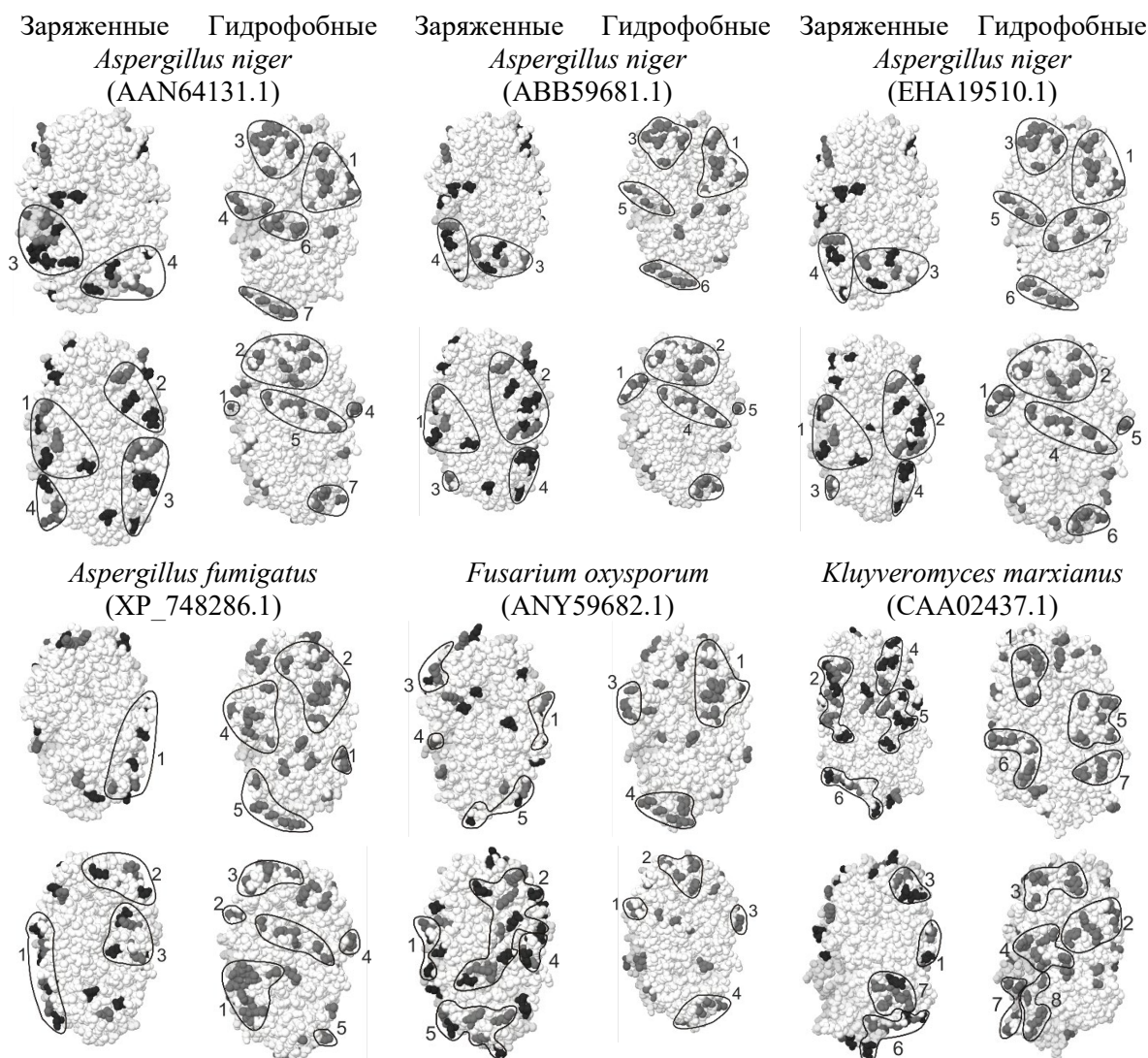


Рис. 3.

Рис. 3. Скопления (обозначены цифрами) заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул мономеров эндоинулиназ.

Fig. 3. Accumulations (indicated by numbers) of charged and hydrophobic amino acid residues on the surface of endoinulinase monomer molecules.

Мономеры двух эндоинулиназ из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) и инулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286.1) имеют на своей поверхности по одному участку локального скопления заряженных аминокислот, в которых преобладают положительно заряженные остатки: 1) Arg386, Lys410, Lys419, Glu433, Glu497, 2) Arg386, Lys410, Lys419, Glu433, Glu497 и 3) Asp40, Arg42, Glu50, His98, His399, Arg401, Lys423, Asp501, Glu525 соответственно. Такое распределение заряженных аминокислот на поверхности молекул данных ферментов

может указывать на вероятное связывание энзимов с отрицательно заряженными носителями без значительной потери активности. При этом каталитические домены мономеров эндоинулиназ из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) и инулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286.1) также, как и в случае с экзоинулиназами, имеют в своем составе участки локального скопления заряженных аминокислот, на которых преобладают отрицательно заряженные остатки, что может приводить к значительной потере активности при иммобилизации на положи-

Таблица 4. Состав участков локального скопления заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхностях молекул эндоинулиназ

Table 4. Composition of sites of local accumulation of charged and hydrophobic amino acid residues on the surfaces of endoinulinase molecules

	AAN64131.1	ABB59681.1	EHA19510.1
Заряженные в составе мономера	His60, His63, Lys64, Asp329, Asp15, Glu494	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516
	Glu217, Arg161, Glu225, Glu224	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282
	Lys312, Lys313, His319, Asp432, Glu430, Glu431, Asp433, Glu456, Asp367, Asp402, Lys428	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419
	Arg354, Lys378, Asp467, Arg380, Glu411, Glu475	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454, Asp455	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454
Гидрофобные в составе мономера	Pro40, Tyr17, Trp45, Val44, Val108, Gly291	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Val130, Gly323, Gly95, Ala91, Pro87	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Val130, Gly323, Gly95, Ala91, Pro87
	Tyr82, Phe159, Pro85, Val121, Ala88, Gly90, Ala95, Gly164, Ala184	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Ala110, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206
	Ala142, Pro143, Gly148, Ile146, Leu150, Gly174, Trp191	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Gly196, Trp213
	Gly202, Pro261, Val262, Gly237	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51
	Pro219, Gly222, Gly279, Ala276, Pro275, Gly29	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283
	Ala240, Pro239, Gly241, Pro419, Ala420	Pro377, Gly378, Gly500, Gly401, Ala400, Tyr397, Val504	Pro377, Gly378, Gly500, Gly401, Ala400, Tyr397, Val504
	Pro345, Gly346, Gly478, Val482, Tyr365, Ala368	Ile437, Pro441, Pro327, Val446	
Заряженные в составе А-цепи димера	His60, His63, Lys64, Asp329, Asp15, Glu494	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516	His82, His85, Lys86, Asp361, Asp37, Glu516
	Glu217, Glu225, Arg161, Glu224	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282	Glu239, Glu247, Arg183, Glu246
	Lys312, Lys313, His319, Asp432, Lys428, Glu430, Glu431, Asp433, Asp367, Asp402	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Asp285, Asp282, Lys450, Glu452, Lys345, Asp424, Glu453, Asp454, Lys344, Asp399
	Arg354, Lys378, Asp467, Arg380, Glu411	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454, Asp455	Lys410, Glu433, Arg386, Asp489, Glu497
Заряженные в составе В-цепи димера	His60, Glu494, His63, Lys64, Asp15	His82, Glu516, His85, Lys86, Asp37	His82, Glu516, His85, Lys86, Asp37
	Glu217, Arg161, Glu225, Glu224, Asp253, Lys255	Glu239, Arg183, Glu246, Glu243, Glu247, Lys344, Lys345, Asp282	Glu239, Arg183, Glu247, Glu246
	Lys313, Asp433, His319, Glu431, Lys428, Glu430, Asp402	Lys410, Glu497, Arg386, Glu433, Lys419	Lys410, Arg386, Asp489, Lys419
	Arg354, Lys378, Asp467, Arg380, Glu411	Asp424, Glu452, Lys450, Asp399, Glu453, Asp454, Asp455	Asp424, Lys450, Glu453, Asp399
Гидрофобные в составе А-цепи димера	Pro40, Tyr17, Trp45, Val44, Gly291	Pro62, Tyr39, Trp67, Pro87, Ala91	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Gly323
	Ala62, Pro65, Leu493, Ala125	Tyr104, Phe181, Pro107, Val143, Ala110, Gly112, Ala117, Gly186, Ala206	Ala84, Pro87, Leu515, Ala147
	Tyr82, Pro85, Ala88, Val121, Gly90, Ala95, Phe159, Gly164, Ala184	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Leu172, Trp213	Pro107, Phe181, Ala117, Gly112, Val143, Gly186, Ala206
	Ala142, Pro143, Ile146, Trp191	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51	Ala164, Pro165, Gly170, Ile168, Trp213
	Gly202, Pro261, Val262, Gly237	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Pro241, Gly244, Gly311, Ala308, Pro307, Gly51
	Pro219, Gly222, Gly279, Ala276, Pro275, Gly29	Pro377, Gly378, Gly500, Gly401, Ala400, Tyr397, Val504	Pro261, Ala286, Val446, Ala257
	Ala235, Gly174, Ala240, Pro239, Gly241, Ala420, Pro419	Tyr397, Ala400, Gly455, Ala371	
	Gly478, Pro345, Ala368, Gly346, Tyr365		
Гидрофобные в составе В-цепи димера	Tyr17, Pro40, Pro65, Gly291, Ala69, Ala125	Pro62, Tyr39, Trp67, Val66, Val130, Gly323, Gly95	Pro62, Tyr39, Ala91, Pro87, Ala147
	Gly29, Gly279, Tyr83, Ala276	Pro107, Phe181, Ala117, Gly112, Val143, Gly186, Ala206	Pro165, Ile168, Trp213, Leu172, Gly196
	Ala88, Gly90, Gly164, Ala95,	Ala164, Pro165, Ile168, Leu172,	Pro377, Gly378, Gly500, Ala400

