

УДК 577.152.311, 577.322.4

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЛИПАЗ БАКТЕРИЙ РОДА *Geobacillus* И ВЫЯВЛЕНИЕ МОТИВОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ИХ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ

© 2013 г. **К.Н. Сорокина, М.А. Нуриддинов, А.С. Розанов,  
В.А. Иванисенко, С.Е. Пельтек**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: sorokina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

В работе проведен анализ свойств термостабильных липаз бактерий рода *Geobacillus*. Проведена классификация ферментов по группам термостабильности. Показано наличие согласованных аминокислотных замен у группы липаз с высокой термостабильностью (со временем полуинактивации свыше 1000 мин): V198A, Q203E, V204I, Q217E и V294I, P306A, T307A, D312S, R313H, E316G, V324I, S334N, A343T. Наибольшее достоверное влияние на термостабильность ферментов оказывал гидрофильный момент  $\alpha$ -спиралей, который коррелировал с зарядом и полярностью аминокислотных остатков данных регионов. Показано, что у липаз с наибольшей термостабильностью происходит стабилизация «lid»-домена на структурном уровне в районе 198A-217E.

**Ключевые слова:** биоинформатика, липазы, термостабильность.

### ВВЕДЕНИЕ

В современной биотехнологии одним из наиболее востребованных направлений является разработка новых ферментов с определенными свойствами. Так, например, ферменты липазы (ЕС 3.1.1.3) нашли широкое применение в различных отраслях промышленности, в том числе пищевой, фармацевтической и химической (Jaeger, Eggert, 2002). Одним из важных свойств, определяющих их применимость в тех или иных процессах, является их термостабильность. Например, термостабильные липазы используются в процессах перестерификации пищевых жиров для получения продуктов с контролируемым составом триглицеридов.

В ряде работ показано, что липазы бактерий рода *Geobacillus* обладают высокой активностью и термостабильностью, что обуславливает их применимость для получения различных химических веществ с высокой селективностью, в том числе эфиров и амидов (Baldessari,

2012). Однако у липаз бактерий рода *Geobacillus* существует ряд существенных отличий в термостабильности ферментов, что делает их удобным объектом исследования связи структура–термостабильность и выявления функционально значимых мотивов в их структуре с использованием компьютерных подходов. С этой целью на базе аминокислотных последовательностей белков широко применяются методы, основанные на предсказании функционально значимых остатков в соответствии с консенсусным и филогенетическими подходами. Другим часто применяемым методом является статистический анализ взаимосвязи структура–активность в соответствии с физико-химическими свойствами белков (гидрофобность, заряд на поверхности и др.). Однако для наиболее точного выявления связи между определенными структурными мотивами и свойствами белков целесообразно исследовать и определять характер физико-химических взаимодействий в функционально значимых структурных мотивах белков. Этот подход к

исследованию связи структура–активность позволяет выявлять в белках отдельные районы, являющиеся существенными для проявляемых ими свойств и активности.

В данной работе для изучения связи структура–термостабильность у липаз бактерий рода *Geobacillus* был использован консенсусный подход и количественный многофакторный анализ физико-химических свойств структурных мотивов с использованием программы WebProAnalyst (Ivanisenko *et al.*, 2005). Полученные данные позволили выделить мотивы и отдельные аминокислотные остатки, а также некоторые структурные особенности ферментов, значимые для их термостабильности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Последовательности липаз, использованные в работе, и филогенетический анализ

В работе использовано 36 уникальных аминокислотных последовательностей липаз бактерий рода *Geobacillus*, опубликованных в открытой печати. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков проводили с использованием программы ClustalW. Построение филогенетического древа было выполнено с использованием алгоритма ближайших соседей в программе MEGA5; проверку статистической достоверности проводили при помощи бутстреп теста.

