Исследование структурно-функциональных свойств глюкоамилазы из дрожжей saccharomyces cerevisiae

Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Артюхов В.Г.
Воронежский государственный университет, Воронеж

Изучение структурно-функциональных свойств глюкоамилазы необходимо для расшифровки молекулярного механизма катализа реакции гидролиза крахмала до глюкозы. В качестве продуцента фермента нами был выбран штамм хлебопекарных дрожжей Saccharomyces cerevisiae. Методика очистки глюкоамилазы включала стадии ультрафильтрации на мембране УФМ-50, осаждения изопропиловым спиртом и гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G-100. Оптимальными условиями функционирования полученного фермента являются температура 37°С, значение pH среды 4,7, концентрация субстрата 1,17 10^{-6} моль/л. Исследование процесса термической инактивации показало низкую термостабильность глюкоамилазы дрожжевого происхождения по сравнению с энзимом из микромицета Aspergillus awamopi. На основании данных, полученных при изучении кинетико-термодинамических параметров термоденатурации, и результатов дифференциально-термического анализа сделано заключение о сложном механизме разворачивания упорядоченной белковой глобуле в хаотический клубок, включающем ряд промежуточных стадий.

Сравнение аминокислотных последовательностей глюкоамилаз из Saccharomyces cerevisiae и Aspergillus awamopi показало их гомологичность на 13,1%. Анализ вторичной структуры этих ферментов свидетельствует об участии ≈60% всех аминокислотных остатков в образовании упорядоченных элементов данного уровня организации. Выявлено, что α-спирали и β-слои, характеризующиеся наличием исключительно антипараллельных цепей, не имеют тенденции к топологии в определенных участках белковой глобулы. Установлено, что в молекулах глюкоамилазы отсутствуют π-спирали, полипролиновые спирали и, по-видимому, 3_{10}-спирали.

Сравнительный анализ пространственных моделей глюкоамилаз из Saccharomyces cerevisiae и Aspergillus awamopi позволил обнаружить их значительное сходство: аналогична плотная упаковка гидрофобного ядра, активный центр находится в полости, содержащей молекулы воды, в каталитическом акте принимает участие карбоксильная группа глутаминовой кислоты.

На основании данных по определению значений pK диссоциирующих групп, фотоокисления в присутствии метиленового голубого и результатов компьютерного моделирования установлено, что в связывании крахмала принимают участие О-гликозилированные участки крахмалсвязывающего домена и Trp-120; за разрыв гликозидных связей ответственны COOH-группы Asp-55, Glu-179, Glu-400.

Влияние температуры на уровень активности нейтральной протеиназы слизистой кишечника русского осетра

Левченко О.Е.
Астраханский государственный технический университет, Астрахань

Пищеварение является основой обеспечения любого организма энергией и структурными веществами и представляет собой совокупность процессов, обеспечивающих ферментное расщепление биополимеров. Известно, что факторы окружающей среды оказывают непосредственное воздействие как на организм в целом, так и на процессы, происходящие в нем. В связи с этим, особый интерес представляет исследование закономерностей воздействия факторов окружающей среды на процессы пищеварения. Температура является одним из основных лимитирующих факторов среды обитания и оказывает огромное влияние на организм животных. Работы, проведенные в области изучения функции пищеварительных ферментов при воздействии различных температур, в основном посвящены проблеме адаптации пищеварительной системы пресноводных костистых рыб, в то время как данные по исследованию механизмов адаптации пищеварительной системы осетровых рыб в литературе практически отсутствуют.

В связи с этим, нами было исследовано влияние температуры инкубации на уровень активности пищеварительных ферментов комплекса нейтральной протеиназы слизистой оболочки кишечника молоди русского осетра (Acipenser gueldenstaedti Brandt). Исследования проводились с использованием общепринятых физиолого-биохимических методов.

В результате проведенных нами экспериментов установлено, что с повышением температуры