	Val121, Ala184	Gly196, Trp213	
	Ala235, Gly174, Ala240, Pro239, Gly241, Ala420, Val424, Ala393, Leu395, Pro419	Ala286, Gly224, Pro261, Pro283	Ile437, Gly445, Pro441, Pro327, Val446, Pro261
	Gly478, Pro345, Gly346, Ala368, Tyr365	Pro377, Gly378, Gly500, Gly401, Ala400, Tyr397, Val504	
	ANY59682.1	CAA02437.1	XP_748286.1
Заряженные в составе мономера	Asp45, Lys46, His93, Asp34	Arg39, His48, Asp98, Asp344	Asp40, Arg42, Glu50, Arg401, His98, Asp501, His399, Lys423, Glu525
	Lys191, Lys194, Glu115, Glu247, Asp283, Lys321, Lys257, Asp290, Glu350, Lys363, Lys366, Asp369	Lys62, Glu63, Glu64, Lys91, Arg135, Asp159, Arg384, Lys385, Asp381	Arg200, Arg227, Asp288, Glu121
	Lys223, Lys222, Asp229, Lys226	Lys146, Asp109, Asp108, His166	Glu252, Lys261, Glu355, Lys256
	Lys251, Asp252, Asp255, Lys357	Glu189, Glu191, Lys244, Asp195	
	Lys381, Glu384, Lys377, Asp392, Arg394, Lys514	Asp259, Lys261, Asp263, Asp252, Asp360, Asp369	
		Lys403, Lys404, Lys406, Glu400, Asp408, Asp446, Lys537	
		His467, Lys469, Lys474, Glu475, His481	
Гидрофобные в составе мономера	Pro70, Trp75, Phe74, Leu94, Pro95, Val96, Pro138, Gly331, Val332, Phe137	Ala61, Tyr121, Pro321, Pro134	Val44, Leu527, Tyr376, Val502, Ala375, Trp378, Leu379, Ile380, Leu528, Ala371
	Ala116, Gly120, Phe189, Pro214, Ala218	Ala75, Tyr84, Ile78, Trp79, Ala101, Trp335, Tyr99, Gly100	Pro75, Trp80, Pro100, Phe79, Ile101, Pro143, Gly336, Gly337, Gly108, Phe142, Leu185
	Pro231, Gly232, Ala291, Gly228	Ile175, Ala171, Val207, Pro148, Gly147, Leu223	Leu123, Gly125, Pro129, Leu156
	Pro385, Gly386, Phe505, Gly409, Ala408, Gly508, Val512, Val405	Trp232, Pro277, Gly275, Pro274, Leu278, Phe478	Pro236, Pro296, Pro239, Gly240, Gly241, Pro299, Gly209, Pro274
		Tyr247, Pro262, Ile298, Val250, Val370, Ala368	Ala254, Gly257, Leu363, Gly324, Ala321, Pro320, Gly64
		Tyr380, Ala382, Tyr390, Leu383	Pro390, Gly391, Gly513, Gly414, Pro413, Ala437
		Gly424, Pro426, Ile428, Val489, Tyr492, Val496, Pro365	
	Phe433, Val432, Gly458, Ala484		
Заряженные в составе А-цепи димера	Asp45, Lys46, His93, Asp34	Arg39, His48, Asp344, Asp98	Asp40, Arg42, Glu50, Arg401, His98, Asp501, His399, Lys423, Glu525
	Lys191, Glu115, Lys194, Glu247, Asp283, Lys257	Lys62, Glu63, Glu64, Lys91, Arg135, Asp159	Glu177, Lys173, Lys183, Asp229
	Lys223, Lys222, Asp229, Lys226	Asp169, Lys219, His166, Asp174	Arg200, Arg227, Asp288, Glu121
	Glu350, Lys357, Asp252, Asp318, Asp255, Lys366, Asp369	Glu189, Glu191, Glu194, Asp195, Glu224, Lys244, His294, Asp289	Glu252, Lys261, Glu355, Lys256
	Lys377, Lys514, Lys381, Asp392, Arg394, Asp464, Asp462	His229, His230, Asp299, Asp300	Glu471, Asp467, Arg519, Glu406
		Asp259, Lys261, Asp263, Asp252, Asp360	
		Glu400, Asp541, Lys542, Lys537	
	Lys404, Lys406, Asp446, Asp408, Asp445, His467, Lys469, Lys474		
Заряженные в составе В-цепи димера	His93, Asp45, Lys46, Glu155	Arg39, His48, Asp344, Asp98	Asp40, Arg42, Glu50, Arg401, His98, Asp501, His399, Lys423, Glu525
	Lys191, Lys194, Glu115, Glu247, Lys257, Asp283, Asp255	Lys62, Glu63, Glu64, Lys91, Arg135, Asp159	Arg200, Arg227, Asp288, Glu121
	Lys381, Glu384, Lys377, Asp392, Arg394	Lys146, Asp109, Asp108, His166	Glu252, Lys261, Glu355, Lys256
		Glu194, Glu191, Glu224, His294, Asp289, Lys244	
		His229, His230, Asp299, Asp300, Arg303	
		Asp259, Lys261, Asp263, Asp252, Asp360	
		Glu400, Asp541, Lys542, Lys537	