### Моделирование трехмерной структуры липаз

Моделирование структуры липаз для последующего анализа структуры проводили с использованием программы Modeller 9.10. В качестве шаблона для моделирования были взяты липазы бактерий: *G. stearothermophilus* P1 (PDB ID 1JI3, цепи A и B), *G. stearothermophilus* L1 (PDB ID 1KU0, цепи A и B), *G. zalihae* GZL-T1 (PDB ID 2DSN, цепи A и B) и *Geobacillus* sp. SBS-4S (PDB ID 3AUK). Визуальный анализ структур моделей, расчет и определение связей между участками ферментов выполняли в программе Swiss-PDB Viewer (Guex, Peitsch, 1997) и PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

По литературным данным, для компьютерного анализа свойств были отобраны следующие липазы бактерий: *G. lituanicus* (GLL); *G. stearothermophilus* (GSL); *Geobacillus* sp. (GspL); *G. thermocatenulatus* (GspL); *G. thermoleovorans* (GTL); *G. zalihae* (GZL) и липаза, выделенная из метабенома (ML). Первоначально была проведена классификация липаз по термостабильности, данные приведены в табл. 1. Для классификации липаз в качестве основного параметра использовали значения времен полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) при температурах 60, 65 и 70 °C. Однако в литературе для ряда ферментов отсутствовали некоторые данные по термостабильности. Для решения этой проблемы для некоторых липаз бактерий рода *Geobacillus* (GTcL BTL2, GTL ID-1, GZL T1 D311E, ML N355K, GSL YN) значения  $t_{1/2}$  были предсказаны в соответствии со значениями гомологичных ферментов.

Липазы были разделены на группы стабильности в соответствии со значениями температурного оптимума активности и стабильности. При разделении учитывали значение  $t_{1/2}$  при 60 °C, так как ему соответствовало наибольшее количество экспериментальных данных. Таким образом, всего было получено 4 группы: группа 1 ( $t_{1/2} < 60$  мин), группа 2 ( $t_{1/2} = 60–200$  мин), группа 3 ( $t_{1/2} = 200–1000$  мин), группа 4 ( $t_{1/2} > 1000$  мин). Ряд ферментов относили в группу с большей термостабильностью, если их стабильность при 70 °C была выше по сравнению с другими ферментами этой группы. Таким образом, липаза GTL ID-1 была отнесена к группе 2, GSL P1 – к группе 3, а GTL Toshki и GspL-RD2-Y224C – к группе 4.

Первоначально для определения различий между аминокислотными последовательностями термостабильных липаз, использованных в работе, был проведен филогенетический анализ, результаты приведены на рис. 1. В целом все исследуемые липазы могут быть разделены на два кластера, первый включает липазы, близкие к *G. stearothermophilus* и прочим видам; вторая группа – липазы, родственные только *G. zalihae*. Каждый из кластеров, в свою очередь, подразделяется еще на несколько групп. Однако в результате проведенного анализа не было отмечено зависимости между термоста-

Таблица 1

Значения температурных оптимумов активности  
и времени полуинактивации липаз бактерий рода *Geobacillus*

