

Исследование структурно-функциональных свойств глюкоамилазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Артохов 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°C, значение pH среды 4,7, концентрация субстрата $1,17 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Исследование процесса термической инактивации показало низкую термостабильность глюкоамилазы дрожжевого происхождения по сравнению с энзимом из микромицета *Aspergillus awamori*. На основании данных, полученных при изучении кинетико-термодинамических параметров термоденатурации, и результатов дифференциально-термического анализа сделано заключение о сложном механизме разворачивания упорядоченной белковой глобулы в хаотический клубок, включающем ряд промежуточных стадий.

Сравнение аминокислотных последовательностей глюкоамилаз из *Saccharomyces cerevisiae* и *Aspergillus awamori* 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 awamori* позволил обнаружить их значительное сходство: аналогична плотная упаковка гидрофобного ядра, активный центр находится в полости, содержащей моле-

кулы воды, в каталитическом акте принимает участие карбоксильная группа глутаминовой кислоты.

На основании данных по определению значений рК диссоциирующих групп, фотоокисления в присутствии метиленового голубого и результатов компьютерного моделирования установлено, что в связывании крахмала принимают участие O-гликозилированные участки крахмал-связывающего 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

инкубации от 0°C до 60°C происходит последовательное увеличение уровня активности исследуемой группы ферментов. Так, в частности, уровень активности группы нейтральной протеиназы при 0°C составляет $0,11 \pm 0,01$ мкмоль/(г*мин), при 20°C – $0,4 \pm 0,03$ мкмоль/(г*мин), а при 60°C наблюдается максимальный уровень активности данной группы ферментов – $4,4 \pm 0,4$ мкмоль/(г*мин). Как было показано ранее (обзор: Уголев, Кузьмина, 1993), максимальный уровень гидролитической активности для аналогичных ферментов слизистой оболочки кишечника пресноводных костистых, на примере леща, наблюдается так же при 60°C, а при 0°C активность ферментов составляет 5 % от максимального значения, в то время как у русского осетра – 2,5%. В то же время дальнейшее увеличение температуры инкубации (до 70°C) приводит к снижению уровня активности нейтральной протеиназы у русского осетра более чем в 2 раза относительно максимального уровня, зарегистрированного при 60°C.

Таким образом, на основании приведенных данных, можно сделать вывод о том, что температура оказывает существенное влияние на процессы пищеварения у осетровых рыб. Регулируя температуру среды, можно оказывать влияние на процессы потребления и усвоения пищевых веществ.

Использование структуры Вай *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn в его внутривидовой систематике

Поскальнюк Н.А., Донскова А.А.

*Тюменский государственный университет,
Тюмень*

Род *Pteridium* - распространен на всех пяти континентах Земного шара, во всех климатических зонах за исключением тундр и аридных областей. Таким образом орляк одно из сосудистых растений космополитов. (Голмачев, 1974). Во многих частях своего ареала *Pteridium aquilinum* - растение обычное, произрастающее массово и проявляющее способность образовывать заросли. В связи с таким широким распространением нашего вида и различием местообитаний возникает вопрос: один ли это вид?

Pteridium давно находится в центре внимания разных исследователей. Во второй половине 20 столетия ученые, изучающие орляк, активно

разрабатывают вопросы его таксономии (Пересторонина О.Н. 1999).

По инициативе австралийских птеридологов была сделана попытка использовать вайи орляка в его внутривидовой систематике. В Западной Европе она детально изучена, но результаты этих исследований почти не известны в России. Изучением морфологических отличий вай *Pteridium* на территории Европейской России, Крыма и Кавказа занималась О.Н. Пересторонина (1999) Она выявила три географические расы, которые рассматриваются ею в ранге подвидов: в Европейской России - *P. aquilinum* subsp. *aquilinum*, в Крыму - *P. aquilinum* subsp. *brevipes* и на Кавказе - *P. aquilinum* subsp. *transcaucasica*.

Для Западной Сибири литературных данных по этому вопросу не обнаружено, и мы поставили перед собой цель: установить к какому из известных подвидов относится орляк юга Западной Сибири, или здесь он - самостоятельный подвид.

Сбор материала проводили в течение трех вегетационных периодов 2000-2002 гг. на юге Тюменской области (Западная Сибирь). Для изучения фитоценотической приуроченности было сделано 40 геоботанических описаний по общепринятой методике Учетной единицей орляка считали сформированные вайи. Из локальных популяций были взяты массовые выборки, в количестве 25 учетных единиц и проведена статистическая обработка данных. Онтогенетический состав изучали, пользуясь принципами периодизации онтогенеза гаметофитов, предложенными Н.И. Шориной (2001), для чего был заложен лабораторный эксперимент.

Нами также были проведены исследования по изучению жизненной формы *Pteridium aquilinum*, для чего были выкопаны корневища папоротников и законсервированы.

Подвиды у орляка выделяют на основании изучения морфологической структуры его вай: спорофит *Pteridium* - многолетнее травянистое растение с крупными, триждыперистыми листьями. Листья папоротника имеют сложное морфологическое и анатомическое строение; они состоят из основания - филлоподия, черешка и листовой пластинки. Нами было изучено 7 морфологических признаков, 4 из которых являются диагностическими - число перьев первого порядка, число перьев второго порядка, степень расчленения вай (соотношение числа пар трижды перистых перьев первого порядка к числу отдельных и рассеченных перышек), опушение