		Lys404, Lys406, Asp446, Asp408, Asp445, His467, Lys469, Lys474, Glu475	
Гидрофобные в составе А-цепи димера	Pro70, Val96, Pro95, Leu94	Ala61, Tyr121, Pro134, Tyr162, Leu158, Pro321	Val44, Leu527, Tyr376, Val502, Ala375, Trp378, Leu379, Ile380, Leu528, Ala371
	Gly120, Ala116, Leu151, Pro214, Ala218	Ala75, Ala76, Pro345, Trp79	Gly64, Pro320, Phe118, Ala321, Gly324, Ala254, Gly257
	Gly204, Ala265, Leu180, Gly228	Trp232, Gly231, Gly279, Val207, Phe304	Pro75, Trp80, Pro100, Phe79, Ile101, Pro143, Gly336, Gly337, Phe142
	Ala291, Pro231, Gly232, Leu358	Tyr247, Pro262, Ile298, Phe361, Ala368, Val370, Pro365, Val489, Tyr492, Gly424, Pro426, Ile428	Leu123, Gly125, Pro129, Leu156
	Pro385, Gly386, Gly508, Phe505, Ala408, Val512	Gly387, Ala382, Tyr390, Tyr380	Ala166, Gly167, Ile163, Pro169
		Phe433, Val432, Gly458, Leu483, Ala484	Pro236, Pro296, Pro239, Pro299
		Pro390, Gly391, Gly513, Gly414, Pro413, Ala437	
Гидрофобные в составе В-цепи димера	Pro70, Val96, Phe74, Pro95	Ala61, Tyr121, Pro134, Tyr162, Leu158, Pro321	Val44, Leu527, Tyr376, Val502, Ala375, Trp378, Leu379, Ile380, Leu528, Ala371
	Gly120, Ala116, Pro214, Leu151, Ala218	Pro74, Ala75, Ala76, Ile78, Trp79, Tyr84, Gly100, Ala101, Trp335, Pro345, Tyr99	Pro75, Trp80, Pro100, Phe79, Ile101, Pro143, Gly336, Gly337, Gly108, Phe142
	Leu180, Phe137, Gly204, Pro173	Tyr247, Pro262, Ile298, Phe361, Ala368	Leu123, Gly125, Pro129, Leu156
	Gly228, Pro231, Gly232, Gly236, Ala291	Gly387, Ala382, Tyr390, Tyr380	Ala166, Gly167, Ile163, Pro169
	Pro385, Gly386, Gly409, Ala408, Phe505, Gly508, Val512	Gly424, Pro426, Ile428, Val489, Tyr492	Pro236, Pro296, Pro239, Pro299
	Ala522, Leu39, Val89, Leu375	Ala254, Gly257, Leu363, Gly324, Ala321, Pro320, Gly64	Pro390, Gly391, Gly513, Gly414, Pro413, Ala437

Таблица 5. Состав участков локального скопления заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхностях молекул экзоинулиназ

Table 5. Composition of sites of local accumulation of charged and hydrophobic amino acid residues on the surfaces of exoinulinase molecules

	ADM21204.1	CAC44220.1	EHA22512.1
Заряженные в составе мономера	Glu76, Asp77, His80, Glu82, Glu83	Glu76, Asp77, His80, Glu82, Glu83	Glu76, Asp77, His80, Glu82, Glu83
	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158
	Asp196, Glu197, His199, Asp285, Asp219, Lys225, Glu283, Lys222, Asp223, Glu229	Asp196, Glu197, His199, Asp285, Asp219, Lys225, Glu283, Lys222, Asp223, Glu229	Glu197, Asp196, Asp285, Glu283
	Lys324, Asp325, Asp251, Lys359	Lys324, Asp325, Asp251, Lys359	Asp219, Asp223, Lys222, Lys225
	Glu404, Asp23, Arg407, Asp509	Glu404, Asp23, Arg407, Asp509	Lys324, Asp325, Asp251, Lys359
	Lys417, Glu523, Glu394, Asp524, Arg526, Arg387, Arg479	Lys417, Glu523, Glu394, Asp524, Arg526, Arg387, Arg479	Glu404, Asp23, Arg407, Asp509
			Lys417, Glu523, Glu394, Asp524, Arg526, Arg387, Arg479
Гидрофобные в составе мономера	Gly61, Leu89, Val86, Trp65, Pro85, Tyr93, Gly94, Leu161	Gly61, Leu89, Val86, Trp65, Pro85, Tyr93, Gly94, Leu161	Gly61, Leu89, Val86, Trp65, Pro85, Tyr93, Gly94, Leu161
	Val110, Tyr47, Gly120, Gly115, Leu157, Trp194, Gly320, Ile323	Val110, Tyr47, Gly120, Gly115, Leu157, Trp194, Gly320, Ile323	Val110, Tyr47, Gly120, Gly115, Leu157, Trp194, Gly320, Ile323
	Pro232, Tyr233, Gly237, Pro298, Pro266, Ala293, Gly299	Pro232, Tyr233, Gly237, Pro298, Pro266, Ala293, Gly299	Pro232, Tyr233, Gly237, Pro298, Pro266, Ala293, Gly299
	Pro270, Gly271, Val273, Pro469	Pro270, Gly271, Val273, Pro469	Pro270, Gly271, Val273, Pro469
	Tyr344, Pro342, Pro25, Phe20	Tyr344, Pro342, Pro25, Phe20	Tyr344, Pro342, Pro25, Phe20, Trp536
Заряженные в составе А-цепи димера	Glu76, Asp77, His80, Glu82, Glu83	Glu76, Asp77, His80, Glu82, Glu83	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158
	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158	Glu197, Asp196, Asp285, Glu283
	Asp196, Glu197, His199, Asp285, Asp219, Lys225, Glu283, Lys222, Asp223	Asp196, Glu197, His199, Asp285, Asp219, Lys225, Glu283, Lys222, Asp223	Lys225, Asp223, Asp219, Glu229
	Lys324, Asp325, Asp251,	Lys324, Asp325, Asp251, Lys359	Lys381, His382, His80, Arg407