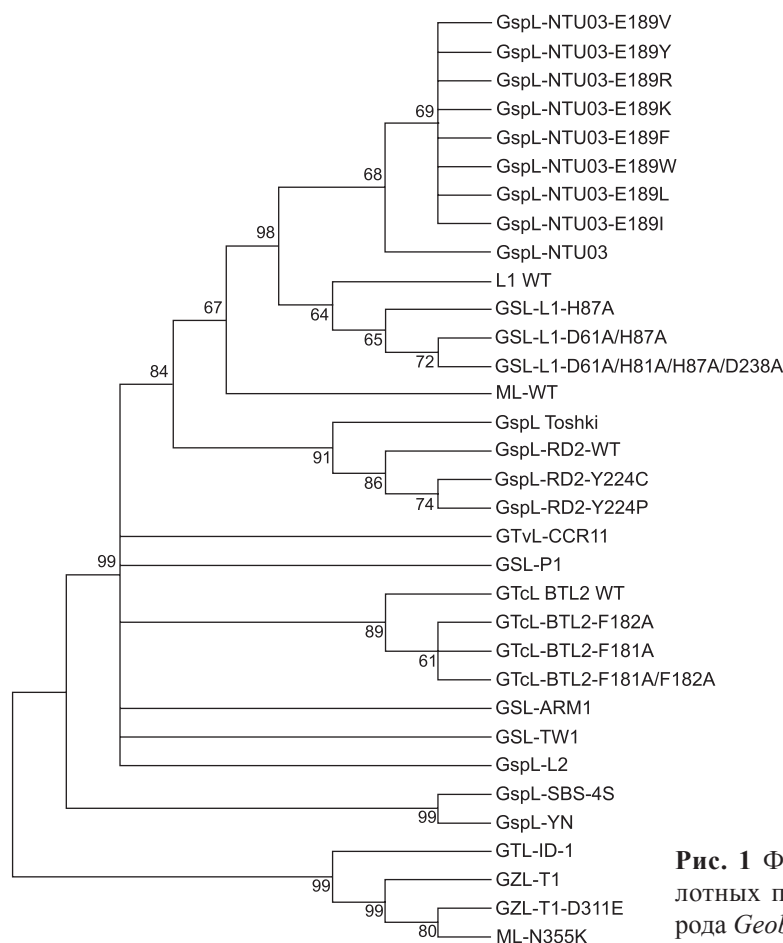
| Штамм                                                   | Оптимум<br>актив-<br>ности, °C | t <sub>1/2</sub> , мин |       |       | Группа<br>стабиль-<br>ности |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------|-------|-------|-----------------------------|
|                                                         |                                | 60 °C                  | 65 °C | 70 °C |                             |
| GSL ARM 1 (Ebrahimpour <i>et al.</i> , 2011)            | 65                             | 0                      | 0     | 0     | 1                           |
| GSL L1 WT (Kim <i>et al.</i> , 1998)                    | 60                             | 90                     | 15    | 10    | 1                           |
| GSL L1 H87A (Choi <i>et al.</i> , 2005)                 | 50                             | 0                      | 0     | 0     | 1                           |
| GSL L1 D61A/H87A (Choi <i>et al.</i> , 2005)            | 45                             | 0                      | 0     | 0     | 1                           |
| GSL L1 D61A/H81A/H87A/D238A (Choi <i>et al.</i> , 2005) | 45                             | 0                      | 0     | 0     | 1                           |
| GspL RD-2 Y224C (Wu <i>et al.</i> , 2010)               | 35                             | 0                      | 0     | 0     | 1                           |
| GspL SBS-4S (Tayyab <i>et al.</i> , 2011)               | 60                             | 20                     | 0     | 0     | 1                           |
| GSL TW1 (Hebin, Xiaobo, 2005)                           | 50                             | 36                     | 18    | 0     | 1                           |
| ML WT (Sharma <i>et al.</i> , 2012)                     | 50                             | 5                      | 0     | 0     | 1                           |
| GSL L2 (Sabri <i>et al.</i> , 2009)                     | 70                             | 200                    | 100   | 20    | 2                           |
| GTcL BTL2 WT (Quyen <i>et al.</i> , 2003)               | 55                             | 40                     | 30*   | 20    | 2*                          |
| GTcL BTL2 F181A (Karkhane <i>et al.</i> , 2009)         | 65                             | н/д                    | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GTcL BTL2 F182A (Karkhane <i>et al.</i> , 2009)         | 55                             | н/д                    | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GTcL BTL2 F181A/F182A (Karkhane <i>et al.</i> , 2009)   | 55                             | н/д                    | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GTL CCR11 (Quintana-Castro <i>et al.</i> , 2009)        | 60                             | н/д                    | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GTL ID-1 (Cho <i>et al.</i> , 2000)                     | 75                             | 60                     | 42*   | 35    | 2*                          |
| GSL P1 (Tyndall <i>et al.</i> , 2002)                   | 55                             | 300                    | 90    | 45    | 3*                          |
| GspL RD-2 WT (Wu <i>et al.</i> , 2010)                  | 55                             | 720                    | 360   | н/д   | 4                           |
| GspL RD-2 Y224P (Wu <i>et al.</i> , 2010)               | 65                             | 1000                   | 480   | н/д   | 4                           |
| GZL T1 (Ruslan <i>et al.</i> , 2012)                    | 70                             | 600                    | 300   | 30    | 3                           |
| GZL T1 D311E (Ruslan <i>et al.</i> , 2012)              | 70                             | 720                    | 415*  | 110   | 3                           |
| ML N355K (Sharma <i>et al.</i> , 2012)                  | 40                             | 720                    | 400*  | 75    | 3                           |
| GspL Toshki (Abdel-Fattah, Gaballa, 2008)               | 65                             | н/д                    | н/д   | 185   | 4                           |
| GSL YN (Soliman <i>et al.</i> , 2007)                   | 70                             | 1000                   | 600*  | 200   | 4                           |
| GspL NTU03 WT (Shih, Pan, 2011)                         | 55                             | >> 7000                | 7000  | н/д   | 4                           |
| GspL NTU03 E189I (Shih, Pan, 2011)                      | 55                             | >> 1400                | 1400  | н/д   | 4                           |
| GspL NTU03 E189L (Shih, Pan, 2011)                      | 55                             | >> 1400                | 1400  | н/д   | 4                           |
| GspL NTU03 E189W (Shih, Pan, 2011)                      | 55                             | >> 1400                | 1400  | н/д   | 4                           |
| GspL NTU03 E189F (Shih, Pan, 2011)                      | 45                             | н/д                    | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GspL NTU03 E189K (Shih, Pan, 2011)                      | 45                             | н/д                    | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GspL NTU03 E189R (Shih, Pan, 2011)                      | 50                             | 2800                   | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GspL NTU03 E189V (Shih, Pan, 2011)                      | 50                             | 1700                   | н/д   | н/д   | н/д                         |
| GspL NTU03 E189Y (Shih, Pan, 2011)                      | 45                             | н/д                    | н/д   | н/д   | н/д                         |

