DOI: 10.17117/na.2016.10.03.512

<http://ucom.ru/doc/na.2016.10.03.512.pdf>

Поступила (Received): 24.10.2016

Кожокина О.М. Анализ особенностей вторичных структур глюкоамилаз из различных продуцентов

Kozhokina O.M.
Analysis of particularity secondary structures
of glucoamylases from different producents

*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*

*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*

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

Key words: glucoamylase, α -spiral, β -sheet, unordered sites

Кожокина Оксана Михайловна

Кандидат биологических наук, ассистент
Воронежский государственный медицинский
университет им. Н.Н. Бурденко
г. Воронеж, ул. Студенческая, 10

Kozhokina Oksana Mikhailovna

Candidate of Biology Science, Assistant
Voronezh state medical university named N.N.
Burdenko
Voronezh, Studencheskaya st., 10

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.

В настоящее время существует большое количество предсказательных методов, позволяющих априорно на основе анализа аминокислотных последовательностей прогнозировать итог процесса свертывания полипептидной цепи в глобулу [1, 2]. Однако, анализ данных литературы показал, что с помощью имеющихся методов можно предсказывать правильную вторичную структуру лишь для двух третей всех остатков белка. 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.

Таблица 1. Параметры полос амид I и амид II для полипептидов и белков

Конформация	Амид I		Амид II	
	Частота, см ⁻¹	Коэффициент экстинкции, моль ⁻¹ см ⁻¹	Частота, см ⁻¹	Коэффициент экстинкции, моль ⁻¹ 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

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 см⁻¹ 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.

Анализ результатов, представленных в таблице 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, 2]. 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 удастся 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.

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 используемых источников:

1. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992. 358 с.
2. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.: Высш. шк., 1996. 335 с.