	Lys359		
	Glu404, Asp23, Arg407, Asp509	Glu404, Asp23, Arg407, Asp509	
	Lys417, Glu523, Glu394, Asp524, Arg526, Arg387, Arg479	Lys417, Glu523, Glu394, Asp524, Arg526, Arg387, Arg479	
Заряженные в составе В-цепи димера	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158	Lys118, Asp119, Lys121, Asp158	Glu197, Asp196, Asp285, Glu283
	Asp196, Glu197, His199, Lys200, Asp219, Asp223, Lys225	Asp196, Glu197, His199, Lys200, Asp219, Asp223, Lys225	Lys225, Asp223, Asp219, Glu229
	Lys417, Glu523, Glu394, Asp524, Arg526, Arg387, Arg479	Lys417, Glu523, Glu394, Asp524, Arg526, Arg387, Arg479	Arg387, Asp524, Arg514, His382, Arg526, Lys381, Arg479
Гидрофобные в составе А-цепи димера	Gly61, Leu89, Val86, Trp65, Pro85, Tyr93, Gly94, Leu161	Gly61, Leu89, Val86, Trp65, Pro85, Tyr93, Gly94, Leu161	Tyr47, Gly320, Val110, Trp194, Ile323
	Val110, Tyr47, Gly120, Gly115, Leu157, Trp194, Gly320, Ile323	Val110, Tyr47, Gly120, Gly115, Leu157, Trp194, Gly320, Ile323	Gly141, Pro139, Ala168, Pro174
	Pro266, Gly237, Val273, Pro270, Gly271, Trp335	Pro266, Gly237, Val273, Pro270, Gly271, Trp335	Pro179, Ala182, Leu210, Leu226, Pro232, Tyr233, Gly237, Pro266, Pro298, Gly299, Ala293
	Tyr344, Pro342, Pro25, Phe20, Trp536	Tyr344, Pro342, Pro25, Phe20, Trp536	Pro270, Gly271, Val465, Val273, Pro469
	Val471, Pro469, Gly494, Ala442	Val471, Pro469, Gly494, Ala442	Ala339, Trp335, Trp65, Pro342, Tyr344, Pro25
Гидрофобные в составе В-цепи димера	Gly61, Leu89, Val86, Trp65, Pro85, Tyr93, Gly94, Leu161	Gly61, Leu89, Val86, Trp65, Pro85, Tyr93, Gly94, Leu161	Val110, Trp194, Gly115, Gly320
	Val110, Tyr47, Gly120, Gly115, Leu157, Trp194, Gly320, Ile323	Val110, Tyr47, Gly120, Gly115, Leu157, Trp194, Gly320, Ile323	Pro139, Gly141, Ala168, Ala169, Pro174
	Tyr184, Ala182, Ala135, Val134	Tyr184, Ala182, Ala135, Val134	Pro179, Ala182, Leu210, Leu226, Val227, Pro232, Tyr233, Gly237, Pro266, Tyr297, Pro298, Gly299, Pro270, Gly271, Val273, Ala293, Val465, Pro469
	Gly237, Pro266, Val273, Leu210, Pro270, Gly271, Trp335, Ala463, Val465, Pro469	Gly237, Pro266, Val273, Leu210, Pro270, Gly271, Trp335, Ala463, Val465, Pro469	Pro342, Tyr344, Phe458, Pro25
AGR40655.1	AHN08014.1	BAC45010.1	
Glu92, Asp88, Glu89, Glu119, Glu120, Lys121, Asp122, Asp123, Arg157, Asp118	Lys18, Glu66, Glu303, Arg304, Arg408, Asp410, Glu65	Lys18, Lys19, Asp45, Glu66, Asp68, Arg131, Lys460, Glu463, Lys464, Arg488, Glu63, Glu65, Arg129, Lys355, Asp357, Glu385, Glu409, Asp459	
Lys12, Lys13, Lys16, Lys17, Arg20, Arg21, Arg31, Asp58, His79, Lys305, Lys362, Lys457, Glu458, Arg460, Asp484, His76, Glu78, Glu301, Glu361, Glu388, Lys409, Arg414, Asp415, Lys483	Glu32, Arg34, Lys98, Glu88, Arg89, Asp90, Glu96, Asp128, Glu131, Glu162, Lys183, Glu184, Asp277, Lys159, Glu281, Asp282, Arg284, Arg329	Lys32, Glu34, Lys97, Lys59, His127	
Lys45, Asp106, Glu102, Lys72, Asp73, Asp135, Glu140, Lys286, Lys134	Asp115, His146, Glu145, Glu143	Asp74, Glu75, Asp111, His110, Asp113, Lys135, Glu137, Lys138, Lys143, Asp184	
Glu153, Asp154, Lys180, Glu181	His193, His198, Asp199, Glu190, Asp229, Arg234, Glu235, Glu258, Lys259, Arg295, Glu413, Lys418, Glu256, Lys321	Lys147, Asp149, Glu190, Glu193, His198, Asp199, Asp228	
Lys166, Glu169, Arg168, Glu221, Lys225, Asp254, Asp256, Glu258, Glu261, His264, His325, Lys326, Glu423, Asp425, Glu426, Lys427, His445, Glu447, Arg473, Glu476, Asp207, Asp223, Lys268, Asp323, Asp347, Arg421	Asp213, Glu214, Lys215, Arg216, Glu217, Arg447	Glu160, Glu162, Lys163, Lys218, Glu188, Asp246, Lys251, Asp281, Arg283, Glu213, Glu216, Glu217, Lys279, Glu280, Lys318, Asp321, Glu447	
Glu342, His343, His344, Lys336, Glu345	Glu333, Glu335, Arg338, Lys485, Arg433, Glu480, Glu369, Arg429	Glu332, Asp334, Lys339, Arg433	
	Glu350, Glu351, Arg353, Glu471, Glu472		
Гидрофобные в составе	Pro81, Tyr57, Gly87, Pro63, Phe139, Leu142, Trp61, Val132, Ile137	Pro43, Phe44, Pro50, Trp48, Ile69, Gly75, Leu76, Tyr109, Pro112, Ile117, Val148, Trp294, Pro68	Pro43, Pro50, Ile47, Trp48, Tyr72, Trp293, Gly303, Val302
	Phe90, Pro146, Tyr125, Ala149, Ile117, Pro151, Pro152, Val195,	Gly93, Phe95, Pro99, Gly97, Ile134, Tyr136, Ala137	Trp88, Phe95, Gly93, Tyr30, Pro96

	Tyr199, Val202, Pro192		
	Leu210, Ile235, Ala237, Leu245, Gly239, Phe267, Trp298	Ala255, Val252, Ile195, Val260	Trp157, Tyr159, Pro180, Pro278
	Tyr355, Phe356, Gly353, Ile357, Ala360, Ile387, Gly459	Leu337, Gly336, Pro340, Val341	Ile347, Ile348, Ile352, Leu470, Leu372, Gly373, Leu396, Gly471, Leu476
	Leu398, Ile399, Ala424, Ile374	Pro347, Trp349, Ala355, Phe468, Val352, Leu356, Val476	
Заряженные в составе А-цепи димера	Glu92, Asp88, Glu89, Glu119, Glu120, Lys121, Asp122, Asp123, Arg157, Asp118	Lys18, Glu66, Glu303, Arg304, Arg408, Asp410, Glu65	Lys18, Lys19, Asp45, Glu66, Lys460, Arg488, Lys59, Glu63, Glu65, Arg129, Arg131, Glu332, Asp334, Lys339, Glu409, Asp459
	Lys13, Lys16, Lys17, Asp58, Arg20, Arg21, Lys305, Lys362, Lys457, Glu458, Arg460, Asp484, Glu301, Glu361, Glu388, Lys409, Arg414, Asp415, Lys483	Glu32, Lys98, Glu88, Glu131, Arg89, Glu96, Asp277, Lys159, Glu162, Glu281, Asp282, Arg284, Arg329	Lys32, Glu34, Lys279, Lys97, Glu280, Asp281, Arg283, Glu216, Glu217, Lys218, Lys318, Asp321
	Lys45, Asp106, Glu102, Lys286	Glu143, Glu145, His146, Lys183, Glu184	His110, Glu75, Asp113, Lys143, Lys147, Asp149, Glu190, Glu188
	Glu153, Asp154, Lys180, Glu181	His193, His198, Asp199, Glu190, Asp229, Arg234, Glu235, Glu258, Lys259, Arg295, Glu413, Asp414, Lys418, Glu256, Lys321	Asp246, Lys251, Glu160, Glu162
	Lys166, Glu169, Arg168, Glu221, Asp256, Glu258, Glu261, Asp254, His264	Asp213, Glu214, Lys215, Arg216, Glu217, Arg447	Arg294, Glu414, Glu298, Asp228
	Asp223, Lys326, His325, Asp323, Lys268, Arg421, Glu423, Asp425, Glu426, Lys427, His445, Glu447, Arg473, Glu476, Glu240, Asp347	Glu335, Glu333, Lys485, Arg433	His344, Glu346, Lys354, Lys355, Asp357, Glu385
	Glu342, His343, His344, Lys336, Glu345	Glu350, Glu351, Arg353, Glu471, Glu472	
		Glu369, Arg429, Asp428, Glu346, Glu480	
Заряженные в составе В-цепи димера	Glu92, Asp88, Glu89, Glu119, Glu120, Lys121, Asp122, Asp123, Arg157, Asp118	Lys18, Glu66, Glu303, Arg304, Arg408, Asp410, Asp459, Glu461, Lys463, Glu65, Asp384	Lys18, Lys19, Glu65, Asp45, Asp68, Arg131, Arg488, Lys59, Asp60, Glu63
	Lys13, Lys16, Lys17, Asp58, Arg20, Arg21, Lys305, Lys362, Lys457, Glu458, Arg460, Asp484, Glu301, Glu361, Glu388, Lys409, Arg414, Asp415, Lys483	Glu32, Arg34, Lys98, Glu88, Arg89, Asp90, Glu96, Glu131, Glu162, Lys183, Glu184, Asp277, Lys159, Glu281, Asp282, Arg284, Arg329	Lys32, Lys97, Lys279, Glu280, Arg283, Glu216, Glu217, Lys218, Lys318, Asp321, Glu447
	Lys45, Asp106, Glu102, Lys72, Lys286	His193, His198, Asp199, Glu190, Asp229, Arg234, Glu235, Glu258, Lys259, Arg295, Glu413, Lys418, Glu256, Lys321	His110, Glu75, Asp113, Lys143
	Glu153, Asp154, Lys180, Glu181	Asp213, Glu214, Lys215, Arg216, Glu217, Arg447	Glu162, Glu160, Asp246, Asp184, Lys251
	Lys166, Glu169, Arg168, Glu221, Lys225, Asp254, Asp256, Glu258, Glu261, His264, His325, Lys326, Glu423, Asp425, Glu426, Lys427, His445, Arg473, Glu476, Asp207, Asp223, Lys268, Asp323, Asp347, Arg421	Glu335, Glu333, Lys485, Arg433	Asp228, Asp199, Arg294, His198
	Glu342, His343, His344, Lys336, Glu345	Glu350, Glu351, Arg353, Glu471, Glu472	His344, Glu346, Lys339, Lys429
		Glu369, Arg429, Asp428, Glu346, Glu480	Lys355, Lys354, Glu385, Asp357, Asp459, Lys460, Glu409
Гидрофобные в составе А-цепи димера	Trp61, Pro63, Trp298, Tyr57	Trp48, Pro50, Phe44, Ile117, Val148, Trp294	Tyr30, Pro278, Trp88, Trp157, Tyr159, Pro180
	Phe90, Pro146, Tyr125, Gly87, Ile117, Ala149, Pro151, Pro152, Val195, Tyr199, Val202, Pro192	Gly93, Phe95, Pro180, Gly97	Ile47, Trp48, Pro50, Trp293
	Gly208, Leu210, Phe212, Ile235, Ala237, Gly239, Leu245, Phe267, Val417	Gly192, Ile195, Phe187, Val252, Ala255, Val260	Val148, Pro117, Pro145, Gly171, Val201
	Tyr355, Phe356, Gly353, Ile357, Ala360, Ile387, Gly459	Leu337, Gly336, Pro340, Val341	Ile347, Ile348, Ile352, Leu470, Leu372, Gly373, Leu396, Gly471, Leu476, Tyr480