Примечание. \* Аппроксимация значения, н/д – нет данных.

бильностью и филогенетическим положением фермента.

Из представленных в табл. 1 значений для последующего компьютерного анализа были

отобраны липазы с известными значениями t<sub>1/2</sub> при 60 °C. Для этих белков было проведено множественное выравнивание 19 аминокислотных последовательностей зрелых форм ферментов



**Рис. 1** Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей липаз бактерий рода *Geobacillus*, использованных в работе.

(не содержащих сигнальный пептид). Результат приведен на рис. 2. В целом отмечено наличие согласованных аминокислотных замен для липаз бактерий рода *Geobacillus*, в частности у мотивов 198-217 AEIE (V198A, Q203E, V204I, Q217E), 248-269 PTRKS (S248P, K252T, Q255R, Q258K, A269S) и 294-343 IAASHGINT (V294I, P306A, T307A, D312S, R313H, E316G, V324I, S334N, A343T) для липаз 4-й группы термостабильности.

Для исследования связи выявленных отдельных замен и мотивов с термостабильностью ферментов был проведен компьютерный анализ их аминокислотных последовательностей с использованием программного пакета «Web-ProAnalyst». Для анализа была взята ранее сформированная выборка из 19 аминокислотных последовательностей липаз (см. рис. 2), в соответствие которым были поставлены их характеристические времена  $t_{1/2}$  при 60 °C. Первоначально был проведен анализ значений параметра SADC, позволяющий выявить внут-

ри аминокислотной последовательности белка сайты с достоверным уровнем корреляции физико-химических свойств и временем  $t_{1/2}$  фермента. Поиск был произведен для окна в 6 аминокислотных остатков, и было выявлено, что максимальная достоверность ( $p = 0,001-0,003$ ) наблюдается для корреляции значений времени полуинактивации и гидрофильности  $\alpha$ -спиралей для следующих позиций: 188-210 (SADC=0,593), 212-223 (SADC=0,812), 300-332 (SADC = 0,695-0,868).

