

УДК 577.150.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ГЛЮКОАМИЛАЗ ИЗ ASPERGILLUS AWAMORI И SACCHAROMYCES CEREVISIAE¹Кожокина О.М., ²Ковалева Т.А.¹ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Росздрава;²ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: makarova7809@mail.ru

С помощью метода инфракрасной спектроскопии осуществлено сравнение вторичных структур глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomyces cerevisiae*. Получены данные о типах вторичной структуры, количественном соотношении упорядоченных и нерегулярных участков.

Ключевые слова: глюкоамилаза, вторичная структура, сравнительный анализ, α -спирали, β -структура, неупорядоченные участки

COMPARATIVE ANALYSIS OF SECONDARY STRUCTURE OF THE GLUCOAMYLASES FROM ASPERGILLUS AWAMORI AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE¹Kozhokina O.M., ²Kovaleva T.A.¹Voronezh State Medical Academy;²Voronezh State University, Voronezh, e-mail: makarova7809@mail.ru

The method of infrared microscopy was used for comparison of secondary structure of glucoamylases from *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*. The data of types of secondary structure, quantitative relationship ordered and unordered sites.

Keywords: glucoamylase, secondary structure, comparative analysis, α -spiral, β -sheet, unordered sites

Исследование свойств глюкоамилаз различного происхождения приобретает особую значимость в связи с применением их в различных отраслях промышленности в роли биокатализаторов. Поиск путей регулирования биокаталитической активности ферментов неразрывно связан с расшифровкой закономерностей и молекулярного механизма катализа реакции гидролиза субстрата. Для решения данной задачи, наряду с определением функциональных свойств энзимов, необходимо проведение их структурного анализа.

Ранее нами были проведены исследования по установлению аминокислотного состава и осуществлен сравнительный анализ первичных структур глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* X100 и *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7 [2, 3]. Определение типов и относительного количества элементов вторичной структуры является следующим этапом изучения пространственной организации белковой молекулы. В настоящее время существует большое количество предсказательных методов, позволяющих априорно на основе анализа аминокислотных последовательностей прогнозировать итог процесса свертывания полипептидной цепи в глобулу [1, 6, 7]. Однако, анализ данных литературы показал, что с помощью имеющихся методов можно предсказывать правильную вторичную структуру лишь для двух третей всех остатков белка [1, 4, 6, 7]. Значительная погрешность расчетов и их сложность обуславливают целесообразность проведения прогнозирования в тех случаях, когда исследование данного уровня иерархии белковой

молекулы нельзя осуществить иным, более корректным способом.

Регистрация спектров поглощения в инфракрасной области является одним из самых чувствительных методов изучения особенностей вторичной структуры белка.

С помощью метода инфракрасной спектроскопии (ИКС) нами было осуществлено сравнение вторичных структур глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* X100 и *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7. Измерение величин светопропускания белковых образцов проводили на многофункциональном ИК-спектрофотометре SPECORD M-80 (Германия) в диапазоне 4000-400 см⁻¹. Обработку серии спектров проводили с учетом параметров всех реально существующих полос поглощения и их анализа.

Точность полученных данных контролировали как по средним квадратичным отклонениям, так и непосредственно по разности между спектрами, которая выводилась на график вместе с экспериментальными и модельными спектрами и полученными индивидуальными пиками.