	Leu398, Ile399, Ala424, Ile374	Pro347, Trp349, Ala355, Phe468, Val352, Leu356, Val476	
Гидрофобные в составе В-цепи димера	Trp61, Pro63, Trp298, Tyr57	Pro43, Phe44, Pro50, Trp48, Trp294	Ile47, Trp48, Pro50, Val302
	Phe90, Pro146, Tyr125, Gly87, Ile117, Ala149, Pro151, Pro152, Val195, Tyr199, Val200, Val202, Pro192	Gly93, Phe95, Pro99, Gly97	Trp88, Phe95, Tyr159, Pro180
	Leu210, Ile235, Ala237, Leu245, Gly239, Phe267, Val417	Ala255, Val252, Ile195, Val260	Pro117, Val148, Pro145, Ala112, Gly171
	Tyr355, Phe356, Gly353, Ile357, Ala360, Ile387, Gly459	Leu337, Gly336, Pro340, Val341	Val342, Ile341, Tyr480, Ile356, Ile347, Ile348, Ile352, Leu372, Leu470, Gly471, Leu476, Leu396
	Leu398, Ile399, Ala424, Ile374	Pro347, Trp349, Ala355, Phe468, Val352, Leu356, Val476	

Таблица 6. Аминокислотные остатки, изменившие свое положение в составе участков локального скопления на поверхностях молекул эндоинулиаз

Table 6. Amino acid residues which changed their position in the composition of sites of local accumulation on the surfaces of endoinulinase molecules

		AAN64131.1	ABB59681.1	ANY59682.1
А-цепь димера	1	Val108, Gly148, Leu150, Glu456, Glu475, Val482	Val66, Gly196, Gly323	Phe74, Trp75, Phe137, Pro138, Phe189, Lys251, Asp290, Lys321, Lys363, Val405, Gly409
	2	Pro65, Ala125, Leu493		Leu151, Leu180, Gly204, Asp462, Asp464
	3	Ala62, Ala235		Ala265, Asp318, Leu358
	4		Gly95, Val130	Gly331, Val332, Glu384
В-цепь димера	1	Val44, Trp45, Tyr82, Pro85, Val108, Ala142, Gly148, Leu150, Phe159, Gly237, Pro275, Lys312, Asp329, Asp367, Asp432, Glu456, Glu475, Val482	Gly51, Ala91, Tyr104, Ala110, Gly170, Pro241, Gly244, Pro307, Ala308, Gly311, Asp361	Asp34, Lys223, Asp229, Asp290, Lys321, Glu350, Lys363, Asp369, Lys514
	2	Pro65, Ala69, Ala125, Asp253, Lys255, Ala393		Leu39, Leu151, Glu155, Pro173, Leu180, Gly204, Gly236, Leu375, Ala522
	3			Val89
	4	Pro143, Ile146, Trp191, Gly202, Pro219, Gly222, Pro261, Val262		Lys222, Lys226, Lys251, Asp252, Val332, Lys357, Lys366
		CAA02437.1	EHA19510.1	XP 748286.1
А-цепь димера	1	Ile78, Tyr84, Val250, Pro274, Gly275, Pro277, Leu278, Trp335, Asp369, Asp381, Leu383, Lys403, Glu475, Phe478, His481, Val496	Tyr104, Val130, Leu172, Glu243, Gly401, Lys419, Val504	Gly108, Leu185, Gly209, Gly240, Gly241
	2	Leu158, Asp169, Asp174, Lys219, Glu224, His229, Asp289, His294, Asp299, Asp300, Pro345, Asp541, Lys542	Ala147, Asp285, Ala371, Gly455, Leu515	Ile163, Ala166, Gly167, Lys173, Glu177, Lys183, Glu406, Glu471, Arg519
	3	Ala76, Tyr162, Glu194, His230, Gly231, Gly279, Phe304, Phe361, Gly387, Asp445, Leu483	Ala84, Ala257, Asp489	Phe118, Pro169, Asp229, Asp467
	4	Tyr99, Gly100, Ala101, Asp108, Asp109, Lys146, Gly147, Pro148, Ala171, Ile175, Leu223, Arg384, Lys385	Ala91, Gly95, Gly196, Gly224, Pro283, Pro327, Pro377, Gly378, Ile437, Pro441, Gly500	Pro274, Leu363
В-цепь димера	1	Ala171, Trp232, Val250, Pro274, Gly275, Pro277, Leu278, Asp369, Val370, Asp381, Leu383, Lys403, His481, Ala484, Val496	Gly51, Val66, Trp67, Gly95, Tyr104, Pro107, Val130, Ala164, Gly170, Phe181, Glu243, Asp282, Ala286, Gly311, Gly323, Lys344, Asp361, Tyr397, Gly401, Glu433, Glu452, Asp454, Glu497, Val504	Leu185, Gly209, Gly240, Gly241
	2	Leu158, Glu224, His229, Asp289, His294, Asp299, Asp300, Pro345, Asp541, Lys542	Ala147	Ile163, Ala166, Gly167
	3	Pro74, Ala76, Tyr162, Glu194, His230, Arg303, Phe361, Gly387, Asp445	Gly445, Asp489	Pro169
	4	Gly147, Pro148, Ile175, Glu189, Asp195, Val207, Leu223, Pro365, Arg384, Lys385, Val432, Phe433, Gly458, Phe478	Gly112, Ala117, Val143, Gly186, Ala206, Gly224, Pro241, Gly244, Pro283, Pro307, Ala308, Lys345	Pro274

Таблица 7. Аминокислотные остатки, изменившие свое положение в составе участков локального скопления на поверхностях молекул экзоинулиназ