Далее с использованием программы WebProAnalyst был проведен многофакторный дисперсионный анализ внутригрупповой корреляции физико-химических свойств выявленных мотивов с высоким значением SADC, позволивший рассчитать значения и определить уровень достоверности посредством множественной линейной регрессии для отдельных комбинаций параметров. Для анализа использовали значение ширины окна поиска в 20 аминокислотных остатков, а в качестве параметров использовали

| № | Липаза | Позиция |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|--------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|   |        | 2       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

**Рис. 2.** Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей липаз бактерий рода *Geobacillus*, отнесенных к различным группам термостабильности. Использованы последовательности с известными значениями времен полуинактивации при 65 °C.

\* № – номер группы термостабильности.

комбинацию двух факторов: свойства (заряд и полярность) и гидрофильного момента  $\alpha$ -спиралей. Результаты приведены в табл. 2.

Компьютерный анализ показал, что в целом наблюдается высокая степень корреляции двух параметров с гидрофильным моментом  $\alpha$ -спирали: полярности аминокислотных остатков и их заряда. Все полученные значения корреляции свойств имели высокий уровень достоверности ( $p = 0,003$ ), однако наиболее достоверные значения обоих параметров отмечены для района 321–340. Стоит отметить, что район 188–207, являющийся частью «lid»-домена липаз, имеет уровень достоверности корреляции гидрофильного момента  $\alpha$ -спирали и заряда/полярности несколько меньший, чем для других районов.

С целью оценки связи физико-химических свойств выявленных согласованных аминокислотных замен и гидрофильного момента  $\alpha$ -спирали был проведен аналогичный анализ для районов 198–218, 248–268, 294–335, которые по своему положению незначительно отличались от районов, предсказанных программой. Результаты расчетов представлены в табл. 3.

Как видно из приведенных данных, в целом значения уровня достоверности для данных районов также были высокими, однако чуть меньшими, чем для районов, предсказанных по значениям SACC. Для мотива 315–335 также была предсказана наибольшая достоверность по корреляции гидрофильного момента  $\alpha$ -спирали с зарядом ( $p = 0,006$ ) и полярностью ( $p = 0,010$ ) аминокислотных остатков.

Таблица 2

Многофакторный дисперсионный анализ внутригрупповой корреляции физико-химических свойств мотивов с высоким значением SACC посредством программы WebProAnalyst

| Фактор 1                              | Фактор 2   | Позиция | R     | F     | P     | SACC  |
|---------------------------------------|------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| Гидрофильный момент $\alpha$ -спирали | Полярность | 188–207 | 0,627 | 4,545 | 0,030 | 0,757 |
|                                       |            | 212–222 | 0,650 | 5,121 | 0,021 | 0,661 |
|                                       |            | 300–319 | 0,625 | 4,488 | 0,031 | 0,667 |
|                                       |            | 321–340 | 0,750 | 9,026 | 0,003 | 0,755 |
|                                       | Заряд      | 188–207 | 0,589 | 3,718 | 0,051 | 0,757 |
|                                       |            | 212–222 | 0,661 | 5,432 | 0,018 | 0,661 |
|                                       |            | 300–319 | 0,620 | 4,362 | 0,034 | 0,667 |
|                                       |            | 321–340 | 0,755 | 9,253 | 0,003 | 0,755 |

Таблица 3

Многофакторный дисперсионный анализ внутригрупповой корреляции физико-химических свойств районов консервативных замен термостабильных липаз бактерий рода *Geobacillus* посредством программы WebProAnalyst

| Фактор 1                              | Фактор 2   | Позиция | R     | F     | P     | SACC  |
|---------------------------------------|------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| Гидрофильный момент $\alpha$ -спирали | Полярность | 198–218 | 0,661 | 5,434 | 0,018 | 0,661 |
|                                       |            | 248–268 | 0,655 | 5,270 | 0,020 | 0,661 |
|                                       |            | 294–314 | 0,576 | 3,483 | 0,059 | 0,666 |
|                                       |            | 315–335 | 0,693 | 6,476 | 0,010 | 0,762 |
|                                       | Заряд      | 198–218 | 0,661 | 5,434 | 0,018 | 0,661 |
|                                       |            | 248–268 | 0,661 | 5,433 | 0,018 | 0,661 |
|                                       |            | 294–314 | 0,577 | 3,501 | 0,059 | 0,666 |
|                                       |            | 315–335 | 0,720 | 7,536 | 0,006 | 0,762 |