Анализ ИК-спектров показал наличие полос поглощения амид I (1630-1660 см⁻¹) и амид II (1520-1550 см⁻¹), отличающихся для изучаемых ферментов лишь интенсивностью. Полоса амид I, обусловленная растяжением связи в карбонильной группе, указывает на наличие в молекулах глюкоамилаз различного происхождения структур с водородными связями и на присутствие неупорядоченных участков. Полоса амид II свидетельствует об одинаковом положении во

вторичной структуре ферментов α -спиралей и β -структур. Колебания, порождающие ее, связаны с растяжением пептидных и деформацией водородных связей. Наличие пиков поглощения при 2860 и 2780 см^{-1} соответствуют симметричным колебаниям метильных групп. На осуществление асимметричных колебаний карбоксильных групп указывает полоса поглощения при 2520 см^{-1} ,

а ряд пиков в области 1720-1872 см^{-1} обусловлен колебаниями карбонильных групп в концевых ассоциированных COOH -группах. Кроме того, слабо проявляются полосы поглощения при 3373-3254 см^{-1} , связанные с растяжением NH -связей. Пик в области 1000 см^{-1} определяется наличием в структуре фенилаланина, гистидина и триптофана монозамещенного ароматического кольца.

Таблица 1

Параметры полос амид I и амид II для полипептидов и белков

Конформация	Амид I		Амид II	
	Частота, см^{-1}	Коэффициент экстинкции, $\text{моль}^{-1}\text{см}^{-1}$	Частота, см^{-1}	Коэффициент экстинкции, $\text{моль}^{-1}\text{см}^{-1}$
α -спирали	1644-1649	750	1548-1553	340
β -структура	1615-1623	980	1530-1535	340
	1691-1699	180	1563	100
Неупорядоченная структура	1650-1654	320	1546-1553	210

Анализ результатов, представленных в табл. 2, показал, что соотношение упорядоченных структур и нерегулярных участков в

молекулах глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* X100 и *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7 статистически не отличаются друг от друга.

Таблица 2

Содержание элементов вторичной структуры в молекулах глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* X100 и *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7

Конформация	Глюкоамилаза из <i>Aspergillus awamori</i>			Глюкоамилаза из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	ν , см^{-1}	T, %	%	ν , см^{-1}	T, %	%
α -спирали	1646	34	24,4	1646	56	24,1
β -структура	1620	32	18,3	1620	60	18,8
Неупорядоченные участки	1652	34	57,2	1652	59	57,1

Из данных литературы следует, что в глобулярных белках, трехмерные структуры которых определены методом рентгено-структурного анализа, обычно около 60% остатков аминокислот участвуют в формировании вторичной структуры [1, 4-6]. Показано, что содержание α -спиралей в среднем составляет 35%, β -структур – 15%, реверсивных поворотов – 20-25%. В связи с тем, что с помощью метода ИКС не удается определить количество изгибов полипептидной цепи, в таблице 2 представлены результаты расчета α -спиралей, β -слоев и нерегулярных участков. Так как α -спираль является наиболее часто встречающимся в белках типом вторичной структуры, можно сделать предположение о ее высокой конформационной стабильности. С этим хорошо согласуется информация о расположении α -спирали в центре разрешенной области на карте Рамачандрана, а также тот факт, что диполи ее водородных связей имеют линейное расположение, отвечающее минимуму энергии. Кроме того, радиус спирали благоприятствует дисперсионному притяжению между остатками, расположенными по разные стороны от оси спирали [6, 7].

Таким образом, на основании результатов наших исследований установлено, что в состав вторичной структуры молекул глюкоамилаз плесневого и дрожжевого происхождения входят все основные элементы: α -спирали, β -слои и неупорядоченные фрагменты. При этом β -структура анализируемых ферментов характеризуется наличием антипараллельных цепей. Выявлено, что заниженное по сравнению со среднестатистическим содержание α -спиралей компенсируется за счет увеличения количества β -слоев.

Список литературы

1. Кантор Ч. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1984. – Т. 1. – 336 с.
2. Кожокина О.М., Ковалева Т.А. // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 8. – С. 19.
3. Кожокина О.М., Ковалева Т.А. // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 4. – С. 19.
4. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. – М.: Наука, 1992. – 358 с.
5. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. – М.: Высш. шк., 1996. – 335 с.
6. Шерман С.А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. – Минск: Наука и техника, 1989. – 240 с.
7. Шульц Г. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982. – 360 с.