Table 7. Amino acid residues which changed their position in the composition of sites of local accumulation on the surfaces of exoinulinase molecules

		ADM21204.1	AGR40655.1	AHN08014.1
А-цепь димера	1	Glu229, Pro232, Tyr233, Ala293, Pro298, Gly299	Pro8, Lys12, Phe13, Arg31, Lys72, Asp73, His76, Glu78, His79, Lys134, Asp135, Ile137, Glu140, Lys225	Arg34, Pro43, Ile69, Gly75, Leu76, Asp90, Pro99, Tyr109, Pro112, Asp115, Asp128, Ile134, Tyr136, Ala137, Arg338
	2	Trp335, Ala442, Val471, Gly494, Trp536	Glu240	Pro180, Phe187, Glu346, Asp428
	3		Gly208, Phe212, Val417	Gly192, Asp414
	4		Val132, Leu142, Asp207	Pro68
В-цепь димера	1	Asp77, Glu83, Lys222, Glu229, Pro232, Tyr233, Glu283, Asp285, Ala293, Pro342, Lys359, Arg407	Ile4, Lys12, Arg31, Asp73, His76, Glu78, His79, Pro81, Lys134, Asp135, Ile137, Phe139, Glu140, Glu447	Ile69, Gly75, Leu76, Tyr109, Pro112, Asp115, Asp128, Ile134, Ala137, Arg338
	2	Val134, Ala135, Ala182, Trp335		Glu346, Asp384, Asp428, Glu461, Lys463
	3	Tyr184, Lys200, Leu210, Ala463, Val465	Val132, Leu142, Val200, Val417	Asp459
	4	Phe20, Asp23, Pro25, Glu76, His80, Glu82, Asp251, Pro298, Gly299, Lys324, Asp325, Tyr344, Glu404, Asp509		His146, Glu145, Glu143; Ile117, Val148, Pro68, Tyr136
		BAC45010.1	CAC44220.1	EHA22512.1
А-цепь димера	1	Pro43, Asp68, Tyr72, Asp74, Gly93, Phe95, Asp111, His127, Lys135, Glu137, Lys138, Lys163, Glu193, Asp199, Gly303, Arg433, Glu463, Lys464	Pro232, Tyr233, Asp285, Ala293, Gly299	Phe20, Gly61, Asp77, Glu82, Glu83, Pro85, Val86, Leu89, Tyr93, Gly94, Leu161, Lys222, Lys359, Glu404, Glu523, Asp524, Trp536
	2	Pro117, Pro145, Gly171, Val201, Arg294, Glu298, His344, Glu346, Lys354, Glu414, Tyr480	Trp335, Trp536	Pro139, Gly141, Ala168, Pro179, Ala182, Leu226, Glu229, Trp335, Lys381, His382
	3	Val148		Pro174, Leu210, Ala339, Val465
	4	Pro96, Asp184, His198, Glu213, Val302, Glu447	Pro298, Pro469	Asp23, Glu76, Gly115, Gly120, Leu157, Asp251, Lys324, Asp325, Arg387, Glu394, Lys417, Arg479, Asp509, Arg526
В-цепь димера	1	Glu7, Lys8, Tyr30, Glu34, Pro43, Glu66, Tyr72, Asp74, Gly93, Pro96, Asp111, His127, Arg129, Lys135, Glu137, Lys138, Lys147, Asp149, Trp157, Lys163, Glu188, Glu193, Glu213, Asp281, Trp293, Gly303, Glu332, Gly373, Arg433, Glu463, Lys464	Asp77, Leu157, Asp158, Pro232, Tyr233, Asp285, Ala293, Gly299, Lys407	Phe20, Tyr47, Gly61, Asp77, Glu82, Glu83, Pro85, Val86, Leu89, Tyr93, Gly94, Lys121, Leu157, Asp158, Leu161, Lys222, Asp325, Lys359, Glu404, Arg407, Glu523, Trp536
	2	Val134, Ala135, Ala182, Trp335, Ala112, Pro117, Pro145, Gly171, Arg294, Val342, His344, Glu346, Lys354, Lys429, Tyr480	Trp335, Asp473, Lys479, Trp536	Pro139, Gly141, Ala168, Pro179, Ala182, Leu226, Glu229, Lys381, His382, Arg514
	3	Tyr184, Lys200, Leu210, Ala463, Val465, Asp60, Val148, Ile341, Ile356	Ile63, Asp159, Lys200, Val465	Ala169, Pro174, Leu210, Val227, Tyr297, Phe458, Val465
	4	Phe20, Asp23, Pro25, Glu76, His80, Glu82, Asp251, Pro298, Gly299, Lys324, Asp325, Tyr344, Glu404, Asp509, Glu190, Pro278, Asp334	Lys118, Asp119, Lys121, Pro298, Glu404	Asp23, Trp65, Glu76, His80, Lys118, Asp119, Gly120, Asp251, Ile323, Lys324, Glu394, Lys417, Asp509

тельно заряженных носителях вследствие экранирования субстрата от активного центра. На поверхности молекулы эндоинулиназы из *A. niger* (AAN64131.1)

не выявлено участков локального скопления положительно заряженных аминокислот.

Поверхности молекул эндоинулиназ из *F. oxysporum* (ANY59682.1) и *K. marxianus* (CAA02437.1) характеризуются наличием в области N-концевого каталитического домена как участков локального скопления заряженных аминокислот, на которых преобладают отрицательно заряженные остатки, так и участков, показывающих преобладание положительно заряженных остатков, что необходимо учитывать при подборе носителей для сорбционной иммобилизации данных энзимов.

Распределение гидрофобных аминокислот на поверхностях молекул мономеров проанализированных нами инулиназ также показывает наличие участков локального скопления остатков данной группы. Так, на поверхностях экзоинулиназ выявлено наличие 4 скоплений для фермента из *G. stearothermophilus* (BAC45010.1), 5 скоплений для энзимов из *B. licheniformis* (AGR40655.1), *P. polymyxa* (AHN08014.1), *A. niger* (ЕНА22512.1) и *A. awamori* (CAC44220.1) и 6 скоплений для инулиназы из *A. ficuum* (ADM21204.1). Анализ поверхностей эндоинулиназ показал наличие 4 скоплений гидрофобных аминокислот на поверхности мономера инулиназы из *F. oxysporum* (ANY59682.1), 6 скоплений для ферментов из *A. fumigatus* (XP_748286.1) и *A. niger* (ABB59681.1) 7 и 8 скоплений для энзимов из *A. niger* (AAN64131.1 и ЕНА19510.1) и *K. marxianus* (CAA02437.1) соответственно. Молекулы мономеров всех изучаемых в работе инулиназ характеризуются наличием скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в непосредственной близости к активному центру, что может указывать на вероятную значительную потерю активности при иммобилизации данных энзимов на гидрофобных носителях вследствие экранирования субстрата от активного центра.

В ходе димеризации всех представленных в статье инулиназ наблюдается изменение состава скоплений заряжен-

ных и гидрофобных аминокислотных остатков (табл. 4, 5). Аминокислоты могут войти в состав скопления в ходе димеризации в результате уменьшения расстояния до остатков, уже содержащихся в нем, или их перехода на поверхность молекулы из ее внутренней части. Выход аминокислот из состава скоплений обусловлен увеличением расстояния до остальных остатков данных участков или их переходом во внутреннюю часть молекулы с ее поверхности. В таблицах 6 и 7 приведен перечень остатков, изменивших свое положение относительно участков локального скопления заряженных и гидрофобных аминокислот на поверхности эндо- и экзоинулиназ.