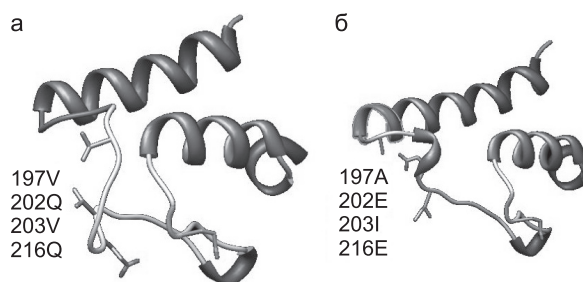
Для исследования структурных особенностей ферментов было проведено построение трехмерной структуры термостабильных липаз *Geobacillus*. Моделирование трехмерной структуры ферментов проводилось по гомологии с известными трехмерными PDB структурами липаз бактерий рода *Geobacillus* с учетом гетероатомов –  $Zn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ . Кроме того, следует отметить, что, по данным рентгеновской кристаллографии, липаза **GSL L1 (PDB ID 1KU0)** представлена двумя цепями, поэтому полученные модели ферментов также присутствовали в двух конформациях (обозначенных А и В1). Для остальных липаз таких различий не было обнаружено, и их конформация была обозначена как В2.

По результатам структурного выравнивания ферментов, показано отличие по положению атомов основной цепи ферментов не более чем на 0,5Å, что говорит об их высокой степени гомологии. Единственное значимое отличие в структуре липаз группы 1 от липаз группы 4 было обнаружено в регионе 191–195 аминокислотного остатка и соответствует региону «lid»-домена, включающему  $\alpha$ -спираль и прилегающему к ней району петли, структура которого приведена на рис. 3.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Липазы бактерий рода *Geobacillus* представляют собой обширную группу ферментов, имеющих, тем не менее, различия в термостабильности. В литературе описано достаточно данных о свойствах этих ферментов, однако полученные данные ранее не подвергались системному компьютерному анализу. В целом ранее было показано, что для липаз большое значение для термостабильности имеет «lid»-домен (Chakravorty, 2011).

Проведенный филогенетический анализ аминокислотных последовательностей не позволил определить четкую связь между термостабильностью и филогенетическим положением белка. Например, ферменты с высокой термостабильностью (**Gsp-NTU и его варианты, относящиеся к 4-й группе термостабильности**) имели высокую степень гомологии с **GSL-L1, относящимся к группе 1**, и т. д. Это может быть объяснено тем, что у липаз как у ферментов с высокой термо-



**Рис. 3.** Различия в третичной структуре «lid»-домена у липаз группы 1 и группы 4, по данным моделирования третичной структуры.

а – липазы группы 1; б – липазы группы 4.

стабильностью незначительные изменения в аминокислотной последовательности приводят к значительным изменениям в структуре белка, что выражается в изменении его свойств. В том числе в этом случае происходит изменение ядер стабильности в структуре и потеря «жесткости», что приводит к значительному снижению термостабильности фермента.

Проведенная в данной работе классификация исследуемых ферментов по группам термостабильности позволила выявить ряд замен, характерных для отдельных белков с характеристическими временами  $t_{1/2}$ . В целом у липаз 4-й группы, имеющих наибольшую термостабильность, было отмечено наличие двух мотивов с согласованными заменами (мотив AEIE в позициях 198–217 и мотив IAASHGINT в позициях 294–343). Стоит отметить, что у липаз группы 1 данные замены не представлены, у липаз 2-й и 3-й групп представлены лишь частично. Мотив IAASHGINT у липаз 4-й группы также представлен лишь отчасти. У всех последовательностей также были выявлены отдельные аминокислотные замены с разной степенью гомологии внутри групп.

Однако выявленные по данным множественного выравнивания согласованные аминокислотные замены у группы 4 не дают представления об их вкладе во внутрибелковые физико-химические взаимодействия, поэтому далее был проведен статистический анализ взаимосвязи структуры и активности в соответствии с физико-химическими свойствами белков с использованием программы «WebProAnalyst». Наиболее достоверное влияние на взаимосвязь структуры и термостабильности ( $SADC > 0,5$ ) оказывал гидрофильный

момент  $\alpha$ -спиралей. Таким образом, показано, что характер элементов вторичной структуры, а именно наличие  $\alpha$ -спиралей с определенными физико-химическими характеристиками, вносит существенный вклад в термостабильность белка. Также стоит отметить, что мотив с позицией 188–207 является частью «lid»-домена липазы, а остальные выявленные участки содержат выявленные ранее согласованные консервативные замены в белках.

Для определения влияния отдельных мотивов, содержащих отдельные аминокислотные замены, на термостабильность липаз был проведен многофакторный дисперсионный анализ внутригрупповой корреляции физико-химических свойств выявленных мотивов с высоким значением SADC, а также консервативных мотивов, выявленных по данным множественного выравнивания аминокислотных последовательностей. Показано, что все три выявленных консервативных района имеют высокий уровень корреляции между гидрофильным моментом  $\alpha$ -спирали и полярностью и зарядом остатков. Наибольшее значение достоверности отмечено для района 315–335, включающего участок  $\alpha$ 16-спирали. Однако также был выявлен и высокий вклад в термостабильность ферментов участка «lid»-домена (198–218), включающего  $\alpha$ 9-спираль. Последняя особенность соответствует ранее описанным в литературе данным (Chakravorty *et al.*, 2011). Для данного региона, по результатам моделирования третичной структуры, также было обнаружено, что у ферментов с заменами, характерными для липаз 4-й группы термостабильности (197A-202E-203I-216E), происходит стабилизация «lid»-домена на уровне макроструктуры. При этом в конформации A наблюдается появление дополнительного витка в  $\alpha$ 9-спирали «lid»-домена и более компактная укладка петли в районе 196–217. Несмотря на то что конформация B1 практически не отличалась от конформации B2 по своей структуре, для нее, тем не менее, было обнаружено наличие дополнительного солевого мостика 202E-109R для липаз группы 4, не формирующегося у прочих липаз, имеющих мотив 197V-202Q-203V-216Q.

Проведенное исследование позволило выявить два района согласованных замен у липаз бактерий рода *Geobacillus*, характерных для

ферментов с большими временами полуинактивации. Данные замены также входят в структуру  $\alpha$ -спиралей, чей гидрофильный момент с высоким уровнем достоверности коррелирует с зарядом и полярностью входящих в нее аминокислотных остатков. Помимо этого, свой вклад в термостабильность вносят отдельные структурные особенности, в том числе происходит стабилизация «lid»-домена за счет компактной укладки данного региона или появления дополнительного солевого мостика у наиболее термостабильных липаз. Таким образом, на термостабильность липаз бактерий рода *Geobacillus* оказывает влияние комбинация ряда факторов, в том числе физико-химические характеристики отдельных мотивов и особенности структурной организации ферментов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.512.11.0065).

## ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Fattah Y.R., Gaballa A.A. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli* // Microbiol. Res. 2008. V. 163. No. 1. P. 13–20.
- Chakravorty D., Parameswaran S., Dubey V.K., Patra S. *In silico* characterization of thermostable lipases // Extremophiles. 2011. V. 15. P. 89–103.
- Cho A.R., Yoo S.K., Kim E.J. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1 // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 186. No. 2. P. 235–238.
- Choi W.C., Kim M.H., Ro H.S. *et al.* Zinc in lipase L1 from *Geobacillus stearothermophilus* L1 and structural implications on thermal stability // FEBS Lett. 2005. V. 579. No. 16. P. 3461–3466.
- Ebrahimpour A., Rahman R.N.Z.R.A., Basri M., Salleh A.B. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM // Bioresource Technol. 2011. V. 102. No. 13. P. 6972–6981.
- Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb-Viewer: An environment for comparative protein modeling // Electrophoresis. 1997. V. 18. P. 2714–2723.
- Hebin L., Xiaobo Z. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1 // Protein Expression Purification. 2005. V. 42. No. 1. P. 153–159.
- Ivanisenko V.A., Eroshkin A.M., Kolchanov N.A. WebPro-Analyst: an interactive tool for analysis of quantitative structure-activity relationships in protein families // Nucl.



- Acids Res. 2005. V. 33. P. 99–104.
- Jaeger K.E., Eggert T. Lipases for biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. P. 390–397.
- Karkhane A.A., Yakhchali B., Jazii F.R., Bambai B. The effect of substitution of Phe181 and Phe182 with Ala on activity, substrate specificity and stabilization of substrate at the active site of *Bacillus thermocatenulatus* lipase // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 2009. V. 61. No. 3/4. P. 162–167.
- Kim H.K., Park S.Y., Lee J.K., Oh.T.K. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 // *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 1998. V. 62. No. 1. P. 66–71.
- Quintana-Castro R., Dhaz P., Valerio-Alfaro G. *et al.* Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase // *Mol. Biotechnol.* 2009. V. 42. No. 1. P. 75–83.
- Quyen D.T., Schmidt-Dannert C., Schmid R.D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase // *Protein Expres. Purif.* 2003. V. 28. No. 1. P. 102–110.
- Ruslan R., Rahman R.N.Z.R.A., Leow T.C. *et al.* Improvement of thermal stability via outer-loop ion pair interaction of mutated T1 lipase from *Geobacillus zalihae* strain T1 // *Intern. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. No. 1. P. 943–960.
- Sabri S., Rahman R.N.Z.R.A., Leow T.C. *et al.* Secretory expression and characterization of a highly Ca<sup>2+</sup>-activated thermostable L2 lipase // *Protein Expres. Purif.* 2009. V. 68. No. 2. P. 161–166.
- Sharma P.K., Kumar R., Kumar R. *et al.* Engineering of a metagenome derived lipase toward thermal tolerance: Effect of asparagine to lysine mutation on the protein surface // *Gene*. 2012. V. 491. No. 2. P. 264–271.
- Shih T.W., Pan T.M. Substitution of Asp189 residue alters the activity and thermostability of *Geobacillus* sp. NTU 03 lipase // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33. No. 9. P. 1841–1846.
- Baldessari A. Lipases as catalysts in synthesis of fine chemicals // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 861. P. 445–456.
- Soliman N.A., Knoll M., Abdel-Fattah Y.R. *et al.* Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt // *Process Biochem.* 2007. V. 42. No. 7. P. 1090–1100.
- Tayyab M., Rashid N., Akhtar M. Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase // *J. Biosci. Bioengineer.* 2011. V. 111. No. 3. P. 272–278.
- Tyndall J.D.A., Sinchaikul S., Fothergill-Gilmore L.A., Taylor P. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1 // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 323. No. 5. P. 859–869.
- Wu L., Liu B., Hong Y. *et al.* Residue Tyr224 is critical for the thermostability of *Geobacillus* sp. RD-2 lipase // *Biotechnol. Lett.* 2010. V. 32. No. 1. P. 107–112.

## COMPUTER ANALYSIS OF THE STRUCTURES OF LIPASES FROM *GEOBACILLUS* BACTERIA AND IDENTIFICATION OF MOTIFS DETERMINING THEIR THERMOSTABILITY

K.N. Sorokina, M.A. Nuriddinov, A.S. Rozanov, V.A. Ivanisenko, S.E. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: k.sorokina@gmail.com

### Summary

Properties of thermostable lipases from *Geobacillus* bacteria are considered. The enzymes are divided into groups with regard to their thermostability. Coordinated amino acid substitutions are demonstrated in the highly thermostable group (half-inactivation time > 1000 min); V198A, Q203E, V204I, Q217E; and V294I, P306A, T307A, D312S, R313H, E316G, V324I, S334N, A343T. The hydrophilic moment of  $\alpha$  helices, correlating with the charge and polarity of amino acid in the region, exerts the most significant influence on enzyme thermostability. Most thermostable lipases are characterized by structural stabilization of the lid domain in the 198A-217E region.

**Key words:** bioinformatics, lipases, thermostability.