В эндоинулиназах из *A. niger* основной вклад в изменение состава участков локального скопления заряженных и гидрофобных аминокислот вносят переходы остатков с поверхности во внутреннюю часть молекул и наоборот. Энзим из *F. oxysporum* характеризуется равным количественным соотношением данных процессов. Инулиназы из *A. fumigatus* и *K. marxianus* показывают незначительное преобладание изменения расстояния между остатками и переходами поверхность/внутренняя часть молекулы соответственно (рис. 4). Наименьшее число остатков меняют свое положение в молекуле эндоинулиназы из *A. niger* (ABB59681.1), а наибольшее – в молекуле энзима из *K. marxianus*. В более высокой степени переходу с поверхности во внутреннюю часть молекулы и наоборот подвержены гидрофобные аминокислоты во всех исследуемых нами эндоинулиназах, кроме фермента из *F. oxysporum* – в этом случае в одной из субъединиц димерного комплекса в значительной степени преобладают переходы заряженных остатков.

В молекулах всех исследуемых нами экзоинулиназ, кроме фермента из *A. ficuum*, преобладает изменение положения аминокислотных остатков отно-

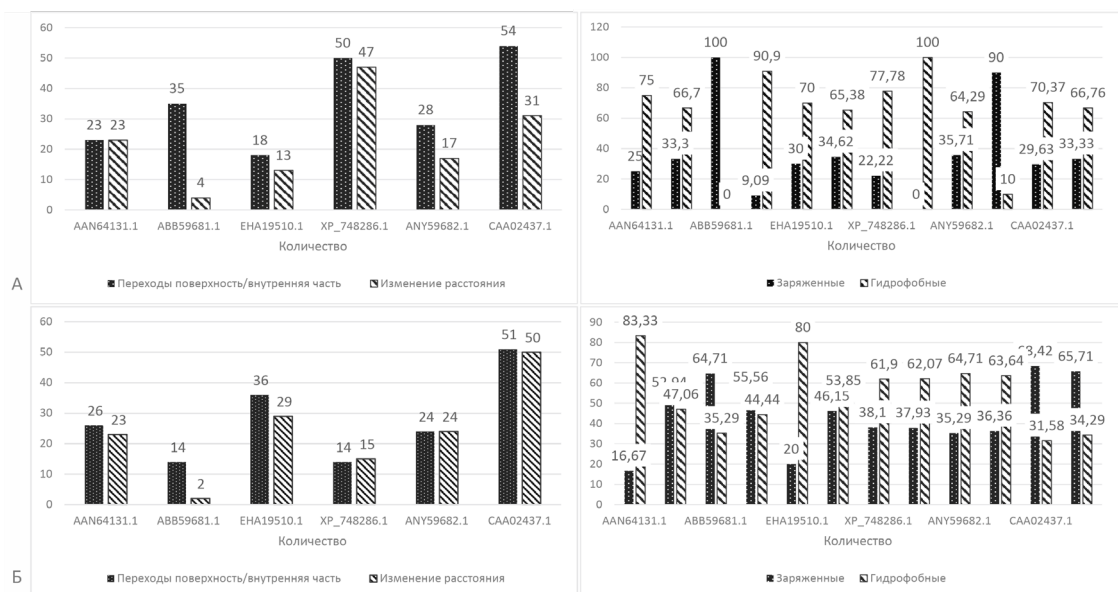


Рис 4. Количество остатков, изменивших свое положение относительно участков локального скопления заряженных и гидрофобных аминокислот в результате перехода поверхность/внутренняя часть и изменения расстояния до аминокислот скоплений в составе молекул эндо- (А) и экзоинулиназ (Б).

Fig 4. The number of residues which changed their position relative to the sites of local accumulation of charged and hydrophobic amino acids as a result of the surface/interior transition and changes in the distance to the amino acid accumulations in the molecules of endo- (A) and exoinulinases (B).

сительно участков локального скопления посредством переходов с поверхности молекул в их внутреннюю часть и наоборот. В случае с инулиназой из *A. ficuum* наравне с данным процессом наблюдается изменение положения аминокислот посредством увеличения или уменьшения расстояния между аминокислотами и участками локального скопления. Наибольшее число остатков меняет свое положение относительно локальных скоплений в молекуле экзоинулиназы из *A. niger*, наименьшее – в молекуле энзима из *A. awamori*. В молекулах экзоинулиназ из *A. awamori*, *A. niger* и *P. polymyxa* в большей степени переходы поверхность/внутренняя часть молекулы осуществляются гидрофобными аминокислотами, тогда как в молекулах инулиназ из *Bacillus licheniformis* и *Geobacillus stearothermophilus* в данный процесс в большей степени вовлечены заряженные аминокислоты в обеих субъединицах димерных комплексов. В молекуле энзима из *Aspergillus ficuum* в одной из субъединиц

в указанном процессе в значительной степени преобладают гидрофобные остатки, тогда как в другой наблюдается незначительное преобладание заряженных аминокислот при переходе поверхность/внутренняя часть молекулы.

Закключение

В составе представленных в работе инулиназ: экзоинулиназы из *A. awamori* (CAC44220.1), *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1), *B. licheniformis* (AGR40655.1), *G. stearothermophilus* (BAC45010.1) и *P. polymyxa* (AHN08014.1) и эндоинулиназы из *A. fumigatus* (XP_748286), *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510), *Fusarium oxysporum* (ANY59682.1) и *K. marxianus* (CAA02437.1) – обнаружены характерные для них консервативные последовательности WMNDP NGL, TWHLFFQHNP, WGHATS, FSGSAV, NNTSGF, DFYAA, SVEVFGGQGE, LIFPS, LAYSLD, TWTKY, FRD-PKVFHW WPCPDFELP, GSGTQYF, VQQP и LDRT. Выявлены различия в

составе данных последовательностей, характерные для инулиназ из продуцентов рода *Aspergillus* внутри групп ферментов с экзо- и эндо-активностью. Показано, что второй остаток аспарагина в последовательности NWMNEPNGL, расположенный в непосредственной близости к остатку глутаминовой кислоты активного центра, находится на поверхности молекулы в составе всех эндоинулиназ, кроме *K. marxianus* (CAA02437.1), что может указывать на его значительную роль в связывании субстрата. Последовательности WGHATS и DFYAA не содержат в своем составе аминокислот, находящихся на поверхности молекул, во всех исследуемых инулиназах, что может свидетельствовать об их значительной роли в поддержании структуры энзимов. Наибольший вклад в изменения аминокислотного состава поверхностей инулиназ, затрагивающие консервативные последовательности, вносят остатки, которые после димеризации не переходят в область контакта субъединиц.

Аминокислотные остатки на поверхности молекул названных нами инулиназ распределены неравномерно с образованием участков их локального скопления, которые могут выступать в качестве сайтов связывания с заряженными и гидрофобными носителями при адсорбционной иммобилизации ферментов.

Показано, что для иммобилизации экзоинулиназ из *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1) и *A. awamori* (CAC44220.1) и эндоинулиназ из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) и инулина-

зы из *A. fumigatus* (XP_748286.1) перспективными являются отрицательно заряженные носители, которые, вероятно, будут связываться с участками, находящимися в области некаталитического С-концевого домена и содержащими 1) Arg387, Glu394, Lys417, Arg479, Glu523, Asp524, Arg526 в случае первых двух ферментов и 2) Lys381, Arg382, Arg387, Glu404, Lys407, Asp524, Arg526, Lys531 и Lys390, Glu394, Lys415, Lys417, Glu523, 3) Arg386, Lys410, Lys419, Glu433, Glu497, 4) Arg386, Lys410, Lys419, Glu433, Glu497 и 5) Asp40, Arg42, Glu50, His98, His399, Arg401, Lys423, Asp501, Glu525 соответственно для остальных энзимов.

Молекулы мономеров всех обсуждаемых в работе инулиназ характеризуются наличием скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в непосредственной близости к активному центру, что может указывать на вероятную значительную потерю активности при иммобилизации данных энзимов на гидрофобных носителях из-за экранирования субстрата от активного центра.

Изменение аминокислотного состава участков локального скопления заряженных и гидрофобных остатков может происходить посредством их перехода с поверхности во внутреннюю часть молекулы и наоборот и вследствие изменения расстояния между ними и скоплениями. Для большинства представленных в работе инулиназ характерно преобладание переходов заряженных и гидрофобных остатков с поверхности во внутреннюю часть молекулы и обратно.

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/References

1. Basso A., Spizzo P., Ferrario V., Knapic L. et al., *Biotechnol. Prog.*, 2010, Vol. 26, No 2, pp. 397-405.
2. Nagem R.A., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S. et al., *J. Mol. Biol.*, 2004, Vol. 344, No 11, pp. 471-480.

3. Lefebvre R., Vasseur J., Backoula E., Couillerot J.P., *Can J Bot.*, 1992, Vol. 70, pp. 1897-1902.
4. Mishra S.C., Sen S.P.K., *Mater Organismen*, 1987, Vol. 22, pp. 127-138.
5. Neagu C., Bahrim G., *Innov Rom Food Biotechnol.*, 2011, Vol. 9, pp. 1-11.

6. Wang L., Huang Y., Long X., Meng X. et al., *J Appl Microbiol.*, 2011, Vol. 111, pp. 1371-1380.
7. Pessoa A., Vitolo M., *Biotechnol. Techn.*, 1997, Vol. 11, P. 421.
8. Uusitupa M.I., *The American journal of clinical nutrition*, 1994, Vol. 59, pp. 753-757.
9. Sievenpiper J.L., de Souza R.J., Cozma A.I., Chiavaroli L. et al., *Current Opinion in Lipidology*, 2014, Vol. 25, pp. 8-19.
10. Singh R.S., Chauhan K., Singh R.P., *Plant Biotechnology: recent advancements and developments*, 2017, pp. 189-211.
11. Gibson G.R., *The Journal of nutrition*, 1999, Vol. 129, pp. 1438-1441.
12. Pandey A., Soccol C.R., Selvakumar P., Soccol V.T. et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1999, Vol. 81, pp. 35-52.
13. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V. et al., *Computers in biology and medicine*, 2016, Vol. 71, pp. 198-204.
14. Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Takha A.S., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2007, Vol. 7, No 5, pp. 804-810.
15. Arand M., Golubev A.M., Neto B.J.R., Polikarpov I. et al. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAC442> 20.1 (дата обращения: 24.07.2018)
16. Chen X.-M., Xu X.-M., Jin Z.-Y. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADM21204.1> (дата обращения: 24.07.2018)
17. Andersen M.R., Salazar M.P., Schaap P.J., van de Vondervoort P.J. et al., *Genome research*, 2011, Vol. 21, pp. 885-897.
18. Lu W.-D. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGR40655.1> (дата обращения: 24.07.2018)
19. Tsujimoto Y., Watanabe A., Nakano K., Watanabe K. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, Vol. 62, pp. 180-185.
20. Gao J., Xu Y.Y., Yang H.M., Xu H. et al., *Appl Biochem Biotechnol.*, 2014, Vol. 173, pp. 1419-1430.
21. Nierman W.C., Pain A., Anderson M.J., Wortman J.R., Kim H.S. et al., *Nature*, 2005, Vol. 438(7071), pp. 1151-1156.
22. Monod M., Mouyna I., Mulligan S., Murphy L. et al., *Nature*, 2006, Vol. 439(7075), p. 502.
23. Wang J.-H., Teng D., Yao Y. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN64131.1> (дата обращения: 24.07.2018)
24. Yuan X.L., Goosen C., Kools H., van der Maarel M.J. et al., *Microbiology*, 2006, Vol. 152, pp. 3061-3073.
25. Andersen M.R., Salazar M.P., Schaap P.J., van de Vondervoort P.J. et al., *Genome Res.*, 2011, Vol. 21, pp. 885-897.
26. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A.M., Roussel G. et al., *Biochimie*, 2012, Vol. 94, pp. 2423-2430.
27. Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., *Biophysics*, 2016, Vol. 61, pp. 565-571.
28. Yang J.-K., Zhang J.-W., Mao L., You X., Xiong W. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ANY59682> (дата обращения: 24.07.2018)
29. Chapman J.W., Musters W., Rouwenhorst R.J., Toschka H.Y., Verbakel, J.M. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA02437.1> (дата обращения: 24.07.2018)

Regularities of the formation of dimeric complexes by exo- and endoinulinases molecules. Change in the composition of potential binding sites with charged and hydrophobic carries for their immobilization

© 2021 Sakibaev F.A.¹, Makin S.M.¹, Holyavka M.G.^{1,2}, Artyukhov V.G.¹

¹Voronezh State University, Voronezh

²Sevastopol State University, Sevastopol

Inulinase (EC 3.2.1.80 and 3.2.1.7) belong to the family of glycoside hydrolases and are an important group of industrial enzymes. In the literature, there are conflicting data on the supramolecular organization of the enzymes of this group, therefore there is a need for its systematic study.

The aim of this study was the identification of differences in the composition of conserved sequences within groups of inulinases with exo- and endo-activity, the search on the surfaces of molecules for poten-

tial binding sites with matrices of charged and hydrophobic carriers for adsorption immobilization, and study of the patterns of changes in their composition during dimerization.

Exoinulinases from *Aspergillus awamori* (CAC44220.1), *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1), *Bacillus licheniformis* (AGR40655.1), *Geobacillus stearothermophilus* (BAC45010.1) and *Paenibacillus polymyxa* (AHN08014.1) and endoinulinase from *A. fumigatus* (XP_748286), *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510), *Fusarium oxysporum* (ANY59682.1) and *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1) were used as the object of the study. Based on their amino acid sequences (taken from the NCBI database), the spatial structures of the enzymes presented in the research were modelled. Dimeric complexes of enzymes were obtained using the Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, and SwarmDock programs. After dimerization, changes in the composition of amino acids on the surface of the studied enzymes, affecting the identified conservative sequences, were observed.

The analysis of the inulinases presented in the study showed the uneven distribution of amino acid residues on their surface with the formation of local accumulations. It was shown that for the immobilization of exoinulinases from *A. ficuum* (ADM21204.1), *A. niger* (EHA22512.1), *A. awamori* (CAC44220.1), endoinulinases from *A. niger* (ABB59681.1 and EHA19510.1) and inulinase from *A. fumigatus* (XP_748286.1) negatively charged carriers, which probably will bind to sites located in the region of the non-catalytic C-terminal domain are promising. Monomer molecules of all inulinases discussed in this study were characterized by the presence of accumulations of hydrophobic amino acid residues in the immediate vicinity of the active site, which may indicate a probable significant loss of activity upon immobilization of these enzymes on hydrophobic carriers.

During the dimerization of inulinase macromolecules, a change in the composition of the accumulations of charged and hydrophobic residues was observed. This could occur both due to the transition of amino acids from the surface to the inner part of the protein and vice versa, and due to a change in the distance between them. Most of the inulinases presented in this study were characterized by the predominance of transitions of charged and hydrophobic residues from the surface to the inner part of the molecule and vice versa.

Keywords: endoinulinase, exoinulinase, immobilization, binding sites, dimerization, supramolecular organization.

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

Макин Сергей Михайлович – аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Холявка Марина Геннадьевна – профессор кафедры биофизики и биотехнологии, доктор биологических наук, Воронежский государственный университет, Воронеж, профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет, Севастополь

Артюхов Валерий Григорьевич – заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, профессор, доктор биологических наук, Воронежский государственный университет, Воронеж

Sakibaev Farkhat A. – post-graduate student, Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: farkhatlukum@gmail.com

Makin Sergey M. – post-graduate student, Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: integral_po_dx@mail.ru

Holyavka Marina G. – professor, doctor of science (biology), Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, professor of the Department of Physics, Sevastopol State University, Sevastopol, e-mail: holyavka@rambler.ru

Artyukhov Valeriy G. – professor, doctor of science (biology), head of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru